

**PESQUISA DE FORMAS AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) CHAGASI* PELA
CITOLOGIA DE LINFONODO, MEDULA ÓSSEA E PELE LESIONADA EM CÃES COM
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NO MUNICÍPIO DE BOM
JESUS – PI**

*Railson de Sousa Santos (Orientado, ICV, CPCE/ UFPI- Bom Jesus),
Fernando Luiz Lima de Oliveira (Colaborador, GEZOON, Doutorando PPGCA/UFPI, Teresina),
Karina Rodrigues dos Santos (Co-orientador, CPCE/UFPI- Bom Jesus),
Luciana Pereira Machado, (Orientador, CPCE/ UFPI- Bom Jesus).*

Introdução

A leishmaniose visceral ou calazar é uma das principais doenças parasitárias em países tropicais (BILDIK et al., 2004). Nas Américas, Central e do Sul, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é transmitida ao homem e aos animais através da picada das fêmeas hematófagas dos insetos vetores dípteros psicodídeos do gênero *Lutzomyia* (TAFURI et al., 2001). A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica severa e em alguns casos fatal, os principais sinais clínicos são lesões de pele, onicogrifose, conjuntivite, apatia, emagrecimento e linfadenopatia, podendo se agrupar os animais em três categorias de acordo com os sinais clínicos que apresentam: assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos. Os cães assintomáticos podem viver até sete anos sem sinais de infecção, mas uma vez iniciado o processo a doença evolui inevitavelmente para a morte (ALMEIDA e OLIVEIRA, 1997). O diagnóstico da LVC muitas vezes é um problema para o Médico Veterinário, devido à grande variedade de sinais clínicos observados, alterações histopatológicas inespecíficas e lesões semelhantes às observadas em outras doenças infecciosas e imunomediadas e a ausência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (LUVIZOTTO, 2006). O exame parasitológico é considerado o teste ouro para o diagnóstico da doença. A observação de formas amastigotas do parasita, em esfregaços de aspirado de linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados por Giemsa, Leishman ou Panótico® é uma forma segura, simples, rápida e pouco traumática para o diagnóstico da enfermidade (LAURENTI, 2009). A busca de uma técnica que leve em consideração o bem estar animal é de extrema importância e que venha a detectar de forma rápida e precisa o parasita, buscando minimizar o risco de contaminação do vetor e consequentemente contágio de animais e humanos. O objetivo deste estudo foi pesquisar a presença de formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* em linfonodo, medula óssea e pele lesionada em cães com suspeita clínica da doença e estabelecer o melhor método para o diagnóstico parasitológico da leishmaniose visceral no município de Bom Jesus – PI.

Material e métodos

Foram utilizados 27 cães, 17 machos e 10 fêmeas, todos com idade superior a seis meses, residentes no Município de Bom Jesus/PI, com sinais clínicos compatíveis com leishmaniose visceral canina, testados sorologicamente para pesquisa de anticorpo anti-*Leishmania* pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) e pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), no laboratório do Centro de Controle de Zoonoses de Teresina - PI. Nos cães que apresentavam linfonodos aumentados de volume (n=19) foi realizada a citologia aspirativa do linfonodo com uso de agulha hipodérmica 0,55X19mm, preferencialmente do linfonodo poplíteo, em todos os animais foi realizada punção aspirativa da medula óssea, preferencialmente no osso esterno, utilizando-se agulhas de

1,2x40mm acopladas à seringas descartáveis de 20 mL, preenchidas com 0,5 mL de solução de EDTA a 3%, o material obtido foi imediatamente transferido para uma placa de Petri para melhor visualização das espículas medulares, que com auxílio de um tubo capilar foram capturadas e transportadas para uma lâmina histológica. Nos cães que apresentaram lesão de pele (n=7) foi realizado o *imprint* e a citologia aspirativa (n=5) da borda da lesão com uso de agulha hipodérmica 0,55X19mm. O material obtido de cada procedimento foi imediatamente transferido a lâminas histológicas para confecção de *squash*, duas foram coradas com corante rápido tipo Panótico® e duas pelo Giemsa (JAIN, 1986). Realizou-se a leitura de no mínimo duas lâminas de cada material, uma de cada coloração, em microscopia óptica com objetiva de imersão (1000x), observando-se toda a extensão da lâmina a procura de formas amastigotas no interior de macrófagos ou livres.

Resultados e Discussão

Todos os animais analisados eram clinicamente suspeitos para LVC, apresentando em grau variável sinais clínicos compatíveis com a doença, como lesões de pele, onicogribose, conjuntivite, apatia, emagrecimento e linfadenopatia, caracterizando-os quando positivos como oligossintomáticos ou polissintomáticos (ALMEIDA e OLIVEIRA, 1997; TAFURI et al., 2001). A sorologia foi realizada em 24 cães e destes 20 (83,3%) foram positivos. Considerando como positivos apenas os animais reagentes em ambos os testes sorológicos, a taxa de positivos caiu para 59,1% (13/22) e verifica-se que 22,7% foram positivos em apenas um teste sorológico e negativos no exame parasitológico, possivelmente representam animais falso-positivos. O exame parasitológico foi positivo em 40,7% dos animais testados e em 69,2% dos animais positivos nos dois testes sorológicos. Todos os animais positivos no exame parasitológico estavam positivos na sorologia, comprovando a alta especificidade, segundo Laurenti (2009) a especificidade do exame parasitológico é de 100%, mas a sensibilidade depende do grau do parasitismo, do tipo de material biológico coletado, do seu processamento e coloração, além do observador. Onze cães foram positivos no exame parasitológico na medula óssea, destes oito também foram positivos no linfonodo e cinco na pele. A sensibilidade do exame parasitológico em material de linfonodo varia de 30% e 85% (LAURENTI, 2009), no presente estudo ela foi de 46,1 %, considerando apenas os animais positivos em ambos os métodos sorológicos. Nas amostras de linfonodo, foram observados mais parasitas nas lâminas coradas pelo Panótico®. Alguns animais soropositivos foram negativos na punção de linfonodo, mas apresentaram sinais de reatividade linfóide, como aumento do número de plasmócitos, provavelmente trata-se de animais com baixa parasitemia. Segundo Moreira e colaboradores (2002), em alguns casos observa-se sinais citopatológicos de reatividade do sistema linfo-histiocitário com ausência de formas amastigotas típicas, nesses animais os autores indicam o método de imunofluorescência direta para a pesquisa de parasitos e seus produtos antigênicos nos esfregaços de biópsia aspirativa de linfonodos. Alguns animais apresentaram acúmulo de hemossiderina na citologia de linfonodo, Alves e colaboradores (2010) também observaram presença de hemossiderina em macrófagos pulmonares de cães com LVC. Com exceção de um animal, a frequência do parasita na medula óssea foi de baixa a moderada e teve resultados semelhantes nas duas colorações. Quando o parasitismo é intenso não há problemas para um diagnóstico rápido e seguro; contudo, em muitos casos, especialmente em

animais assintomáticos, nos quais apenas poucas formas amastigotas estão presentes nos tecidos, o diagnóstico parasitológico torna-se difícil e duvidoso (LAURENTI, 2009). Na citologia da medula óssea e do linfonodo foram observadas mais formas livres do parasita em relação aos macrófagos parasitados, porém a identificação de formas livres exige maior habilidade do observador e o material distribuído na lâmina não deve apresentar-se espesso. Nos animais estudados apenas sete (26%) apresentavam lesões ulcerativas de pele e/ou mucosas, destes cinco foram positivos (71,4%). A obtenção de material pelo *imprint* é bastante simples e tem a vantagem não ser invasivo, não causando desconforto ao animal, porém a sensibilidade foi maior nos animais que foi possível realizar a punção aspirativa com agulha fina (100%). Além disso, o material obtido pela citologia aspirativa possibilita fácil observação dos parasitas e o infiltrado linfoplasmocitário esteve presente em todas as amostras positivas de pele e mucosa, constituindo um achado indicativo da infecção.

Conclusão

Nos animais que apresentam lesões ulcerativas de pele a pesquisa do parasita nestas lesões deve ser o primeiro método de diagnóstico parasitológico para a LVC, combinando-se quando possível a citologia aspirativa com agulha fina e o *imprint*, realizando-se a punção de medula apenas nos animais que forem negativos neste exame ou que não apresentarem lesão de pele. Independente do local de coleta do material, as formas amastigotas livres são observadas em maior frequência que as formas intracelulares em macrófagos. Contudo, a identificação dos macrófagos parasitados é mais simples quando comparado a identificação de formas livres.

Palavras chave: Calazar, diagnóstico, lesão de pele.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, I.C.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose emergente. **Clinica Veterinária**, São Paulo, v.2, n.11, p.24-28, 1997.

ALVES, G.B.B. et al. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, p.310-315, 2010.

BILDIK, A. et al. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidant status in dogs with visceral Leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, London, v.77, p.63-66, 2004.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221p.

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v.6, p.13-23, 2009.

LUVIZOTTO, M.C.R. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Manual Técnico Leishmaniose Visceral Canina**. Fort Dodge. p. 28-29, 2006a.

MOREIRA, M.A.B. et al. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v.39, p.103-106, 2002.

TAFURI, W.L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 96, p.203-212, 2001.