

EXAMES PARASITOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS REALIZADOS EM LINFONODO DE CÃES INFECTADOS COM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA DE ILHA SOLTEIRA. Flávia Luna Lima, Michely da Silva Tenório, Wilma Aparecida Starke Buzetti. – Departamento de Biologia e Zootecnia, FEIS-UNESP-Campus de Ilha Solteira. Centro de Zoonoses de Ilha Solteira. Departamento de Patologia Veterinária, FCAVJ-UNESP-Campus de Jaboticabal.

A *Leishmania* é um protozoário Kinetoplastídeo pertencente à família Trypanosomatidae com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais, e outra aflagelada ou amastigota, como é vista nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (homem, cães e outros animais).

A Leishmaniose Visceral caracteriza-se por um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas causadas por diversas espécies do gênero *Leishmania* transmitidas por insetos vetores que afetam tanto humanos como animais domésticos e silvestres e estão distribuídas por todos os continentes, com exceção da Oceania e da Antártida (WHO, *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, 2002). Duas espécies de mamíferos já foram incriminadas como reservatório deste parasita, uma silvestre, a raposa (DEANE & DEANE, 1955b) e outra doméstica, o cão (ALENCAR, 1961; ALENCAR & CUNHA, 1963; DEANE & DEANE 1954b; DEANE & DEANE, 1955a). No Brasil, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é causada pela *Leishmania (L.) chagasi* (BRASIL, 1966; OMS, 1990).

A transmissão é feita por insetos denominados flebotomíneos (mosquito palha, birigui ou tatuquiras), que consistem de várias espécies de gênero *Lutzomya*, dentre as quais desenvolve-se em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa (BRASIL, 1996; DEANE, 1956; DEANE et al., 1955a; DEANE & DEANE, 1954).

O percentual de positividade de cães nos municípios com transmissão de LVC no Estado de São Paulo cresceram consideravelmente entre os anos de 1998 e 2004. Na região de Araçatuba, o percentual de cães infectados variou de 9,5% em 1998/99 a 22% em 2004. Com relação aos humanos, 34 pessoas foram infectadas em 2004, com duas mortes ocorridas neste ano. 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. Oito humanos encontravam-se infectados em 2004 em Pereira Barreto, mas nenhum óbito foi observado. 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 (SAVANI et al., 2003).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a LVC em tecidos de cães autopsiados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Ilha Solteira através de exames parasitológicos diretos e histopatológicos do linfonodo. Para este estudo, utilizou-se a observação microscópica direta nas impressões (“imprints”) nos linfonodos corados pelo Gmiena e pelo corante Panóptico e de amastigotas de *L. chagasi* em macrófagos e dos exames histológicos e histopatológicos do mesmo órgão, montados em blocos de parafina e corados pela hematoxilina-eosina (H&E).

Através dos sinais clínicos e do exame “post-mortem”, os 34 animais autopsiados foram subdivididos em três grupos: assintomáticos (sem sinais clínicos aparentes), oligossintomáticos (até três sinais clínicos característicos) e sintomáticos (acima de três sinais clínicos).

O grau de parasitismo dos tecidos foi determinado pela presença de formas amastigotas de *Leishmania* em 200 campos microscópicos sob a objetiva de 100x e este grau foi classificado em cruzes (+ a ++++). Os “imprints” que apresentaram formas amastigotas dentro dos macrófagos ou livres em até 10 campos microscópicos (até 5%) foram registrados como uma + e foram considerados suspeitos; aqueles que tiveram entre 11 a 60 campos infectados (5,5% - 30%) foram marcados com ++; os que possuíam mais de 61 a 130 (30,5% - 65%) com +++ e por fim os que apresentaram amastigotas de 131 a 200 campos (65,5% - 100%) receberam ++++. Os animais que não apresentaram amastigotas em nenhum dos 200 campos foram considerados negativos.

Para as lâminas contendo os tecidos corados pela H&E adotou-se os seguintes procedimentos: tecido negativo, com 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. Tecido fracamente positivo (++), quando alguns macrófagos estavam infectados e repletos das formas amastigotas no seu interior, mas localizados apenas em algumas áreas. Tecido moderadamente positivo (+++), quando em torno de 50% do tecido estava comprometido com macrófagos infectados. Fortemente positivo (++++), quando a secção tecidual analisada encontrava-se quase que completamente comprometida tanto pelas lesões quanto pela presença de macrófagos infectados.

O resultado do parasitológico ou pelo “imprint” ou pelo histológico, foi agrupado segundo o grau de parasitismo de + a ++++ conforme mencionado. Assim no grupo dos assintomáticos (8 cães): 1 (14,28%) estava negativo e 7 parasitados com graus variando de + (42,8%) a ++ (42,8%). Os oligossintomáticos apresentaram 3 (17,64%) cães negativos e 14 parasitados com graus variando de + (47,05%), ++ (17,64%), +++ (11,76%) a ++++ (5,88%). Já nenhum sintomático, nenhum encontrava-se negativo e 9 estavam parasitados com graus variando de + (11,1%) ++ (22,2%), +++ (11,1%) a ++++ (55,5%). O parasitológico realizado pelo “imprint” foi mais sensível para detecção de amastigotas do que o histológico.

Pela histopatologia, dos linfonodos dos animais assintomáticos apenas um estava negativo (14%), três eram suspeitos (42,8%) e três eram fracamente positivos (42,8%). Analisando-se toda a secção tecidual, observou-se hiperplasia de macrófagos na região cortical e paracortical e hiperplasia de plasmócitos na região medular. Observou-se em alguns tecidos, corpúsculos linfoglandulares e polimorfonucleares (PMNs) em algumas áreas. Os macrófagos parasitados apresentavam-se com poucos parasitas no seu interior. Algumas amastigotas foram vistas também fora dos macrófagos na região dos seios medulares. As células linfóides das regiões corticais e paracorticais estavam hiperplásicas e havia aumento dos vasos sanguíneos. Em alguns tecidos observou-se a presença de hemossiderina nos macrófagos que poderiam confundir com amastigotas.

Dos 17 cães do grupo oligossintomático, três cães (17,6%) aparentemente não apresentavam células parasitadas com amastigotas e oito eram suspeitos (47,1%). Os demais cães (seis, 35,3%) estavam infectados com graus variados de parasitismo e apenas um estava fortemente parasitado (5,9%). Nos cães suspeitos para *leishmania* (+), verificou-se que os tecidos linfóides apresentavam-se com muitas granulações (hematina e hemossiderina), vários folículos linfóides secundários ativos com grandes centros germinativos, presença de plasmócitos na região medular e na paracortical, corpúsculos linfoglandulares, hiperplasia dos seios e dos cordões medulares. Os tecidos fracamente positivos (++) apresentavam aumento de macrófagos na região cortical, paracortical, nos cordões e nos seios medulares. Nestes animais, os macrófagos infectados estavam localizados nos cordões medulares. Os linfonodos moderadamente e fortemente positivos, estavam com hiperplasia de linfócitos na região paracortical e medular e seios medulares e também hiperplasia de plasmócitos e macrófagos nesta áreas. Alguns tecidos estavam fibrosados e havia a presença abundante de macrófagos infectados por todo o linfonodo. Em algumas áreas destes linfonodos, observou-se a presença de PMNs.

Nos sintomáticos 88,9% dos nove cães estavam infectados com graus variando de ++ (22,2%), +++ (11,1%) a ++++ (44,5%). Os tecidos dos cães suspeitos (11,1%) apresentavam ausência de folículos secundários hiperplásicos e aumento de vasos sanguíneos hemorrágicos. Os cães com grau parasitológico fraco (++) apresentavam hiperplasia folicular na região cortical, abundância de plasmócitos e macrófagos infectados. Os cães com grau mediano (+++) também apresentavam hiperplasia folicular na região cortical e hiperplasia de linfócitos da região medular com grande quantidade de plasmócitos granulares e macrófagos infectados. Os macrófagos infectados estavam mais concentrados na região do seio cortical e nos cordões medulares. Nos tecidos fortemente positivos (++++), o linfonodo apresentou-se fibrosado, com muitas trabéculas de tecido conjuntivo, cordões medulares e folículos primários e secundários atrofiados com aumento considerável das arteríolas, indicando uma linfadenite fibrótica. Os parasitas foram vistos preferencialmente nos cordões medulares, mas havia grande distribuição de macrófagos infectados por toda a secção tecidual além de muitas células gigantes infectadas.

Os exames sorológicos foram realizados uma parte pelo Kit Bio-Manguinhos através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e executados no Instituto Adolfo Lutz de Andradina, SP e outra parte pela RIFI e pelo Imunoenzimático (ELISA) realizados no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP- Campus de Jaboticabal.

Verificou-se que dos 7 cães assintomáticos examinados 4 (45%) estavam positivos pelo sorológico (RIFI e/ou ELISA) e 3 (43%) estavam positivos pelo parasitológico (“imprint” e histológico). Além disso, 3 destes animais estavam positivos por um teste (sorológico) e não pelo outro (parasitológico), indicando uma não concordância com o resultado do diagnóstico em 43% dos casos examinados. Pela análise dos testes sorológicos e parasitológicos dos animais oligossintomáticos, verificou-se que dos 17 cães, 11 (64,71%), estavam positivos para ambos os testes e que 4 cães (29,4%) apresentavam-se positivos em apenas um dos testes (sorológico ou parasitológico) indicando uma discordância no resultado do diagnóstico em 29,4% dos casos examinados. Na análise dos testes dos animais assintomáticos constatou-se que dos 9 cães, 8 apresentavam-se positivos em ambos os testes (sorológico e parasitológico) e apenas 1 (11,11%) apresentava uma discordância no resultado do diagnóstico, apresentando-se negativo nos testes sorológicos (RIFI e ELISA), porém positivo nos testes parasitológicos (“imprint” e histológico). No geral, comparando os métodos parasitológicos com o sorológico constatou-se que houve uma maior discordância entre os testes realizados nos cães do grupo dos assintomáticos, seguidos pelos oligossintomáticos e pelos sintomáticos, concluindo-se que estes merecem serem confirmados através de outras técnicas, quer seja pela imunoistoquímica ou pela Reação de Cadeia em Polimerase (PCR).

Referências bibliográficas:

ALENCAR, J.E. **Calazar canino: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil**. Tese (Livre Docência). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1959.

ALENCAR, J.E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo. v.3, p.175-180, 1961.

ALENCAR, J.E.; CUNHA, R.V. Inquéritos sobre calazar canino no Ceará. Novos resultados. **Revista Brasileira de Metalurgia e Doenças Tropicais**. v.15, p.391-403, 1963.

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

DEANE, L.M. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, 1956.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Encontro de cães naturalmente infectados por *Leishmania donovani* no Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro. v.45, p.703-707, 1954.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro. v. 47, p.75-87, 1955a.

GALIMBERTTI, M.Z.; KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; RODAS, L.A.C.; CASANOVA, C.; COSTA, A.I., et al. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro. v.32, p.217, 1999, Suplemento 1. **Medicine and Hygiene**, London.n.80, p.271-4, 1986.