

DIAGNÓSTICO PRECOCE DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA PELO MÉTODO DE MICROCULTURA

Leopoldo Fabrício Marçal do Nascimento (Bolsista PIBIC/CNPq), Ivete Lopes de Mendonça (Orientadora, DCCV/UFPI), Joilson Ferreira Batista (Colaborador, UFPI)

Introdução

O diagnóstico da *Leishmania* pelo cultivo em meio líquido tem várias vantagens, entre elas a possibilidade de examinar toda a amostra coletada em um sistema fechado para o surgimento de formas promastigotas móveis (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2005). Durante décadas, o meio de sangue bifásico foi usado para o cultivo de formas de *Leishmania*, obtendo diferentes graus de sucesso. A cultura muitas vezes se torna positiva quando inoculadas com aspirado da lesão de pacientes com um grande número de formas amastigotas (NAVIN *et al.*, 1990). Além disso, uma incubação prolongada de 15-30 dias é muitas vezes necessária para um resultado positivo (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2004 e 2005).

Allahverdiyev *et al.* (2004) desenvolveu o Método de Microcultura para o diagnóstico mais rápido da LTA, onde este método consiste no uso de tubos microhematocrito e meio monofásico tendo como vantagem o baixo custo quando comparado ao MCT, devido ao menor volume exigido e uma maior sensibilidade mesmo quando a carga parasitaria é baixa, além da vantagem do fácil de uso.

Em virtude de a Leishmaniose ser uma zoonose e o cão o principal reservatório urbano da doença, objetivou-se avaliar o uso do método da microcultura, visando um diagnóstico parasitológico de rotina para Leishmaniose Visceral Canina mais rápido e rentável.

Metodologia

Foram coletadas 80 amostras de aspirado de medula óssea de animais da espécie canina com idades e raças variadas, com ou sem sintomas sugestivos de LVC. As amostras colhidas foram processadas pelos seguintes métodos de cultivo.

- a) Método de microcultura (MMC): em um tubo de falcon contendo 6 ml de RPMI enriquecido com 120µl de gentamicina, 120µl de soro bovino fetal, foram adicionadas duas gotas de aspirado de MO e este foi centrifugado por duas vezes a 2400 rotações por minuto para obtenção do sedimento. Em seguida 3 tubos de microhematocrito foram preenchidos com o sedimento e incubados em estufa de BOD a 26°C. As observações microscópicas foram realizadas com intervalo de tempo de um dia durante 21 dias em microscópio de luz invertida com a objetiva de 40X para observação das formas promastigotas de *Leishmania*.
- b) Método Tradicional de Cultura (MTC): duas gotas de aspirado de MO foram semeadas diretamente em tubos contendo meio de cultura NNN + Schneider's. incubados em estufa BOD a 26°C.
- c) Método Tradicional de Cultura Modificado (MTCm): do lavado de MO em meio de RPMI foi semeado 120µL de sedimento em tubo de cultura contendo NNN + Schneider's e incubados em estufa BOD a 26°C.

As lâminas de esfregaço medular, linfonodos ou pele quando presentes foram fixadas com metanol e coradas pelo método de Giemsa para identificar as formas amastigotas e observadas em microscópio óptico na objetiva de 100X.

A sensibilidade foi calculada utilizando qualquer resultado parasitológico positivo e software estatístico GraphPad Prism 5 foi utilizado para determinar a diferença estatística no tempo para a cultura positivar comparando os grupos por meio da Análise de Variância, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey com 95% de significância ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Dos oitenta animais examinados 32 receberam diagnóstico por confirmação parasitológica para LVC em qualquer um dos métodos estudados. As formas amastigotas foram detectadas no esfregaço de MO de 22 animais investigados, vinte e cinco foram positivos pelo MMC, vinte e três foram positivos no MTC e somente dezesseis foram positivos no MTCm com a sensibilidade de 78%, 72% e 50%, respectivamente.

O MMC mostrou-se positivo em até seis dias, onde a maioria das amostras foi positiva com dois dias de cultivo, enquanto no MTC e no MTCm as amostras demoraram até 14 dias para tornar-se positivas com o maior número de positivos entre o quarto, sexto e oitavo dia respectivamente. Uma única amostra foi diagnosticada negativa tanto em esfregaços corados quanto no MTC e MTCm mas no MMC foi considerada positiva após a observação das formas promastigotas sugerindo que o MMC em nosso estudo pode ser mais sensível mesmo quando as taxas de parasitemia são baixas, o que justificaria a utilização desta técnica no diagnóstico de rotina permitindo a identificação de animais positivos mesmo quando a infecção é recente. Em comparação a precocidade de diagnóstico o MMC mostrou diferença significativa ($P < 0,05$), quando comparado com o MTC e o MTCm, mas não mostrou diferença significativa quando comparados os MTC e o MTCm. A média de positividade foi de $8,3 \pm 1,4$ dias para MMC (intervalo de 2 a 6 dias), $3,3 \pm 1,0$ dias para MTC (intervalo de 2 a 14 dias) e $2,3 \pm 0,5$ dias para MTCm (intervalo de 2 a 14 dias).

Nossos estudos mostraram que o MMC teve uma sensibilidade semelhante ao MTC e superior ao MTCm. O MMC foi demonstrado como um teste de escolha para diagnóstico da leishmaniose cutânea segundo Allahverdiyev et al. (2004), Ihalamulla et al. (2005) e Boggild et al. (2007 e 2008) com sensibilidades variando de 83-97% ,81,5%, 71,7% e 84,7%, respectivamente. Para leishmaniose visceral humana o MMC teve sensibilidade de 100% em MO de acordo com Allahverdiyev et al. (2005) e neste trabalho mostrou maior sensibilidade que o encontrado por Silva et al. (2009) com valores de 66,6%.

Analisado o MTC neste trabalho, a sensibilidade foi superior à obtida por Boggild et al.(2007) e Silva, et al. (2009), 55,3% e 61,5 respectivamente e estando dentro do intervalo encontrado por Allahverdiyev et al. (2005), 37,5 – 100%. Já o MTCm foi inferior ao obtido por Silva, et al. (2009) que foi de 64,1%. Uma das grandes dificuldades de diagnosticar leishmaniose por meios de cultivo é a demora do tempo diagnóstico. Boggild et al. (2007) obteve uma média de positividade de $4,2 \pm 0,2$ dias para microcultura (intervalo de 2 a 10 dias), $5,2 \pm 0,4$ dias para cultura tradicional com meio NNN (intervalo de 3 a 14 dias) e $6 \pm 0,8$ dias para cultura tradicional com 10% RPMI (intervalo

de 3 a 17 dias) e o tempo de positividade de cultura foi também reduzida com a microcultura, o que proporcionou poupança de 1 dia de incubação comparada a cultura tradicional NNN e de 2 dias de incubação sobre a cultura tradicional RPMI. Allahverdiyev et al. (2005) cita que a detecção de promastigotas pelo MMC requer uma menor quantidade de meio cultura (25-50µl) e um menor período de incubação (2-7 dias), do que o MTC (2,5-3,0 ml e 15 a 35 dias, respectivamente).

Conclusão

O Método de Microcultura pode tornar-se um método de eleição para o diagnóstico parasitológico da leishmaniose visceral canina, por ser um método sensível, rápido, barato e de fácil execução.

Apoio: CNPq.

Referências

ALLAHVERDIYEV, A.M.; UZUN, S.; BAGIROVA, M.; DURDU, M.; MEMISOGLU, H.R. 2004. A Sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 70 (3):294-297.

ALLAHVERDIYEV A.M.; BAGIROVA M.; UZUN S.; ALABAZ, D.; AKSARAY, N.; KOCABAS, E.; KOKSAL, F. 2005. The value of new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**.73 (2): 276–280.

BOGGILD, A.K.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; ESPINOSA, D.; AREVALO, J.; ADAUI, V.; TULLIANO, G.; LLANOS-CUENTAS, A.; LOW, D.E. 2007. Evaluation of a microculture method for isolation of *leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. **Journal of Clinical Microbiology**. 3980-3684p.

BOGGILD, A.K.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; ESPINOSA, D.; AREVALO, J., MARTINEZ-MEDINA, D.; LLANOS-CUENTAS, A.; LOW, D.E. 2008. Optimization of microculture and evaluation of minicultura for the isolation of *leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**.79 (6): 847-852.

IHALAMULLA, R.L.; RAJAPAKSA, U.S.; KARUNAWEEERA, N.D. 2005. Microculture for the Isolation of *Leishmania* Parasites from Cutaneous lesions – Sri Lankan Experience. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 99: 571-575.

NAVIN, T.R.; ARANA, F.E.; DE MERIDA, A.M.; ARANA, B.A.; CASTILLO, A.L.; SILVERS, D.N. 1990. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. . **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 42: 36-42.

SILVA, F.O.; LÚCIO FILHO, C.E.P.; CARVALHO, L.I.M.; COSTA, C.H.N.; COSTA, D.L. 2009. Métodos de microcultura para o diagnóstico da leishmaniose visceral. In: **XXV Reunião de pesquisa aplicada em Doenças de Chagas e Leishmaniose**. Uberaba, MG: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. 82p.

Palavras-chave: Leishmaniose. *Leishmania infantum chagasi*. Diagnóstico.