



## Comunicação/Communication

### *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso

*Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso

Nely Pinheiro Souza<sup>1</sup>, Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida<sup>2</sup>, Tatiana Pádua Tavares de Freitas<sup>1</sup>, Regina Celia Rodrigues da Paz<sup>1</sup>, Valéria Dutra<sup>1</sup>, Luciano Nakazato<sup>1</sup> e Valéria Régia Franco Sousa<sup>1</sup>

#### RESUMO

**Introdução:** Leishmaniose visceral é uma zoonose que acomete diversos mamíferos tendo os canídeos domésticos como principais reservatórios em ambiente urbano. A presente nota descreve a infecção de canídeos silvestres por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* mantidos em cativeiro no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Métodos:** De seis raposas (*Cerdocyon thous*) e um cachorro vinagre (*Speotus venaticus*), foram coletadas amostras de pele, medula óssea e linfonodo para detecção e caracterização de *Leishmania* sp pela técnica de PCR-RFLP. **Resultados:** Todos os animais pesquisados apresentaram-se positivos para *Leishmania (L.) infantum chagasi*. **Conclusões:** Destaca-se a importância de monitoramento adequado dos mesmos, além do maior controle desta enfermidade já que estes animais estão em ambientes de recreação pública.

**Palavras-chaves:** *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Mamíferos silvestres. Mato Grosso.

#### ABSTRACT

**Introduction:** Visceral leishmaniasis is a zoonosis that affects many mammals, and domestic canids are the main reservoirs in urban environments. This note describes infection by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* among wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso, Brazil. **Methods:** Skin, bone marrow and lymph node samples were collected from six crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and one bush dog (*Speotus venaticus*), in order to detect and characterize *Leishmania* using the PCR-RFLP technique. **Results:** All the animals studied were positive for *Leishmania (L.) infantum chagasi*. **Conclusions:** This study highlights the importance of adequate monitoring of these animals, as well as greater control of this disease, given that these animals are in a public recreation environment.

**Key-words:** *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Wild mammals. Mato Grosso.

Leishmaniose visceral é uma zoonose em crescente expansão no Brasil, causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, tendo o cão como principal reservatório em ambiente urbano<sup>1</sup>, mantendo o ciclo de transmissão nesses locais. Esta enfermidade é transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*<sup>2</sup>.

Diversos mamíferos podem se infectar por *Leishmania* sp<sup>3</sup>; entretanto, não são usualmente responsáveis pela transmissão ao homem<sup>4</sup>. No Brasil, dos canídeos silvestres, somente a raposa (*Cerdocyon thous*) é considerada reservatório natural da leishmaniose visceral<sup>5</sup>. Todavia, diversas espécies já foram relatadas com infecção, como lobo guará (*Chysocyon brachyurus*)<sup>6</sup>, raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e cachorro-vinagre (*Speotus venaticus*)<sup>7</sup>, além de outros mamíferos como o marsupial *Didelphis albiventris* e *D. marsupialis*<sup>8</sup>.

Nesta comunicação, descreve-se a infecção de canídeos silvestres, *Cerdocyon thous* e *Speotus venaticus* por *Leishmania (L.) i. chagasi* mantidos em zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso, Estado de Mato Grosso, Brasil.

Na pesquisa, avaliou-se a ocorrência de leishmaniose em seis raposas, sendo dois machos e quatro fêmeas, adultos e um cachorro vinagre, fêmea, adulta, oriundos do zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso, sendo o estudo aprovado pelo sistema SISBIO/IBAMA nº. 11064-1. Dos animais coletados, uma raposa fêmea apresentava alterações clínicas compatíveis com leishmaniose visceral como dermatite furfurácea, uveíte, onicogribose, emagrecimento, hepatoesplenomegalia e o cachorro vinagre apresentava alopecia nos membros, região da face e periocular, onicogribose e conjuntivite.

Para a análise da infecção por *Leishmania* sp, procedeu-se a coleta de pele, aspirado de medula óssea e linfonodo poplíteo. Após contenção física com puçá e imobilização química, utilizando-se o fármaco tiletamina-zolazepan na dose de 6mg/kg, os fragmentos cutâneos foram obtidos da orelha através de biópsia incisional, após prévia assepsia local. As amostras de medula óssea das raposas foram obtidas do processo xifóide do esterno. Do cachorro-vinagre, a amostra foi obtida da crista ilíaca. Os aspirados ganglionares foram obtidos dos linfonodos poplíteos. As amostras coletadas foram acondicionadas em microtubos sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do HOVET-UFMT, sendo mantidas a -20°C, até o processamento.

1. Departamento de Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT. 2. Doutoranda em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ.

**Endereço para correspondência:** Prof<sup>a</sup> Valéria Régia Franco Sousa. Dept<sup>o</sup> de Clínica Médica Veterinária/FAMEV/UFMT. Av. Fernando Correa s/n. Boa Esperança, 78060-900 Cuiabá, MT.

Telefax: 55 65 3615-8664

e-mail: regia@ufmt.br

Recebido para publicação em 27/10/2009

Aceito em 18/01/2010

Para extração de DNA, as amostras foram processadas de acordo com Andrade e cols<sup>9</sup>. Sucintamente, as amostras foram colocadas em tampão de lise contendo 10mM Tris-HCl, pH 8.0; 25mM EDTA; 100mM NaCl; 0.5% SDS e 100µg/ml de proteinase K, e incubadas a 56°C, até completa lise celular. Os aspirados de medula óssea, linfonodo e fragmento de pele foram incubados por cerca de 12-18 horas. A seguir, utilizou-se o método fenol-clorofórmio e precipitação por isopropanol. Após lavagem com etanol 70%, por 10 minutos, a 10,000g, o DNA foi ressuscitado em água ultrapura. A qualidade e integridade do DNA foram observadas em gel de agarose.

A reação em cadeia pela polimerase foi realizada utilizando os primers 150 (sense) 5'-GGG(G/T)AGGGGCGTCT(C/G)CGAA-3' e 152 (antissense) 5' (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3' que amplificam um fragmento de 120pb de uma região conservada do minicírculo kDNA de todas as espécies de *Leishmania*<sup>10</sup>. O produto de amplificação foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e analisado em transluminador (UV-300nm).

*Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) mDNA foi realizado de acordo com Andrade e cols<sup>9</sup>. Cinco microlitros do produto da amplificação foram digeridos por 1U da enzima HaeIII, durante 3 horas a 37°C. Fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 10% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos obtidos foram comparados com as cepas padrão de *L. (L.) i. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), provenientes do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

As amostras de medula óssea, linfonodo e fragmentos cutâneos das seis raposas e do cachorro-vinagre foram positivas para a presença de DNA e *Leishmania* sp, sendo caracterizadas como sendo *L. (L.) i. chagasi* pela técnica de PCR-RFLP (Figura 1).

Com o processo de urbanização da leishmaniose visceral, o cão detém maior importância como reservatório do parasita. No entanto, as raposas (*Cerdocyon thous*) atuam como reservatório primário do agente no ciclo enzoótico rural<sup>5</sup>. Como nos canídeos domésticos, esses animais frequentemente apresentam-se assintomáticos, enquadrando-o mais perfeitamente nas características esperadas para um reservatório<sup>11</sup>. Neste estudo, apenas um exemplar da espécie *Cerdocyon thous* apresentou-se sintomático<sup>12</sup> com dermatite furfurácea, emagrecimento progressivo, onicogribose, uveíte e hepato-esplenomegalia. Segundo Molina e cols<sup>13</sup>, a importância dos canídeos no ciclo de transmissão da leishmaniose advém da alta carga parasitária apresentada na pele, sendo importante fonte de infecção para o vetor. Apesar da não quantificação parasitária, na pele dos animais, todos os fragmentos cutâneos, obtidos de pele íntegra, apresentaram-se com DNA de *L. (L.) i. chagasi* realçando a importância deles na cadeia epidemiológica.

De acordo com Courtenay e cols<sup>14</sup>, a infectividade das raposas ao vetor é menor quando comparado com os canídeos domésticos. Entretanto, a circulação descontrolada desses animais, entre zoológicos, promove a disseminação e introdução do agente para áreas não endêmicas<sup>7</sup>. A procedência das raposas analisadas neste estudo é desconhecida, o que dificultou estabelecer a origem da infecção nos mesmos. Porém, o relato da estadia dos animais há mais de três anos no zoológico, somando-se ao ambiente do confinamento propício para manutenção do vetor<sup>4</sup> e a região ser endêmica para a doença, com ocorrência de casos caninos domésticos, em áreas ao redor do zoológico<sup>15</sup>, cogita a hipótese de infecção no referido ambiente.

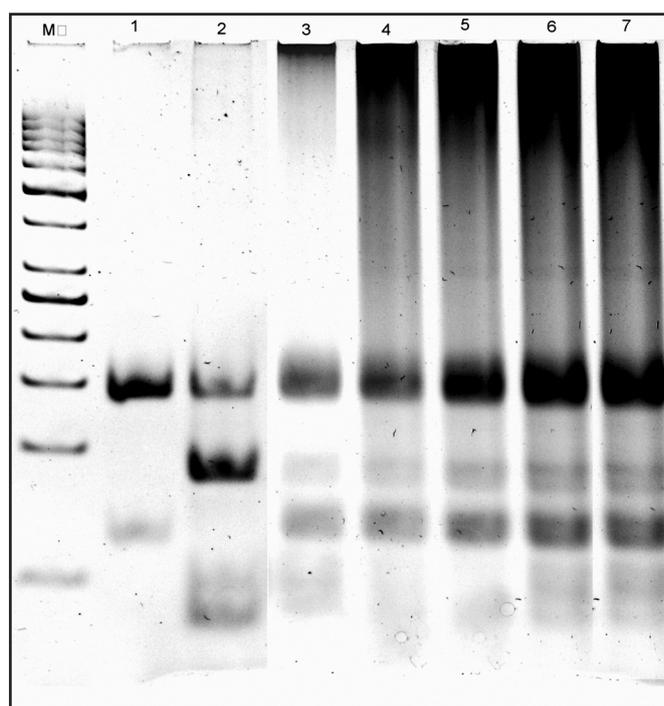


FIGURA 1 - RFLP (*Restriction fragment length polymorphisms*) de 120pb da amplificação de kDNA de *Leishmania* obtido com enzima de restrição Hae III e analisado em gel de poliacrilamida a 10% corado com brometo de etídeo. Linhas: M. marcador molecular de 50pb; 1. *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/74/PP75); 2. *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 3 a 7- amplificação de DNA de amostra de pele de quatro raposas e um cachorro-vinagre, respectivamente.

Recentemente, diagnosticou-se infecção por *L. (L.) i. chagasi* em cachorro-vinagre de zoológico do Rio de Janeiro, proveniente do Estado de Mato Grosso<sup>7</sup>. Diferente do cachorro-vinagre, relatado no trabalho supracitado, o animal estudado apresentava sinais clínicos compatíveis com a doença como onicogribose, alopecia difusa, emagrecimento progressivo e hepato-esplenomegalia, sendo este proveniente de Barão de Melgaço, município situado no Pantanal Matogrossense, onde habitava em ambiente peridomiciliar juntamente com cães, sendo encaminhado há cerca de dois meses para o zoológico da UFMT.

A caracterização da espécie, nas amostras obtidas, como sendo *L. (L.) i. chagasi*, confirmou o *Cerdocyon thous* como reservatório primário da leishmaniose visceral no Brasil<sup>5</sup>. A detecção da infecção de cachorros-vinagre por *L. (L.) chagasi* é recente<sup>4,7</sup>, não se sabendo ainda a importância dos mesmos no ciclo de transmissão.

O encontro de canídeos, confinados em zoológicos do Brasil, com infecção por *L. (L.) chagasi*, denota a relevância de novos estudos com estes animais, alguns deles ameaçados de extinção como o cachorro-vinagre, visa conhecer o papel dos mesmos na epidemiologia dessa zoonose e promove o monitoramento adequado dos mesmos, além do maior controle desta enfermidade, já que estes animais estão em ambientes de recreação pública.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

## SUPOORTE FINANCEIRO

FAPEMAT, CNPq-DECIT.

## REFERÊNCIAS

1. Palatnik-De-Sousa CB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Reis AB, Palatnik M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:510-517.
2. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998; 12:315-317.
3. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; 149:139-146.
4. Luppi MM, Malta MCC, Silva TMA, Silva FL, Motta ROC, Miranda I, et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 155:146-151.
5. Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91:671-683.
6. Curi NHA, Miranda I, Talamoni SA. Serologic evidence of leishmania infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian national park. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:99-101.
7. Figueiredo FB, Gremião ID, Pereira SA, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar DA, et al. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102:200-201.
8. Travi BL, Osório Y, Guarín N, Cadena H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Clinical and Parasitological Observations in Experimentally Infected *Didelphis marsupialis*, Reservoir of New World Visceral Leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1998; 88:73-75.
9. Andrade HM, Reis AB, Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol* 2006; 140:231-238.
10. Degraive W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes UG. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89:463-469.
11. Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 1996; 14:523-532.
12. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82:566-567.
13. Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonize *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 491-493.
14. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitol* 2002; 125: 407-414.
15. Almeida ABPF, Faria RP, Pimentel MFA, Dahroug MAA, Turbino NCMR, Sousa VRE. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:156-159.