

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA HEMOCULTURA, CITOLOGIA ASPIRATIVA DE LINFONODO, REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) E PCR NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CANINA EM ANIMAIS VACINADOS E NÃO VACINADOS COM LEISHMUNE®.

Carla Yumi Sasaki, Noeme Sousa Rocha, Simone Baldini Lucheis, Fábio Nogueira dos Santos, Patrícia Iohida Faccioli, Marcela Marcondes Pinto Rodrigues. – Ciências Biológicas – Medicina Veterinária - Departamento de Clínica Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu.

A leishmaniose é uma doença causada por várias espécies de *Leishmania*, acometendo principalmente o homem e o cão. É um sério problema de saúde pública no mundo, sendo endêmica em países da Europa, Ásia e América, inclusive o Brasil. De acordo com a OMS, mais de 12 milhões de pessoas em 88 países estão afetadas com a doença e cerca de 350 milhões estão em risco de contraí-la. Um crescente número de casos de leishmaniose cutânea tem sido observado no Brasil, incluindo a região noroeste do Estado de São Paulo.

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza a eutanásia dos animais positivos como medida de controle da disseminação da doença. Portanto, métodos de diagnóstico acurados são essenciais para os profissionais Médicos Veterinários, para a tomada de decisão com segurança quanto ao caso.

Os testes de diagnósticos de leishmaniose utilizados atualmente são Imunofluorescência Indireta (RIFI), ELISA, Imunofluorescência Direta (RIFD), aglutinação indireta, fixação do complemento, cultura, esfregaços obtidos por punção de linfonodo, baço e medula óssea, reação em cadeia pela polimerase (PCR), entre outros. Porém, na leishmaniose cutânea, testes tradicionais de diagnóstico como esfregaço, cultura e histopatológico não são sempre conclusivos em pacientes com diagnóstico clínico.

Os resultados obtidos de cultura para leishmania de aspirados em linfonodos e úlceras de pele, não mostraram concordância mas potencialmente podem ser utilizados como complementares. Num estudo com 160 cães soropositivos para leishmaniose, o diagnóstico por PCR apresentou 41,9 % de positividade, a Imunofluorescência Indireta 46,25 %, e a punção de linfonodo 19 %; demonstrando neste caso, uma maior sensibilidade pela técnica de imunofluorescência indireta. Em outro estudo, a técnica PCR-ELISA apresentou 83,3% de detecção da leishmaniose mucocutânea.

No diagnóstico de leishmaniose cutânea, a sensibilidade do raspado de pele do centro da lesão foi de 85 %, e de seu PCR 81 %, enquanto o da borda da lesão 69 % e 58%, respectivamente, e ainda o PCR da biópsia da lesão foi de 63 %; mostrando, neste caso, menor sensibilidade na utilização do PCR. Foi comparados os resultados de PCR-RFLP e PCR-hibridização para a identificação de *Leishmania brasiliensis* e *L. amazonensis* e se concluiu que há alta concordância entre eles (91,5%).

A PCR tem sido recentemente utilizada como um método de alta especificidade e sensibilidade na identificação de DNA parasitário em tecidos e fluidos provenientes de casos humanos e no cão, possuindo a vantagem de detectar rapidamente o agente, além de ser uma ferramenta importante na identificação de suas espécies e também para detectá-la em indivíduos assintomáticos. Ainda se pode citar que a PCR têm um grande valor no auxílio da complementação dos diagnósticos convencionais de métodos histológicos, imunohistológicos, e biópsias de pele na leishmaniose cutânea.

O objetivo do trabalho é comparar o resultado da hemocultura, cultura de punção de linfonodo, PCR da hemocultura, PCR da cultura de punção de linfonodo, RIFI e o exame citológico de aspirado de linfonodo fixado em metanol e corado pelo método de Giemsa, tanto em animais vacinados com a Leishmune® como nos não vacinados, em áreas endêmicas do Estado de São Paulo.

Serão utilizados vinte cães de área endêmica para leishmaniose canina, sem restrição de sexo, idade ou raça, e divididos em dois grupos.

O grupo 1 consistirá de dez animais, sorologicamente negativos à Leishmaniose pelo teste de ELISA, e posteriormente vacinados com Leishmune®. O grupo 2 consistirá de dez animais, não

imunizados com a vacina Leishmune® e positivos pelos testes de ELISA ou Punção aspirativa de linfonodo à Leishmaniose.

A tabela 1, mostrará os resultados parciais.

Animal	Vac/Pos	RIFI	Hemoc	Cul.p.linf	C. L.
01	Vac	Neg	+ Pl-Sed	Neg	Neg
02	Vac	Neg	Neg	-	-
03	Vac	Neg	Neg	-	-
04	Vac	Neg	+ Pl	Neg	Neg
05	Vac	Neg	Neg	Neg	Neg
06	Vac	Neg	Neg	-	Neg
07	Vac	Neg	Neg	-	Neg
08	Vac	Neg	Neg	-	Neg
09	Vac	Neg	Neg	-	-
10	Vac	Neg	Neg	Neg	Neg
11	Pos	320	Neg	Neg	Neg
12	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
13	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg
14	Pos	40	Neg	Neg	Neg
15	Pos	640	Neg	Neg	Neg
16	Pos	80	Neg	Neg	Neg
17	Pos	320	Neg	Neg	Neg
18	Pos	640	Neg	Neg	Neg
19	Pos	320	Neg	Neg	Neg
20	Pos	40	Neg	Neg	Neg

Tabela 1: Resultados parciais das análises das amostras. Legenda: Vac – Vacinados; Pos – Positivos; Hemoc – Hemocultura; Cul. p. linf – Cultura de punção de linfonodo; C.L. – Citologia Aspirativa de Linfonodo; Neg – Negativo; Pl – Plasma; Sed – Sedimento.

Pela tabela se pode observar que todos os animais vacinados apresentaram RIFI negativa, podendo indicar uma falha na resposta vacinal à Leishmune® ou uma baixa eficácia no teste diagnóstico. Tanto o animal número 12, quanto o 13, também apresentaram negatividade na RIFI, mostrando que esta técnica não possui uma eficácia de 100%, pois os animais poderiam estar em uma fase de início de infecção ou já avançada da doença, não produzindo uma quantidade de anticorpos específicos consideravelmente suficiente para ser considerado o resultado positivo.

Na hemocultura, apenas os animais 1 e 4 apresentaram resultados positivos, contudo, essa técnica pode dar uma resposta cruzada com *Trypanossoma cruzi*, sendo o PCR dessas culturas o próximo passo para se distinguir qual dos protozoários está presente.

Todos os resultados da cultura de punção de linfonodo processados até o momento foram negativos, mostrando uma baixa especificidade e sensibilidade da técnica.

A Citologia Aspirativa de Linfonodo se mostrou negativa nas análises realizadas, se mostrando uma técnica de baixa sensibilidade.

As análises realizadas até o momento, comprovam que nenhum teste de diagnóstico possui uma sensibilidade e especificidade alta, sendo a RIFI, o que mais se mostrou sensível. Ainda serão realizados os PCRs da Hemocultura e da Cultura de Punção de Linfonodo, os quais poderão demonstrar se houve um erro de leitura das análises dos materiais ou se realmente as técnicas de diagnóstico não foram muito eficientes.

Bibliografia:

ARANSAY, A. M.; SCOUlica, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle Kinetoplastic DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, n.5, p.1933-1938, 2000.

AVILES, H.; BELLI, A.; ARMIJOS, R. et al. PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: A comparison with classical diagnostic methods. **Journal of Parasitology**, v.85, n.2, p.181-187, 1999.

COSTA, C.H.; VIEIRA, J.B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, p.223-228, 2001.

DELGADO, O.; GUEVARA, P.; SILVA, S. et al. Follow-up of human accidental infection by Leishmania (Viannia) brasiliensis using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, p.267-272, 1996.

FABER, W.R.; OSKAM, L.; GOOL, T.V. et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.49, n.1, p.70-74, 2003.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R. et al. Clinical aspects from dogs naturally infected with visceral leishmaniasis in Araçatuba, São Paulo State, Brazil. **Clínica Veterinária**, v.28, p. 36-44, 2000.

GONTIJO, B. A reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose tegumentar Americana. **Doctoral thesis**, Departamento de clínica Médica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, 1998.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, p.1191-1199, 1999.

IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTASB, S.; GAZOULIB, M. et al. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, v.113, p. 99-113, 2003.

LOPES, M.; INGA, R.; CANGALAVA, M. et al. Diagnosis of leishmania using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.49, p.348-356, 1993.

MEDEIROS, A.C.R.; RODRIGUES, S.S.; ROSELINO, A.M.F. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p. 421-424, 2002.

MEDEIROS, A.C.R.; ROSELINO, A.M.F. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.74, p.329-336, 1999.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and experimental model. **Trends Parasitol**, v.18, p.399-405, 2002.

MÜLLER, N.; ZIMMERMANN, V.; FORSTER, U. et al. PCR-based detection of canine Leishmania infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. **Veterinary Parasitology**, v.114, n.3, p.223-229, 2003.

PEARSON, R.D.; SOUZA, A.Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, p.1-13, 1996.

PIÑERO, J.; MARTÍNEZ, E.; PACHECOB, R. et al. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.73, n.1, p.21-29, 1999.

RAMÍREZ, J.R.; AGUDELO, S.; MUSKUS, C. et al. The method used to sample ulcers influences the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.96, p.169-171, 2002.

ROMERO, G.A.S.; SAMPAIO, R.N.R.; MACÊDO, V.O. et al. Sensitivity of Lymph Node Aspiration in Localized Cutaneous Leishmaniasis Due to Leishmania (Viannia) brasiliensis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.4, p.509-511, 1999.

VOLPINIA, A.C.; PASSOSB, V.M.A.; OLIVEIRA, G.C. et al. PCR-RFLP to identify Leishmania (Vianna) brasiliensis and L. (Leishmania) amazonensis causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.90, n.1, p.31-37, 2004.

YARBUH, A.L.; PERCOCO, G.P.; VALERA, M. Localized cutaneous leishmaniasis using polymerase chain reaction: a Venezuelan family report. **Parasitol. día**, v. 21, n.3-4, p. 71-75, 1997.