

DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, PELO MÉTODO DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) – REVISÃO DE LITERATURA

DIAGNOSIS OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS, THE METHOD FOR POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) – REVIEW

¹SIMONETTI, F.; ²COSTA, I. B.; ³BOZZO, M. C.

¹Docente do Curso de Medicina Veterinária – Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

²Discente do Curso de Medicina Veterinária – Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

³Técnica responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Veterinário das FIO/FEMM

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença provocada por protozoários sendo bastante freqüente em cães, sendo causada pela *Leishmania* spp. Este parasita transmitido pelo mosquito palha (*Lutzomyia longipalpis*), produz manifestações viscerais ou cutâneas. Os animais apresentam anorexia, perda de peso, linfadenopatia e dermatite ulcerativa. O diagnóstico é feito por meio de citologia, histopatologia, testes imunológicos (ELISA) ou através dos métodos moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR). Os organismos são encontrados no DNA do paciente acometido. A sorologia e a cultura tecidual são consideradas diagnósticos adicionais. Pode haver a presença de anemia normocrômica normocítica de leve a moderada. Esta doença é uma zoonose e os cães infectados servem como reservatório para a infecção humana. O objetivo do presente trabalho é de conscientizar a importância dessa zoonose e a vantagem de diagnóstico do PCR.

Palavras-chave: Zoonose, *Leishmania* spp., cão.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa is very common in dogs, caused by *Leishmania* spp. This parasite transmitted by mosquito straw (*Lutzomyia longipalpis*) produces visceral or cutaneous manifestations. The animals show anorexia, weight loss, lymphadenopathy and ulcerative dermatitis. The diagnosis is made by cytology, histopathology, immunoassays (ELISA) or by molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR). The organisms are found in the affected patient's DNA. The serology and tissue culture are considered additional diagnoses. There may be a normochromic normocytic anemia of mild to moderate. This disease is a zoonosis and infected dogs serve as a reservoir for human infection. The objective of this study is to realize the importance of this zoonosis and the advantage of diagnostic PCR.

Keywords: Zoonosis, *Leishmania* spp., dog.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC), no Brasil, coexiste com a doença humana em todos os focos conhecidos sendo, porém, prevalente e, regras gerais, precedendo à ocorrência de doença humana. (ESTALIANON, 2000).

Os cães infectados pela *Leishmania chagasi*, à semelhança do calazar canino do Mediterrâneo, apresentam um bem conhecido espectro de características clínicas

que podem variar de aparente estado sadio ao severo estágio final. Classicamente, na LVC, tanto natural como experimentalmente induzida, se admite um período de incubação e prepatente de 3 a 6 meses até vários anos. Esta, invariavelmente, evolui para o estado latente ou patente que, por sua vez, em períodos variáveis de semanas, meses ou anos, podem evoluir para as formas: aguda, subaguda, crônica ou regressiva. De modo geral, o quadro clínico se assemelha à doença humana, com febre irregular de longo curso, palidez de mucosas e um emagrecimento progressivo, até o estado de caquexia intensa, na fase terminal. A hipertrofia do sistema fagocitário mononuclear (SFM), levando a esplenomegalia, hepatomegalia e adenopatia generalizada, é bastante frequente, porém pouco referida. No entanto, os sinais mais evidentes estão relacionados às alterações cutâneas e de fâneros: perda de pelos, que é bastante frequente, podendo ser focal ou generalizada; pequenas ulcerações crostosas, isoladas ou confluentes, observadas no focinho, orelhas e extremidades; descamação ou dermatite furfuráceas, que acompanham a depilação; alongamento das unhas (grifose); opacificação da córnea (queratite intersticial), após a conjuntivite purulenta; além de outros sinais como apatia, diarreia, hemorragia intestinal, paresia do trem posterior, edema e vômitos. (ESTALIANON, 2000).

Os aspectos clínicos são semelhantes às que ocorrem no homem. A anemia do tipo normocrômico é frequente (62% dos casos), leucopenia moderada menos frequente (33%) e trombocitopenia mais rara, porém associada aos fenômenos hemorrágicos. (ESTALIANON, 2000).

Do ponto de vista epidemiológico, a doença canina é considerada mais importante que a doença humana, pois, além de ser mais prevalente, apresenta grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitos no derma. Estes assim, como os cães doentes, representam melhor fonte de infecção para o inseto vetor, a *Lutzomya longipalpis*, que o homem doente. No entanto, esse mesmo fato possibilitaria a infecção intercanina, sem a participação do flebótomo, através de mordedura, durante brigas, do coito e provavelmente também, pela ingestão de carrapatos que sugaram sangue de cães doentes. (ESTALIANON, 2000).

Além do homem e do cão, outros canídeos como as raposas *Lycalopex vetulus*, no Ceará, e *Cerdocyon thous*, no Pará, são incriminadas como hospedeiros silvestres da leishmania visceral. (ESTALIANON, 2000).

O diagnóstico de leishmaniose é dificultado devido à variedade de sinais clínicos, achados histopatológicos inespecíficos e também ao fato das lesões microscópicas observadas poderem ser comuns a outras doenças e alterações imunomediadas. (ESTALIANON, 2000).

O diagnóstico se divide em três categorias principais: diagnóstico parasitológico, diagnóstico imunológico e diagnóstico por métodos moleculares de reação em cadeia pela polimerase (PCR). (ESTALIANON, 2000).

O presente trabalho, tem por objetivo principal, conscientizar a população da importância dessa zoonose e as vantagens do método de diagnóstico de reação em cadeia pela polimerase.

REVISÃO DE LITERATURA

A Leishmaniose é uma doença de extremo interesse em Saúde Pública tendo como agente etiológico o protozoário *Leishmania chagasi*, parasita que infecta numerosos mamíferos, incluindo o homem. São transmitidas pela picada de flebotomíneos e dentre as 15 espécies de *Leishmania* que infectam o homem, 13 tem natureza zoonótica causando a forma visceral, cutânea ou mucocutânea. (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

Cães são considerados os principais reservatórios domésticos, sendo monitorados por meio de inquéritos sorológicos, preconizados pelo Ministério da Saúde (MS), que visa à eliminação dos animais sororretores. (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No Brasil, sua atual distribuição abrange 19 estados da população, tendo ocorrido, nos últimos cinco anos, em média 3.500 casos humanos novos, sendo a maioria na região Nordeste. (OLIVEIRA et al., 2005).

O controle realizado pelo programa nacional consiste de inquérito sorológico canino, eutanásia dos cães portadores, diagnóstico e tratamento dos casos humanos e aplicação residual de inseticida à base de cipermetrina (125mg/m²) nas áreas de captura dos vetores. Tais medidas, por sua vez, correspondem às estratégias de controle recomendadas pela OMS. (MADEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

Entretanto, tais medidas não têm apresentado efetividade na redução da incidência da doença, determinando assim a necessidade de reavaliação das ações propostas pelo atual programa. (OLIVEIRA et al., 2005; SILVA et al., 2005).

Dessa forma, o conhecimento da história natural da LV, através de inquéritos epidemiológicos, serve de base para os programas de controle da doença. Mas, para um bom planejamento, devem ser estudadas informações quantitativas básicas sobre a prevalência e a incidência desta doença através de exames laboratoriais. (FRANÇA-SILVA et al., 2003).

Dentre as provas sorológicas, a imunoadsorção enzimática (ELISA), a fixação de complemento e imunofluorescência indireta (IFI) são as mais empregadas, sendo este último considerado padrão pela OMS, além de ser o teste de escolha para inquéritos populacionais. (FEITOSA et al., 2000; GONTIJO; MELO, 2004).

Enquanto os testes sorológicos apresentam mais resultados falsos positivos por causa das reações cruzadas com outros patógenos. (BADARÓ et al., 1983; INIESTA et al., 2002), os métodos parasitológicos são mais precisos, mas também mais invasivos porque, usualmente, requerem punção de linfonodo periférico ou medula óssea.

A detecção de *Leishmania sp.* através da biópsia de pele é uma ferramenta alternativa para o diagnóstico. Entretanto, exames rotineiros, como a técnica de histoquímica em tecidos corados por hematoxilina-eosina (HE), são muitas vezes inconclusivos, outra técnica conhecida como imunoistoquímica (IMIQ) tem se mostrado mais eficaz para identificação do parasita, aumentando em 50% a positividade na pele. (FERRER et al., 1988; TAFURI et al., 2004).

Por outro lado, o diagnóstico molecular baseado na amplificação de fragmento de DNA através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido desenvolvido por diversos autores. (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; REALE et al., 1999; FISA et al., 2001; QUINNELL et al., 2001; SILVA et al., 2001; LACHAUD et al., 2002; IKONOMOPOULOS et al., 2003; MANNA et al., 2004), em função da rapidez, sensibilidade e especificidade, particularmente para a detecção de cães assintomáticos e maior custo benefício.

A combinação das técnicas sorológicas e moleculares tem auxiliado na demonstração de maior número de animais positivos para LVC em diferentes áreas endêmicas. (GRAMICCIA e GRADONI, 2005).

Rodgers, Popper e Wirth, (1990), assim como outros autores, basearam-se na amplificação de fragmento da região conservada do minicírculo de kinetoplastos (kDNA) por estes estarem presentes em 10.000-20.000 cópias e por ser a amplificação da região conservada 10 vezes mais sensível que a da região variável.

A amplificação de fragmentos de DNA de *Leishmania* pela PCR tem sido realizada a partir de diferentes tecidos bem como de aspirado de linfonodos, medula óssea e de leucócitos de sangue periférico. (IKONOMOPOULOS et al., 2003). O uso de sangue periférico apresenta a vantagem de ser um processo de fácil obtenção, menos invasivo, mas que pode resultar em menor sensibilidade do teste devido à baixa parasitemia dos animais infectados. (FISA et al., 2001).

CONCLUSÃO

A Leishmaniose é uma doença de grande importância para a saúde pública, uma vez que esta é considerada uma zoonose. É necessário que se tenha um maior controle e prevenção sobre a doença, visto que o seu aumento tem sido bastante significativo o que vem ocasionando óbitos tanto em animais quanto em humanos. Os métodos moleculares de reação em cadeia pela polimerase (PCR) vêm contribuindo gradativamente para haver um melhor diagnóstico definitivo da doença, auxiliando conclusivamente na conduta à ser realizada.

REFERÊNCIAS

BADARÓ, R.; REED, S. G.; CARVALHO, E. M. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Boston, v. 32, n. 3, p. 480-84, 1983.

ESTALIANON, L.A. Leishmaniose Visceral Canina. **Monografia apresentada ao Curso de Especialização “Latu Sentu” em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais**. Arapongás, p. 68, 2000.

FEITOSA, M.M. IKEDA, F. A., LUVIZOTTO, M. C. R., PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose no Município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.28, p.36-44, 2000.

FERRER, L.; RABANAL, R. M.; DOMINGO, M. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research Veterinary Science**, Barcelona, v. 44, n. 2, p. 194-196, 1988.

- FISA, R.; RIEIRA, C.; GÁLLEGO, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, Barcelona, v. 99, n. 2, p. 105-111, 2001.
- FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; DA-COSTA, J.C.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology** 111: 161-173, 2003.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.3, p.338-349, 2004.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, Roma, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005.
- IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOULIS, V.G. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, Atenas, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.
- INIESTA, L.; BARREDO, S.F.; BULLE, B.; GÓMEZ, M.T.; PIARROUX, R.; GÁLLEGO, M.; ALUNDA, J.M.; PORTÚS, M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Barcelona, v. 9, n. 5, p. 1137-1141, 2002.
- LACHAUD, L.; MARGCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DREREURE, J.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Nimes, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.
- MADEIRA, M.F. et al. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for Leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Society of Infectious Diseases**, Salvador, v.8, p.440-444, 2004.
- MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R.D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A.E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Napoli v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE.; **Leishmaniose Visceral Grave – Normas e Condutas**. Brasília – DF: Editora MS,2006. 59p.
- OLIVEIRA, L.S.; JULIÃO, F.S.; SOUZA, V.M.N; FREITAS, D.S; SOUZA, B.M.P.S; PAULE, B.J.A.; AGUIAR, P.H.P.; MELO, S.M.B; FRANKE, C.R. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina

e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.6, n.1, p.41-47, 2005.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, Belém v. 122, n. 3, p. 253- 261, 2001.

REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLOSRIOSOS, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, Palermo, v. 37, n. 9,p. 2931- 2935, 1999.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, Boston, v.71, n.3, p. 267-275, 1990.

SILVA, A.V.M.; PAULA, A.A.; CABRERA, M.A.A; CARREIRA, J.C.A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.1, p.324-328, 2005.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PIRMEZ, C.; FERNANDÉS, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Higiene**, Boston, v.65, n.6, p.896-898, 2001.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, Belo Horizonte, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.