

UTILIZAÇÃO DOS EXAMES PARASITOLÓGICOS, HISTOPATOLÓGICOS E SOROLÓGICOS (ELISA E RIFI) PARA AVALIAÇÃO DA PELE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL EM ILHA SOLTEIRA-SP.

Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz, Wilma Aparecida Starke Buzetti, Rita de Cássia Viveiros da Silveira. – Parasitologia - Ciências Biológicas - Departamento de Biologia e Zootecnia – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Campus de Ilha Solteira.

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é causada pela *Leishmania chagasi* e transmitida através da picada de um psicodídeo, a *Lutzomyia longipalpis* (BRASIL, 1996; OMS, 1990). Esta doença caracteriza-se por um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas que afetam tanto humanos como animais domésticos e silvestres (WHO, *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, 2002). Os cães são considerados importantes reservatórios para a manutenção da população de parasitas que podem levar à leishmaniose visceral em humanos e estes podem sofrer significativa morbidade e mortalidade.

Os dados da Fundação Nacional de Saúde, para o período de 1984 a 1997, mostraram que a doença ocorre em todas as regiões brasileiras, exceção à Região Sul, sendo que a ocorrência no Nordeste é a mais significativa. O percentual de positividade de cães nos municípios com transmissão de leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo cresceu consideravelmente entre os anos de 1998 e 2004 (Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” da Secretaria do Estado de São Paulo, 2000). Em Ilha Solteira-SP, no ano de 2003, foram investigados 445 cães suspeitos de LVC, dos quais 0,67% (03) estavam infectados pela *Leishmania*; em 2004, das 453 amostras analisadas cerca de 4,85% (22) foram positivas; e as análises realizadas apenas nos meses de janeiro, fevereiro e março de 2005 em 1398 cães demonstraram que 5,86% (82) eram positivos e com sinais clínicos evidentes de Leishmaniose (QUEIROZ et al., 2005). Estes dados demonstram a importância e a relevância de medidas sanitárias e de controle desta doença, além da necessidade de buscar medidas de diagnóstico mais seguras, sensíveis e rápidas para avaliar, auxiliar e confirmar diagnósticos e estabelecer protocolos com potencial epidemiológico e clínico que auxiliem na prevenção ou na cura desta enfermidade.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo comparar o método parasitológico através da visualização microscópica direta das formas amastigotas na pele de cães e a histopatologia das lesões com os exames sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste imunoenzimático indireto (ELISA) de cães eutanaziados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira.

Para a realização deste trabalho, 34 cães foram eutanaziados com dose letal (1 ml/kg, intravenosamente) de uma solução de thiopental a 33%, após estarem anestesiados com xylasina (1ml/kg), pelo CCZ de Ilha Solteira e utilizados para a obtenção das amostras de sangue e pele. Estes animais, de acordo com os sinais clínicos, foram separados em três grupos: assintomáticos, oligossintomáticos (pelo menos três sinais clínicos característicos) e sintomáticos (acima de três sinais clínicos). O sangue foi utilizado para a obtenção do soro que foi mantido congelado em freezer -20°C até o uso. Em seguida, as amostras dos soros destes cães foram encaminhadas ao Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP - Campus de Jaboticabal, para realização dos exames sorológicos RIFI e ELISA conforme a técnica utilizada pelo Centro de pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, de Belo Horizonte - MG e a técnica descrita por MACHADO et. al (1997).

Para a realização dos exames parasitológicos e histopatológicos, seções teciduais de pele foram coletadas e fixadas ou em uma solução neutra tamponada de formol a 10% ou em uma solução de Bouin, por 12 horas. Em seguida estes tecidos foram lavados 3 vezes em álcool 70° e finalmente deixados nesta solução até o preparo dos blocos de parafina e das lâminas onde os tecidos foram cortados em micrótomo em cortes de 5 µm de espessura. Após a confecção das lâminas todos os tecidos foram hidratados em xilol/álcool e corados pela hematoxilina/eosina (H&E). As lâminas contendo os tecidos corados pela H&E foram avaliadas quanto ao grau do parasitismo (+ a ++++) e pela histopatologia. Todo o tecido era inicialmente analisado sob a objetiva de 20x e em seguida era mudado para as de 40x e 100x para uma identificação mais minuciosa das lesões e das formas

amastigotas dos parasitas presentes. Para avaliação do grau parasitário adotou-se o seguinte procedimento: tecido negativo quando na ausência de amastigotas (-); tecido suspeito (+) quando havia evidência da presença de amastigotas, mas estas se encontravam em número reduzido dentro dos macrófagos esparsamente localizados pelo tecido ou quando a coloração do tecido não permitia a visualização clara dos parasitas; tecido fracamente positivo (++) quando alguns macrófagos estavam infectados e repletos de parasitas em seu interior, mas localizados apenas em algumas áreas; tecido moderadamente positivo (+++) quando cerca de 50% do tecido estava comprometido com macrófagos infectados; e fortemente positivo (++++) quando a secção tecidual analisada encontrava-se quase que completamente comprometida tanto pelas lesões, quanto pela presença dos macrófagos parasitados.

Pela avaliação histopatológica geral dos animais, observou-se a presença maciça de amastigotas dentro de macrófagos ou livres pelo tecido. Em alguns casos, os parasitas encontravam-se na epiderme, derme, hipoderme e entre as fibras musculares. Mas na maioria, as células infectadas encontravam-se logo abaixo da epiderme próximas de vasos sanguíneos, dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas. Quando havia lesão, esta na maioria das vezes, era de caráter crônico, com infiltrado predominante de macrófagos, plasmócitos e linfócitos, principalmente ao redor dos folículos e glândulas anexas, com discreta vascularização e edema na derme. Em alguns casos houve a invasão de neutrófilos e muitos eosinófilos, intenso desarranjo das fibras conjuntivas, edema, dilatação dos vasos sanguíneos, hemorragias e necrose com destruição da epiderme.

Os animais assintomáticos (8 cães) raramente apresentavam lesões de pele, mas mesmo assim, o exame parasitológico das peles aparentemente sadias destes animais demonstrou que 4 (50%) estavam negativos e 4 infectados com graus variando de + (12%), ++ (25%) a ++++ (12%). No tecido cutâneo do cão altamente parasitado (++++), foi verificado numerosos macrófagos totalmente repletos de amastigotas. Estas células estavam presentes por todas as camadas da derme, ao redor dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas, entre as fibras musculares e também na hipoderme, incluindo as células epiteliais da epiderme. Um cão, como o descrito acima, ou seja, sem sinais clínicos da doença, mas com a pele repleta de parasitas, pode representar um grande risco para o meio ambiente, como um potencial reservatório para contaminação dos vetores, de outros cães e mesmo do homem. Entre os 17 cães do grupo dos oligossintomáticos, 2 (12%) eram negativos e 15 infectados com graus de + (29%), ++ (35%), +++ (12%) a ++++ (12%). Nos sintomáticos (9 cães), nenhum estava negativo e a positividade variou de + (22%), +++ (11%) a ++++ (67%). A figura 1 mostra a comparação dos graus de parasitismo onde se observa que os animais assintomáticos destacaram-se entre os negativos; os oligossintomáticos apresentaram a maior parte dos animais com +, ++ e +++; e os sintomáticos tiveram a predominância entre os altamente parasitados (++++).

A presença do parasita *Leishmania* foi observada em 92% das peles com lesão e somente 40% dos tecidos sem lesão aparente (Figura 2). No geral, num mesmo animal, as chances de se encontrar os parasitas foram maiores nas peles lesionadas do que nas íntegras, mas isto não significa que as peles íntegras não representem também grande potencial de infecção e podem participar da cadeia epidemiológica da doença.

Os exames sorológicos (RIFI e ELISA) revelaram que 38% dos cães assintomáticos, 82% dos oligossintomáticos e 88% dos sintomáticos encontravam-se positivos para Leishmaniose. No geral, quando o ELISA apresentava níveis altos (NE = 5 a 6) o RIFI também acompanhava com títulos de anticorpos também altos (1/1.280). Além disso, de 75% a 83% dos tecidos com grau parasitário +++ a ++++ pertenciam aos animais com títulos de anticorpos altos, o que significa que a resposta humoral, com alta produção de anticorpos, não protegeu os animais desta infecção parasitária. Estes altos títulos de anticorpos foram, portanto detectados nos animais já altamente parasitados e com falência dos órgãos linfóides de defesa. Através do exame parasitológico foi possível detectar maior número de animais positivos do que pelos exames sorológicos (Figura 3), sendo que em 9% dos casos analisados não houve concordância nos resultados em pelo menos um dos métodos.

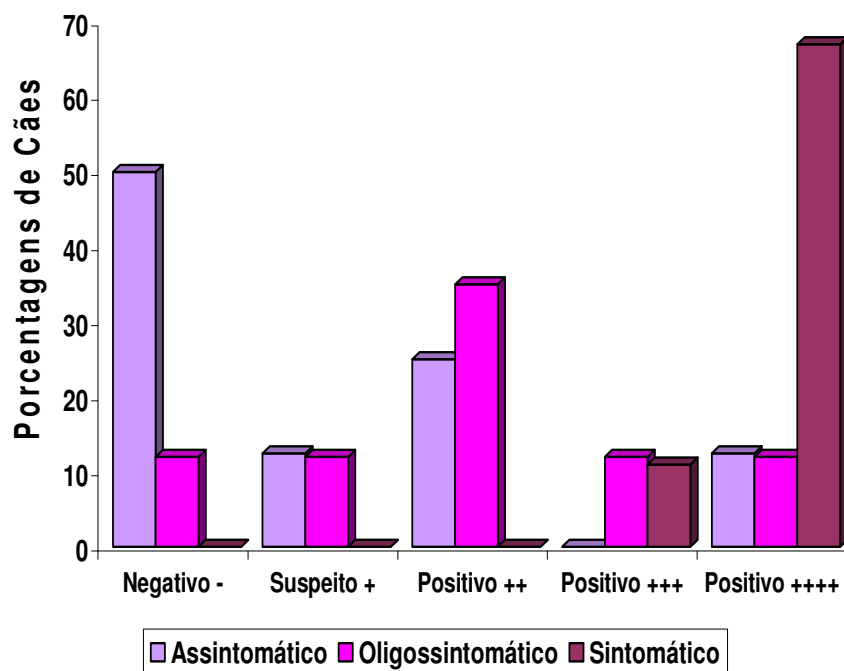


Figura 1. Porcentagens de cães avaliados de acordo com o grau de infecção parasitária (-, +, ++, +++, +++) pela presença de formas amastigotas de *Leishmania* em peles de cães.

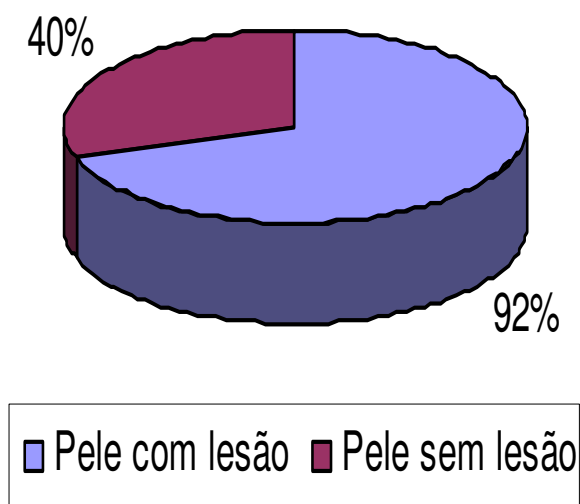


Figura 2. Porcentagens de peles de cães com e sem lesões aparentes consideradas positivas pela presença de macrófagos contendo formas amastigotas de *Leishmania*.

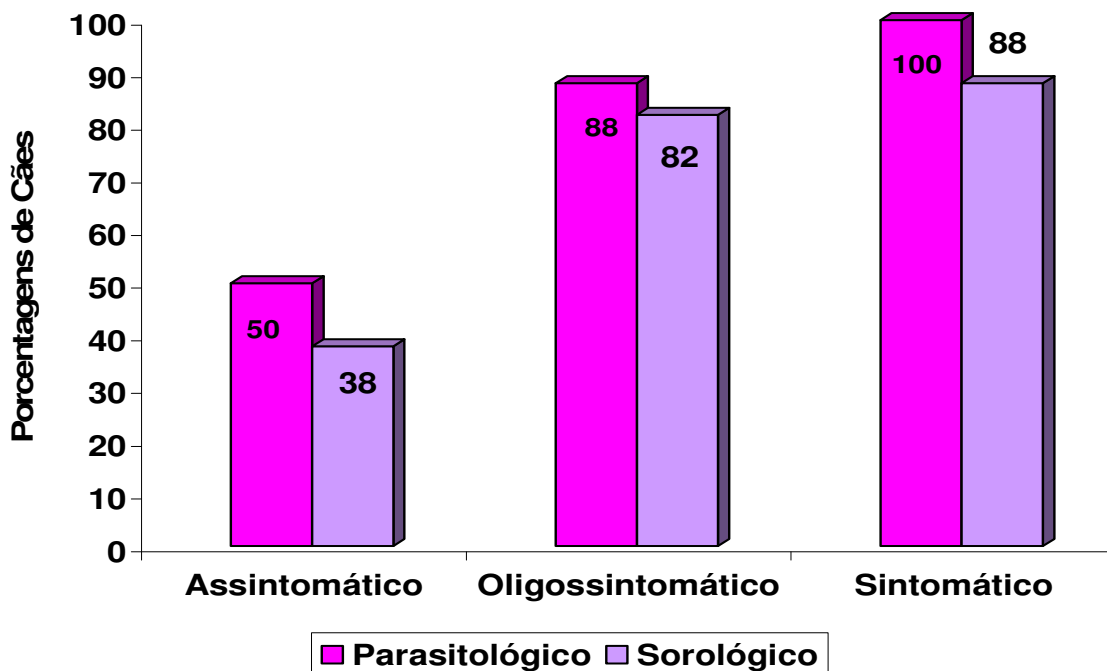


Figura 3. Percentagens de cães positivos para leishmaniose de acordo com os sinais clínicos dentro dos grupos assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, avaliados pelos exames parasitológicos e pelos sorológicos (ELISA e RIFI).

A pele dos cães pertencentes a todas as categorias estudadas (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos), independente do grau parasitário, representa um risco muito grande pela manutenção do parasita e pelo potencial de infecção dos vetores. Desta forma conclui-se que este órgão deve ser mais explorado para fins de diagnóstico, utilizando-se além dos métodos sorológicos (ELISA e RIFI), parasitológicos e histopatológicos, também outros como o imunoistoquímico e o molecular.

Referências Bibliográficas

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar): Normas técnicas. Brasília, 1996.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA "PROF. ALEXANDRE VRANJAC", SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS, INSTITUTO ADOLFO LUTZ, COORDENAÇÃO DO PROGRAMA ESTADUAL DE DST/AIDS, INSTITUTO PASTEUR. Distribuição da *Lutzomyia longipalpis* na Região Oeste do Estado de São Paulo - Situação até 30/12/00. **Boletim LVA 06/00, 2000.** Disponível em: http://www.sucen.sp.gov.br/base_dados/texto_bolva06.htm. Acessado em: 20 abril 2005.

MACHADO, R.Z. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p.17-26, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Lucha contra las leishmaniasis. Informe de um comité de expertos de la OMS. Serie de informes técnicos 793. Ginebra, 1990.

QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Levantamento e Controle de Leishmaniose Visceral em cães de Ilha Solteira, São Paulo, Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 13, 2005, Ribeirão Preto.

SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES (TDR). Strategic Direction for Research: Leishmaniasis. Geneva, fev. 2002. Disponível em: www.who.int/tdr. Acesso em 20 jan. 2005.

Bolsa: FAPESP