

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E MOLECULAR DE INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SP. EM ANIMAIS DOMÉSTICOS NO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE FIGUEIREDO, AM, BR

Diany Bezerra CARDOSO; Sônia Rolim REIS²; Francimeire Gomes PINHEIRO³; Elenice Ponciano ALVES⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientadora CPCS /INPA; ³ co-orientadora CPCS /INPA;

⁴Colaboradora CPSC/INPA

1. Introdução

Os protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (Ross,1903) são causadores de enfermidades zoonóticas que acometem o sistema fagocítico mononuclear que, por suas características clínico-epidemiológicas, podem ser classificadas como leishmaniose cutânea, cutâneo-mucosa ou mucocutânea, cutânea difusa e visceral (Rey, 1992). Para Gomes *et al.* (1990), a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada essencialmente zoonose do ambiente florestal primitivo, processando-se o ciclo vital do parasito sem a participação humana. Este aspecto ecológico explica porque há relação fundamental entre o homem, seu contato com as florestas e a manifestação da doença. O modo mais prevalente de transmissão da LTA é o selvático com exceção da *L. braziliensis* (Vianna, 1915) uma vez que este agente tem sobrevivido em condições alteradas do ambiente florestal e extraflorestal. Segundo Franco (1990), dentre os reservatórios secundários encontram-se diversos mamíferos que vivem nas habitações humanas ou nas suas proximidades como roedores, canídeos, equinos e até mesmo felinos como o caso de isolamento de *Leishmania amazonensis*. em gato doméstico (Tolezano *et al.*,2007) alguns parasitas desses animais tem sido caracterizados e identificados como os responsáveis na transmissão da leishmaniose cutânea em humanos. Nos canídeos e equinos, o parasitismo produz lesões semelhantes às que produz no homem. A frequente observação de cães com elevados índices de infecções, associadas a *L. (V.) braziliensis* (Lainson e Shaw 1987) que circulam nas populações humanas e caninas em áreas endêmicas de LTA, sugere o envolvimento do cão no ciclo de transmissão da forma tegumentar (Lopes *et al.*, 1984; Pacheco *et al.*, 1986). Reis (2008) realizou um inquérito sorológico em 600 cães nas seis zonas urbanas do município de Manaus e houve correlação entre o maior percentual de casos de LTA humana 44% (40/91) e animal 17% (13/75) na zona Leste. O município de Presidente Figueiredo é endêmico para LTA humana nos 03 últimos anos foram notificados 506 casos, porém ainda não há estudos sobre a ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana em animais domésticos.

O objetivo deste trabalho foi diagnosticar através de exames parasitológicos e molecular Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em cães e gatos domiciliados na zona urbana do município de Presidente Figueiredo-AM, Brasil.

2. Material e Métodos

Área e população de estudo: O município de Presidente Figueiredo faz parte da área metropolitana de Manaus. Está situado as margens da BR 174, a 107 km da capital, com uma população de 24.360 habitantes e uma área territorial de 25.422 km² (IBGE/2007). Foram examinados 90 animais sendo 89 cães e um gato em áreas de maior transmissão em humanos. Foram realizadas 08 biopsias em lesão suspeita e 01 coleta de sangue em um cão com sintomatologia característica de Leishmaniose Visceral. Os animais selecionados foram cadastrados em fichas clínico-epidemiológicas.

Coleta de material para diagnóstico: Os fragmentos de pele em animais que apresentaram lesão foram colhidos assepticamente após tricotomia e assepsia com água, sabão e álcool 70%. As amostras coletadas foram enviadas ao Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas/Coordenação de Pesquisa em Ciências da Saúde do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Posteriormente as amostras foram submetidas a isolamento em cultivo e inoculação em animais de laboratório (Hamster/*Mesocricetus auratus*).

Exames laboratoriais: Cultivos das amostras- Os fragmentos de pele foram semeados em meio NNN - Difco (Novy e MacNeal, 1904; Nicole, 1908) próprio para *Leishmania*, salina estéril e antibiótico, enriquecido com fase líquida de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. **Imprint** - A impressão por aposição foi realizada através da compressão do fragmento de tecido, obtido por biópsia, sobre uma lâmina microscópica de vidro limpa. O material coletado foi corado pelo Kit Panótico Rápido. **Inoculação**-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. O mesmo foi inoculado no focinho e pata direito de hamsters.

Molecular:Reação em cadeia da polimerase (PCR)- Os fragmentos de pele coletados foram introduzidos em tubos de Eppendorf contendo etanol.

Extração de DNA: A reação de Ln-PCR foi padronizada no laboratório de Leishmaniose do INPA para amplificar a região de mini-exon ("spliced leader RNA gene") de espécies de *Leishmania* em lesão cutânea de cães, segundo Miranda *et al*, (2002) modificado. Os ensaios foram preparados para detecção de reduzido número de parasitas e amplificação da região de mini-exon, reconhecendo pelo menos três representantes de grupos de parasitos dos sub-gêneros *Leishmania* e *Viannia*. Esta metodologia possibilitará processar um grande número de amostras sincronicamente, fato necessário em estudos epidemiológicos.

Amplificação do DNA: Na 1ª reação foram utilizado 10µL de DNA (400 ng/µL) e tampão "master mix" contendo: 2mM MgCl₂ 10 X, MgCl₂ 10mM, 10% DMSO, 10mM deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1U/uL de Tth DNA polimerase, 15 pmol/uL de cada iniciador para 50 uL de reação. Os iniciadores foram: **Slrev** e **SL2** (Pinheiro, 2004) que anelam nas regiões de mini-exon de *Leishmania* para amplificação dos fragmentos. Os reagentes e os iniciadores utilizados foram da Invitrogen®. A reação foi realizada em 35 ciclos de amplificação em um termociclador automático (PX2 Thermal Cycler - Thermo). As condições das reações estão descritas a seguir (Tabela 1):

Tabela 1. Condições de amplificação pela técnica Ln-PCR (Nested PCR)

Estágio	Temperatura	Tempo	Número
Desnaturação	85° C	4 min	1 ciclo
Desnaturação	94° C	7 min	1 ciclo
Desnaturação	94° C	20 seg	35 ciclos
Anelamento	50° C	30 seg	35 ciclos
Extensão	72° C	20 seg	35 ciclos
Extensão	72° C	10 min	35 ciclos

Na segunda reação de PCR, foi adicionado 5 uL do produto amplificado para um volume final de 50 uL de reação. Nesta segunda etapa, os iniciadores foram o **SLM1** e **SLM2** (Pinheiro, 2004). Os fragmentos obtidos após a amplificação referem-se aos sub-gêneros *Leishmania* e *Viannia*, referentes aos tamanhos de: 451 pb (pares de base) para *L.infantum*, *L.chagasi*, 302 pb para *L. (Leishmania) sp.* e 242 pb para *L. (Viannia) sp.*

As reações seguiram programas idênticos para ambas amplificações. As etapas das reações foram realizadas em duplicata em dia e períodos diferentes.

Nas etapas de preparo do DNA e misturas da reação da PCR foram utilizados controles negativos com água destilada e "mix" (v/v) (sem DNA), além dos controles positivos de cultivo parasitário (10⁶) de: *L.(V.) guyanensis* - cepa MHOM/BR/95/IM4143 e *L.(V.) braziliensis* - MHOM/BR/75/M2903.

3. Resultados e discussão:

Os cães foram triados através de um inquérito casa a casa, realizado em três bairros loteados recentemente (Galo da Serra, Sol Nascente e Orquídeas) e dois outros mais antigos (Tancredo Neves e José Dutra) do município de Presidente Figueiredo, no período de 01 de outubro de 2009 a 28 de maio de 2010. Foram examinados quanto ao estado de saúde e a presença de lesões sugestivas de LTA totalizando neste período 90 animais, dos quais nove apresentavam lesões cutâneas. Foram realizadas 18 biópsias de acordo com o número de lesões que apresentaram. O material coletado foi levado ao Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas/Coordenação de Pesquisa em Ciências da Saúde do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sendo semeado em meio semi-sólido NNN específico para o cultivo do parasita e foi incubado a 28°C, sendo realizados exames semanais a partir do 5º dia. Não foi observado desenvolvimento do parasita em nenhuma das amostras. Todas as amostras foram 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' flucitocina (SIGMA) na concentração de 500µg/mL segundo Jaffe (1984). O animal que apresentava sintomas característicos de Calazar (leishmaniose visceral) não apresentou sororeatividade pelas técnicas de ELISA e Imunofluorescência indireta. Os exames sorológicos foram realizados no laboratório de sorologia do ICB/UFMG.

Foram realizadas nove impressões em lâminas ("imprint") e não houve a visualização de formas amastigotas de *Leishmania*. Para Silveira *et al.* (1996) o esfregaço 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 de animais domésticos.

Em umas das laminas (gato) foram visualizados formas leveduriformes características de *Cryptococcus sp.*

Foram inoculadas oito amostras em hamster e até o momento não houve o aparecimento de lesões. No intuito de confirmar o resultado do exame parasitológico, amostras provenientes de sete animais foram submetidas à diagnóstico molecular através da técnica de PCR e não houve amplificação de DNA em nenhuma delas.

Dentre os 90 animais examinados a maioria encontrava-se em bom estado nutricional, sem lesão diferente do estudo realizado por Gama *et al.* (2009) que examinou 40 animais em área endêmica no município de Manaus encontrou 17 com lesão suspeita dos quais 6 amplificaram DNA pela técnica de PCR.

De acordo com as amostras coletadas, oito animais residem em domicílio de madeira e dois em domicílio de alvenaria, seis convivem com outros animais (cão, galinha e gato), seis permanecem soltos e três ficam preso durante a noite. Em uma residência havia uma pessoa com LTA e em outras três havia pessoas que já tiveram e fizeram tratamento. Um dos cães não apresentava lesão característica, porém apresentava sintomatologia característica de leishmaniose visceral (debilidade, crescimento exacerbado de unhas, queda de pelo), no qual coletou-se apenas sangue para realização de sorologia para LV, cujo resultado foi negativo. Nessa residência havia uma pessoa que teve LTA e foi submetido à tratamento.

O resultado negativo em relação ao desenvolvimento de parasitas em meio de cultivo condiz com os resultados encontrados por Reis (2008) que de 52 amostras 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 cultura de lesões de 31 cães, houve contaminação de todas as culturas.

Apesar de Presidente Figueiredo ser área endêmica para LTA e ter 506 notificações (DATA SUS, 2010) nos últimos três anos, não foi diagnosticado a infecção nos animais estudados.

4. Conclusão

No município de Presidente Figueiredo, apesar de ser área endêmica para LTA humana, não foi diagnosticado a infecção nos animais pesquisados.

Os animais examinados apresentaram um bom estado de saúde, havendo um baixo número de animais com lesão suspeita.

5. Referências

Franco, A. M. R. 1990, Leishmaniose Tegumentar em *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 (MARSUPIALIA: DIDELPHIDAE): Estudo da infecção experimental por *Leishmania* spp. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz -FIOCRUZ, 141 p. Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária.

Gama, Ana Cláudia de Souza; Reis, Sônia Rolim; Pinheiro, M.G. 2009, Leishmaniose Tegumentar Canina: Diagnóstico parasitológico de infecção por *Leishmania* sp. domiciliados na zona leste do município de Manaus, Am,Br.

Gomes, A. C., Coutinho, S.G., Paim, G.V., Oliveira, S.M. 1990. Aspectos Ecológicos da leishmaniose Tegumentar Americana. Avaliação da atividade enzoótica de leishmania (*Viannia*) *braziliensis*, em ambiente florestal e peridomiliar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brazil. *Rev Inst. Med. Trop. São Paulo*. v. 32 (2), p. 105-115.

Jaffe, C.L., Grimaldi Jr., G. & McMahon-Pratt, D., 1984 The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: Morel, C.M- (ed.), Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual. 2nd Ed. Fundação Oswaldo Cruz, RJ, pp.47-91.

Lainson, R. e Shaw, J. J. 1987. Evolution, Classification and Geographical Distribution. In: Peters, W. & Killick-Kendrick, R. *The leishmaniasis in Biology & Medicine*. London: Academic Press, v. 1, cap.1, p. 1-119.

Lopes, U. G.; Momen, H.; Grimaldi, Jr. G.; Marzochi, M. C. A.; Pacheco, R. S. e Morel, C. M. 1984. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci visceral and cutaneous Leishmaniasis. *J. Parasitol.*, v. 70(1), p. 89-98.

Miranda, J. C.; Reis, E.; Schriefer, A.; Gonçalves M.; Galvão, M.; Carvalho, L. 2002, Frequency of Infection of Lutzomyia Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, n.2, p. 185-188.

Nicolle, G. L. 1908. Culture du parasite du Bouton d'Orient. *C.R. Acad. Sci.*, 146842-843.
Pacheco, R. S.; Lopes, U. G.; Morel, C. M. 1986. Grimaldi Jr. e Momen, H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: *Leishmania. Taxonomie et phylogenese. Applications eco-epidemiologiques*. IMEEE, Montpellier, p. 57-6.

Novy, F. G.; MacNeal, W. J. 1904. On the cultivation of *Trypanosome brucei*. *J. Inf. Dis.*, 1:130;

Pacheco, R. S.; Lopes, U. G.; Morel, C. M. 1986. Grimaldi Jr. e Momen, H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: *Leishmania. Taxonomie et phylogenese. Applications eco-epidemiologiques*. IMEEE, Montpellier, p. 57-6.

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

Pinheiro, M. G. 2004. Infecção Natural em *Lutzomyia (N.) umbratilis*; Ward & Fraiha, 1977 (Diptera: Psychodidae; Plebotominae) por *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no estado do Amazonas, Brasil. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 114 p., Dissertação 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.

Rey, L. 1992. Bases da parasitologia médica. Leishmanioses cutâneas e mucocutâneas do Novo Mundo. Leishmaniose visceral ou calazar, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 46-65:

Ross, R. 1903. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further on Leishman's bodies. *Br. Med. J.*, v. 2, p. 1261.

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

Tolezano, J., E., Uliana, S., R., B.; Taniguchi, H., H.; Araújo, M., F., L.; Barbosa, J., A., L.; Barbosa, J., E., R.; Floeter-Winter, L., M.; Shaw, J. J. The first. 2007 Record of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasit.*, v. 149, p. 280-284.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas IBGE. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>, acessado em 21 de maio de 2009;

Banco de dados do Sistema  nico de Saúde. Disponível em <<http://www.datasus.gov.br>>, acessado em 12 de janeiro de 2010.