

# **DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, HISTOLÓGICO E SOROLÓGICO PARA AVALIAR FÍGADOS DE CÃES INFECTADOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ILHA SOLTEIRA-SP.**

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

No Brasil, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é causada pela *Leishmania (L.) chagasi* (BRASIL, 1996; OMS, 1990). Os dados da Fundação Nacional de Saúde, para o período de 1984 a 1997, mostraram que a doença ocorre em quase todas as regiões brasileiras.

No município de Araçatuba localizado na região Oeste do Estado de São Paulo, em 1998, foi detectada a presença de LVC e, em 1999, foram diagnosticados casos humanos de leishmaniose visceral nesta região (GALIMBERTTI et al., 1999). A partir destes primeiros casos, a enzootia canina já foi registrada em 18 municípios desta mesma região, em 2004 (Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” da Secretaria do Estado de São Paulo, 2000). Nas cidades de Pereira Barreto e Ilha Solteira, distantes aproximadamente 150 a 180 km, respectivamente, de Araçatuba, o percentual de positividade de cães com leishmaniose visceral foi de 8,9% no ano de 1998/99 aumentando para 35% no ano de 2004 em Pereira Barreto e, 0,9%, no ano de 2004 em Ilha Solteira. Estes dados demonstram a importância e a relevância de medidas sanitárias e de controle desta doença que se encontra em ascensão tanto em cães como em humanos nesta região considerada endêmica.

No Brasil ainda não existe terapêutica para cães e a prática do sacrifício dos animais infectados tem sido utilizada em muitas regiões, mas com resultados mistos influenciando nas taxas de transmissão e muitas vezes não é aceitável pelo dono do animal. A SUCAM (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública) e mais recentemente, a Fundação Nacional de Saúde, utilizam como método diagnóstico a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em eluatos de sangue no papel de filtro (Brasil, 1996; OMS, 1990).

Costa et al. (1991) realizaram um estudo comparativo da RIFI em eluatos de sangue de cães infectados experimentalmente com diferentes tripanosomatídeos e utilizaram como antígenos promastigotas de *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Os resultados mostraram que a sensibilidade do método foi de 87,5% para diagnóstico do calazar canino, independentemente do antígeno empregado; e que ocorreu reação cruzada com leishmaniose tegumentar em 75% dos casos e com doença de Chagas em 83,3%. Assim, os autores sugeriram que a RIFI deveria ser usada com cautela nas campanhas de saúde pública, em relação à prevalência do calazar canino.

Em função de a RIFI apresentar baixa especificidade, novos métodos de diagnóstico foram propostos por vários autores nos últimos anos. O presente trabalho teve como objetivo diagnosticar a LVC através de exames parasitológicos (“imprint” e histológico) em tecidos de fígado e através de exames sorológicos (RIFI e ELISA) em 34 cães autopsiados pelo Centro de Controle de Zoonose de Ilha Solteira.

Destes 34 cães, 14 encontravam-se positivos pela RIFI (Kit Bio Manguinhos) realizada pelo Instituto Adolfo Lutz – Andradina, SP. Os demais cães (20) foram autopsiados, apenas mediante a realização do exame parasitológico através da punção dos linfonodos, onde a maioria deles (12 cães) apresentava sinais clínicos característicos de LVC e alguns (8 cães) foram apreendidos pelo CCZ por serem cães errantes, mas sem sinais clínicos evidentes de leishmaniose. Antes de serem autopsiados, estes animais foram examinados clinicamente e divididos em três grupos: grupos dos assintomáticos, oligossintomáticos (até 3 sinais clínicos característicos) e sintomáticos (mais de 3 sinais clínicos). Colheu-se sangue para a obtenção dos soros destes animais e após a autópsia, tecidos de vários órgãos, incluindo o fígado foram colhidos, onde uma parte foi utilizada para a impressão dos órgãos (“imprint”) e outra parte foi fixada ou em solução de formalina tamponada a 10% ou em solução de Bouin para a realização dos cortes histológicos e o estudo histopatológico.

No laboratório de Imunoparasitologia da UNESP - Ilha Solteira foram realizados os exames parasitológicos diretos pelo "imprint" e pelo histológico e os exames histopatológicos. Para o exame "imprint" a impressão dos tecidos de fígado foi fixada em metanol e corada pelo Giemsa ou pelo corante Instant-Prov. Após a devida fixação, as secções teciduais de fígado foram enxaguadas e mantidas em álcool 70% até o uso. Em seguida, os tecidos foram incluídos em blocos de parafina e cortados em micrótomo a 5 µm de espessura para a montagem das lâminas. As lâminas, a seguir foram hidratadas em xylol e álcool e coradas em hematoxilina/eosina (H&E). Para os exames parasitológicos, a visualização microscópica das formas amastigotas foi realizada tanto na impressão de órgãos ("imprint") como nos tecidos fixados e corados pela H&E.

Pelo "imprint", as formas amastigotas de *Leishmania* foram observadas, identificadas, contadas e classificadas em graus parasitários. Para isto, em cada lâmina, foram observados 200 campos do microscópio de luz branca sob a objetiva de imersão de 100x. Os cães que apresentaram amastigotas presentes em até 20 campos microscópicos (até 10%) foram registrados com uma + e considerados suspeitos, aqueles que tiveram entre 20 a 100 campos positivos (11% - 50%) foram marcados com ++ (fracamente positivos), os que possuíam entre 100 a 160 (51% - 80%) com + + + (medianamente positivos) e por fim os que apresentaram amastigotas entre 160 a 200 campos (81% - 100%) receberam + + + + (fortemente positivos). Os animais que não apresentaram amastigotas em nenhum dos 200 campos foram considerados negativos. Pelo exame histológico, a avaliação do grau parasitário, foi semelhante ao realizado pelo "imprint", com exceção de que os campos microscópicos não foram contados, mas avaliados de acordo com a extensão das lesões e pela presença das células parasitadas pelos tecidos.

Desta forma, através dos exames parasitológicos pela visualização direta das amastigotas tanto nas contagens ("imprint") como na avaliação histológica, os resultados foram os seguintes: No grupo dos animais assintomáticos (8 cães), 3 (37%) estavam negativos e os 5 positivos apresentaram graus variando parasitários variando de + (37%), ++ (12%) a +++ (12%). Os oligossintomáticos, com 17 cães, apresentaram 6 (35%) cães negativos e 11 infectados com graus variando de + (37%), ++ (12%) a +++ (12%). Já os sintomáticos, com 9 cães, nenhum se encontrava negativo e os demais estavam infectados com graus variando de ++ (2%), +++ (11%) a +++++ (67%).

Pela análise histopatológica, os tecidos hepáticos dos animais do grupo dos assintomáticos, encontravam-se com leve congestão e inflamação portal e com focos inflamatórios difusos (pequenos granulomas) com predominância de células mononucleares, tanto na região portal como entre os sinusóides hepáticos. Havia também aumento de macrófagos e plasmócitos nestas áreas inflamadas. Em alguns tecidos, havia a presença de polimorfonucleares (PMNs), com predominância de eosinófilos. Os hepatócitos de algumas áreas estavam dilatados e com os citoplasmas vacuolizados. Quando presentes, as leishmanias foram vistas em macrófagos (células de Kupfer) dentro dos sinusóides. *Babesia* sp e *Ehrlichia* sp também foram assinaladas nestes tecidos.

No grupo dos animais oligossintomáticos, os tecidos apresentavam congestão portal, aumento no número de canais biliares e abundância de células inflamatórias do tipo mononuclear. Havia em algumas áreas acúmulo de hemáceas e pigmentos como hemossiderina e hematina nos sinusóides dilatados. No interior dos sinusóides foram vistos PMNs (eosinófilos e neutrófilos), plasmócitos e alguns macrófagos infectados com *Leishmania*. Neste grupo havia muitos focos inflamatórios difusos ou focais, formando granulomas ricos em células mononucleares, principalmente linfócitos e macrófagos. Nos tecidos comprovadamente positivos, observou-se maior número de granulomas onde as amastigotas foram visualizadas com maior frequência. Além disso, havia dilatação dos sinusóides e estes eram preenchidos ou obstruídos por células inflamatórias. Os hepatócitos encontravam-se vacuolizados, reticulados e com gotículas de lipídios (esteatose hepática). Em alguns, amastigotas foram vistas no interior de seu citoplasma. Havia também hemorragias em muitos tecidos.

Nos animais sintomáticos, os tecidos hepáticos encontravam-se extensamente alterados. Havia ampla congestão portal com grande infiltração de células inflamatórias mononucleares. Havia extensas áreas com sinusóides dilatados e hemorrágicos e a presença de granulomas inflamatórios e macrófagos infectados com *Leishmania* no seu interior, caracterizando uma inflamação granulocítica crônica. Em alguns casos havia PMNs nos sinusóides e áreas centrolobulares com hepatócitos apresentando

diversas alterações como as gotículas lipídicas, dilatados, vacuolizados, reticulados ou necrosados. Observou-se também pigmentos de hemossiderina em alguns casos.

Além da RIFI realizada pelo Instituto Adolfo Lutz em 14 animais, soros foram colhidos dos demais animais e enviados para o Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Campus de Jaboticabal para realização tanto da RIFI como do teste imunoenzimático direto (ELISA).

Dos oito cães pertencentes ao grupo dos assintomáticos, em apenas um (20%), os resultados foram concordantes em todos os exames realizados, ou seja, os resultados dos exames sorológicos foram positivos tanto pelo kit Bio Manguinhos como pelos realizados em Jaboticabal e concordantes com os parasitológicos. Neste animal, o nível de ELISA e o título da RIFI, foram considerados altos (NE = 4 e 1/1280, respectivamente) e os tecidos encontravam-se infectados com graus variando de ++ a +++ cruzes, tanto pelo “imprint” como pelo histológico. Já em um outro animal, o resultado da RIFI do kit Bio-Manguinhos foi positivo, mas tanto a RIFI como o ELISA realizados em Jaboticabal foram negativos, concordando com o resultado do exame parasitológico, que foi considerado apenas suspeito. Para os demais animais, houve uma discordância de 50% em pelo menos um dos testes realizados (sorológicos ou parasitológicos). Em função das discordâncias entre os exames dos animais deste grupo, ficou decidido que os testes sorológicos serão repetidos, os parasitológicos reavaliados e o teste imunoistoquímico acrescentado para concluir o diagnóstico.

No grupo dos animais oligossintomáticos (17 cães), todos os exames realizados com o kit Bio-Manguinhos foram também positivos tanto pelo ELISA quanto pela RIFI realizados em Jaboticabal e foram também concordantes com os exames parasitológicos (“imprint” ou histológico). Cabe ressaltar aqui, que dois cães estavam com títulos altos nos sorológicos, mas com graus parasitários variando de suspeitos a fracos. Já outros dois animais, estavam positivos para o ELISA (embora com NE = 3), negativos para a RIFI (ambos de Jaboticabal), mas negativos ou suspeitos pelos exames parasitológicos. Nestes dois cães evidenciou-se a presença de *Babesia* sp, principalmente no baço. Talvez este seja um caso de reação cruzada no ELISA. Finalmente apenas um cão, ao contrário, o ELISA foi negativo, mas o RIFI e os exames parasitológicos foram positivos. Neste caso, o ELISA será repetido para esclarecer as dúvidas.

Os exames sorológicos dos animais pertencentes ao grupo sintomático (9 cães) foram realizados apenas em Jaboticabal. Neste grupo, 8 cães estavam positivos (88%) com níveis ELISA altos (NE variando de 5 a 6) e títulos também altos para a RIFI (1/1.280) com graus parasitários variando de moderados a fortes (+++ a +++) nos exames parasitológicos. Apenas um cão neste grupo, estava negativo pelo ELISA e RIFI, possivelmente por qualquer falha ocorrida com a amostra deste soro, pois este animal estava fortemente positivo em todos os tecidos analisados parasitologicamente.

Em função das dificuldades na confirmação do diagnóstico da LVC quando se utilizou somente as técnicas sorológicas e parasitológicas, conclui-se que apesar destas técnicas serem importantes, e usadas na rotina laboratorial, outras como a imunoistoquímica e as moleculares devem ser introduzidas para auxiliar o diagnóstico definitivo, principalmente quando ocorrer casos conflitantes, quando os animais não apresentarem qualquer sinal clínico da doença.

## BIBLIOGRAFIA

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](http://www.sucen.sp.gov.br/base_dados/texto_bolva06.htm)>. Acessado em: 20 abril 2005.

COSTA, C.A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALIK, M.S.M; ET AL. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos

epidemiológicos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro. v. 4, p. 21-25, 1991.

GALIMBERTTI, M.Z.; KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODAS, L.A.C.; CASANOVA, C.; 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.

**Bolsa:** FAPESP