



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG**  
**Coordenadoria Geral de Pesquisa – CGP**  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga  
Cep: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 215-5564 – Fone/Fax (86) 215-5560  
E-mail: pesquisa@ufpi.br; pesquisa@ufpi.edu.br

## **ESTUDO DAS VARIANTES GENÉTICAS DE *Leishmania infantum chagasi* EM TERESINA, PIAUÍ CAUSADORES DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

*Kellen Matuzzy Silva (bolsista do PIBIC/UFPI), Leopoldo Fabrício Marçal do Nascimento, (colaborador), Joilson Ferreira Batista (colaborador), Maria do Socorro Pires e Cruz (Orientador DMV/CCA/UFPI).*

### **INTRODUÇÃO**

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma doença emergente em diferentes partes do mundo. Estima-se que 350 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco, com uma prevalência mundial de 12 milhões e incidência anual de 1,5 milhões de casos. É uma zoonose de evolução crônica de grande importância na América do Sul, especialmente no Brasil (WHO, 2010).

A introdução de várias abordagens moleculares tem sido utilizadas na caracterização da genética em espécie do gênero *Leishmania*, como o polimorfismo de DNA amplificado, análise de regiões amplificadas de sequência confirmada, análise por hibridização de sondas de DNA (Southern blotting), análise de regiões de DNA com marcadores de microssatélites (LAURENT et. al.; 2007).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as possíveis variabilidades genéticas de *Leishmania infantum chagasi* causadoras de Leishmaniose visceral canina na cidade de Teresina-Piauí, com respectiva comparação e avaliação da sintomatologia apresentada pelo animal.

### **METODOLOGIA**

O presente trabalho foi composto de 329 cães os quais foram examinados de acordo com parâmetros clínicos definidos por Manna et al. (2009), com algumas modificações, que foram compilados em uma ficha de avaliação clínica, os quais foram atribuídos escores, variando de 0 a 12, de acordo com a quantidade dos sinais clínicos apresentados. Após a avaliação clínica, foram colhidas amostras de medula óssea e de linfonodos que se apresentassem aumentados. Em seguida, foi realizado o esfregaço em lâmina de microscopia fosca para exame direto e inoculação destes aspirados em tubo de cultura contendo meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolli), enriquecido com 1mL de Schneider's Insect®. Estas amostras foram identificadas e incubadas a 26°C, por no máximo 20 dias. O aspirado de medula óssea foi coletado em quantidade suficiente para realização da cultura e armazenagem em criotubo para congelamento em freezer -80°C.

As leituras das culturas foram realizadas em lâmina de microscopia colocando 17µL das cepas e coberta com lamínulas, sendo visualizadas em microscópio óptico de luz, com objetiva de 40x. A primeira leitura foi realizada com 3 dias de incubação para linfonodo e 5 dias para medula, sendo as leituras sucessivas realizadas sempre 48 horas após a leitura anterior. Uma vez visualizadas

as formas promastigotas, as cepas foram congeladas em freezer -80°C para posterior extração de DNA. Os DNAs das amostras de medula e das cepas foram obtidos por um processo simples de extração com a resina Chelex®(Bio-Rad), seguindo as recomendações do fabricante.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 329 animais incluídos no estudo, 91 apresentaram exame parasitológico positivo, perfazendo um total de 27,49% de positividade. Os achados clínicos encontrados nos animais avaliados mais sugestivos de leishmaniose foram: Linfonodos aumentados (83,51%), lesão de pele (orelha/focinho) (50,54%), Onicogribose (45,05%), Alopecia (32,96%), Despigmentação do Focinho (31,86%) e Emagrecimento (37,36%).

Após a análise dos sinais clínicos, utilizando-se a ficha com os dados e atribuídos escores, tabulou-se os resultados conforme Tabela 1, onde podemos visualizar os dados clínicos associados aos exames parasitológicos. O diagnóstico foi considerado positivo, quando observado formas amastigotas no esfregaço em lâmina de microscopia de aspirados de medula óssea, linfonodos ou de raspado de pele em animais que apresentavam lesão, ou formas promastigotas após cultivo em meio de cultura NNN (Novy-MacNeal-Nicol) enriquecido com Schneider's Insect®, contendo amostras de aspirado de medula e linfonodo.

| Escore       | N. Cães | Parasitológico |       | Parasit. Medula/ Lâmina | Parasit. Medula/ Cultura | Parasit. Linfonodo/ Lâmina | Parasit. Linfonodo/ Cultura | Parasit. pele/ Lâmina |
|--------------|---------|----------------|-------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
|              |         | Nº             | %     |                         |                          |                            |                             |                       |
| 0            | 39      | 02             | 5,12  | 00                      | 00                       | 01                         | 01                          |                       |
| 1            | 66      | 16             | 24,24 | 03                      | 06                       | 04                         | 12                          |                       |
| 2            | 42      | 12             | 28,57 | 01                      | 08                       | 04                         | 10                          |                       |
| 3            | 51      | 10             | 19,6  | 00                      | 02                       | 03                         | 06                          | 03                    |
| 4            | 36      | 13             | 36,11 | 01                      | 03                       | 05                         | 11                          | 01                    |
| 5            | 21      | 07             | 33,33 | 01                      | 05                       | 04                         | 05                          | 04                    |
| 6            | 15      | 06             | 40    | 02                      | 02                       | 05                         | 06                          | 01                    |
| 7            | 22      | 06             | 27,27 | 03                      | 05                       | 05                         | 06                          | 02                    |
| 8            | 08      | 05             | 62,5  | 01                      | 03                       | 03                         | 03                          | 01                    |
| 9            | 14      | 06             | 42,86 | 02                      | 02                       | 04                         | 02                          | 01                    |
| 10           | 9       | 04             | 44,44 | 00                      | 02                       | 03                         | 02                          |                       |
| 11           | 5       | 03             | 60    | 00                      | 01                       | 01                         | 03                          |                       |
| 12           | 1       | 01             | 1     | 00                      | 01                       | 00                         | 01                          |                       |
| <b>TOTAL</b> | 329     | 91             |       | 14                      | 40                       | 42                         | 68                          | 13                    |

**Tabela 1:** Avaliação dos Exames Parasitológicos: Esfregaço de Lâmina frente ao Cultivo em Cultura NNN (Novy-MacNeal- Nicoll) enriquecido com Schneider's Insect®.

Dos animais infectados, as manifestações clínicas mais frequentes foram lesões de pele e linfadenopatia. Esses resultados concordam com relatos de outros autores, que consideram animais com estes sintomas como maior potencial de fonte de infecção para o flebótomo, pois além da existência do parasitismo disseminado em vários órgãos, também possui alta carga parasitaria na pele (COSTA-VAL et al., 2007; QUEIROZ et. al., 2010).

Ao comparar a positividade obtida utilizando diferentes métodos e fontes de coleta de material, observou-se que o parasitismo no linfonodo poplíteo teve uma maior ocorrência tanto no esfregaço de lâmina como na cultura. Estes achados evidenciam que o linfonodo é um órgão importante no diagnóstico da LVC sugerindo que o mesmo possa ser tomado como parâmetro para estimar a capacidade de transmissão de leishmania para o vetor (REIS et al., 2006). Em alguns

estudos, pele e medula são os principais sítios de uma alta densidade parasitaria durante a evolução da LVC (REIS et al., 2009), o que difere dos resultados apresentados neste trabalho, pois estes órgãos não foram os mais parasitados.

## CONCLUSÃO

Com este estudo podemos concluir que os sinais clínicos mais frequentes na leishmaniose visceral canina são aumento de linfonodos e que este órgão é onde encontramos uma maior positividade tanto no exame direto quanto na cultura, o que pode indicar que este deva ser o órgão de escolha para a pesquisa *Leishmania* em cães.

Animais que apresentam lesões de pele devem ser submetidos a pesquisa de *Leishmania* pois verificamos que sempre que havia lesão de pele sugestiva, foram encontrados o parasita.

Os isolados obtidos foram extraídos DNA e a PCR convencional utilizada foi capaz de amplificar com sucesso os mesmos.

A análise genética das cepas está em fase de conclusão.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COSTA-VAL, A.P., CAVALCANTI, R.R., GONTIJO, N. F., MICHALICK, M.S., ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P., MELO, M.N., Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Vet. J.** vol.174, p.636-43; 2007.
- LAURENT, T., RIJAL, S., YARDLEY, V., CROFT, S., DE DONCKER, S., DECUYPERE, S., KHANAL, B., SINGH, R., SCHONIAN, G., KUHLS, K., CHAPPUIS, F., DUJARDIN, J. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: Genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. **Inf. Gen. Evol.**, vo. 7, p. 206-212, 2007.
- MANNA L., REALE S.; VITALE F.; GRAVINO A. E.; Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations; **Res. Vet. Science**; vol. 87; p. 76-78; 2009.
- QUEIROZ N.M.G.P; ASSIS J.; OLIVEIRA T. M.F.S; MACHADO R.Z.; NUNES C. M.; STARKE-BUZETTI W.A.; Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste; **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 1, p. 32-38; 2010.
- REIS, A.B., MARTINS-FILHO, O.A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., CARVALHO, M.G., MAYRINK, W., FRANÇA-SILVA, J.C., GIUNCHETTI, R.C., GENARO, O., CORRÊA-OLIVEIRA, R., Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.**, vol. 81, p. 68–75; 2006
- REIS, A.B., MARTINS-FILHO, TEIXEIRA-CARVALHO, GIUNCHETTI, R.C., CARNEIRO, C.M., MAYRINK, W., TAFURI, W.L., CORRÊA-OLIVEIRA, R., Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immun. Immunopathol.** v.128, p.87-95; 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniases report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases**. Geneva, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>.