

## ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS EM CÃES SORORREAGENTES PARA *Leishmania chagasi* E SUA CORRELAÇÃO COM TESTE PARASITOLÓGICO

Tais Meziara Wilson<sup>1\*</sup>, Larissa Fernandes Magalhães<sup>2</sup>, Alessandra Aparecida Medeiros<sup>3</sup>,  
Maria Eduarda Chiaradia Furquim<sup>4</sup>

### RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose de grande importância na saúde pública. O cão é reservatório doméstico da *Leishmania chagasi* e fonte de infecção para os humanos. A doença gera um acometimento sistêmico e uma variedade e sinais clínicos e alterações patológicas. Devido a essa variedade o diagnóstico se torna complexo tornando-se um desafio para os profissionais da saúde. Para um diagnóstico preciso é importante o conhecimento de métodos laboratoriais e a relação destes com as alterações patológicas. O objetivo do trabalho foi verificar o desempenho do exame parasitológico no diagnóstico de cães infectado pela *Leishmania* correlacionando com as lesões macroscópicas encontradas nos diversos órgãos afetados pela doença. Foram avaliados 34 animais destes, treze (38,2%) apresentaram positivos no exame parasitológico sendo que, 3 (8,8%) eram assintomáticos, 2 (5,9%) oligossintomáticos, e 8 (23,5%) sintomáticos. No grupo assintomáticos 3 (42,9%) foram positivos no baço e 2 cães (28,6%) também foram positivos no linfonodo. Dos animais oligossintomáticos, 2 (13,3%) apresentaram resultado parasitológico positivos tanto no baço quanto no linfonodo. Dos animais sintomáticos 8 (66,7%) foram positivos para o exame parasitológico no baço destes, 5 (41,7%) também foram positivos no linfonodo. As principais alterações macroscópicas verificadas foram 27 cães (79,4%) apresentaram alterações em pele e anexos; 17 (50%) esplênicas; 21 (61,8%)

em linfonodo; 23 (67,6%) hepáticas. Verificou-se acometimento sistêmico dos cães infectados e alta porcentagem resultado parasitológico positivo em cães assintomáticos, fato que confirma a importância do exame para controle da doença.

**Palavras-chave:** Leishmaniose. Canina. Parasitológico. *Imprints*. Amastigotas.

### INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma zoonose de caráter crônico, grave, potencialmente letal e altamente prevalente (BRASIL, 2006). É causada por organismos protozoários do gênero *Leishmania*, que possui grande distribuição mundial representando um dos maiores problemas do mundo em termos de saúde pública (VOLPINI et al., 2004).

O protozoário necessita de dois hospedeiros para completar o seu ciclo, um vertebrado (homens, animais domésticos e silvestres na maioria das regiões brasileiras) e um invertebrado (inseto vetor). No Brasil, a LVC é causada pela *Leishmania chagasi* e transmitida pela picada de flebotomíneos, sendo a *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie envolvida, que atualmente está presente em todas as regiões brasileiras (ALVES et al., 2010; COLLA-JACQUES et al., 2010).

A fêmea inocula formas promastigotas na pele do hospedeiro vertebrado no momento da hematofagia. Essas formas são fagocitadas pelos

<sup>1</sup>Bolsista Iniciação Científica- PIBIC/CNPq/UFU - Laboratório de Patologia Animal - FAMEV – UFU;

<sup>2</sup>Bolsista do Programa Educação Tutorial (PET) Medicina Veterinária - Laboratório de Patologia Animal - FAMEV – UFU;

<sup>3</sup>Professora Doutora, Laboratório de Patologia Animal - FAMEV – UFU;

<sup>4</sup>Bolsistas PIBIC/CNPq - FAMEV – UFU.

Projeto de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq/UFU;

\*Autor para correspondência: [taismw@hotmail.com](mailto:taismw@hotmail.com)

macrófagos, se acumulando no interior de fagolisossomas, mas não são destruídas por eles. No interior dos macrófagos as promastigotas perdem seu flagelo e se tornam amastigotas (ROSYPAL et al., 2005).

O cão é fonte de infecção para vetores em ambientes domésticos, sendo considerado o principal elo na cadeia de transmissão da Leishmaniose Visceral (MELO, 2004). Os sinais clínicos observados nos cães infectados pela *Leishmania chagasi* são representados por caquexia, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia e linfadenomegalia, pneumonia, alterações cutâneas como dermatite seborreica, alopecia, úlceras de pele e hiperqueratose e onicogribose (LUVIZIOTTO, 2006). Também podem apresentar sinais como alterações locomotoras, cardíacas, neurológicas (NOGUEIRA et al., 2009). Um grande número de cães infectados apresentam-se assintomáticos dependendo da fase da doença e das condições imunológicas. No entanto, mesmo assintomáticos, estes cães são fonte de infecção para o vetor, e então têm papel importante na transmissão da doença (SOUZA et al., 2001).

Pode-se utilizar vários métodos para diagnosticar a LVC, entre eles, os três principais tipos de testes que estão disponíveis são parasitológico, sorológico e molecular (NOLI, 1999; MELO, 2004). No teste parasitológico a forma amastigota do parasito, livre ou dentro dos macrófagos, é identificada em aspirados de linfonodos, baço, ou medula óssea corados com corantes de rotina (REIS et al., 2006). É uma técnica com especificidade de 100%, porém com sensibilidade baixa que varia de 50 a 70% em esfregaços de medula óssea e de menos de 30% em esfregaço de linfonodos (FERRER, 1999). Os diagnósticos sorológicos detectam anticorpos anti-*Leishmania* e os testes recomendados pelo Ministério da Saúde no Brasil são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (BRASIL, 2006). A baixa especificidade é a principal desvantagem dessas técnicas, o que ocorre devido às reações cruzadas com infecções de outras espécies da

família Trypanosomatide ou até mesmo com organismos filogeneticamente distantes (MELO, 2004). A biologia molecular torna possível a realização de exames de identificação do DNA da *Leishmania*, através da reação em cadeia de polimerase (PCR) (GOMES et al., 2007). É um método de alta sensibilidade e especificidade, porém é uma técnica que exige laboratórios bem equipados e grande habilidade técnica (FERRER, 1999).

A doença pode ser fatal para humanos e, portanto, são necessárias medidas de controle eficazes sobre o reservatório doméstico. Deste modo o diagnóstico precoce, tanto em humanos quanto em cães, torna-se importante (ALVES e BEVILACQUA, 2004). Os sinais clínicos da LVC são variados devido à diversidade de mecanismos patogênicos, a progressão da doença e as diversas respostas imunes nos indivíduos afetados (CABASSU et al., 1988; FERRER, 1999). Devido a essa variação o diagnóstico se torna complexo em algumas situações, fazendo com esse seja um desafio (FERRER, 2002). Além disso, pode haver um atraso ou até mesmo uma falha no diagnóstico clínico em consequência da natureza crônica da doença e seu longo período de incubação (SLAPPENDEL e FERRER, 1990).

Considerando a dificuldade para diagnosticar a Leishmaniose e a importância deste fator no controle desta zoonose, os métodos laboratoriais tornam-se importantes para um diagnóstico preciso. Portanto o objetivo do trabalho foi verificar o desempenho do exame parasitológico no diagnóstico de cães infectados pela *Leishmania* correlacionando com as lesões macroscópicas encontradas nos diversos órgãos afetados pela doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Animais:** Foram utilizados 34 cães sororreagentes para LV, independente de raça, sexo e idade, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Uberlândia – MG, durante os anos de 2011 e 2012. As técnicas sorológicas utilizadas para diagnóstico de LVC foram Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

(ELISA) e imunofluorescência indireta (RIFI). Os animais foram submetidos a exame clínico completo segundo protocolo e Ficha Clínica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Realizou-se registro das alterações clínicas observadas e a partir destas os cães foram divididos em três grupos: sintomático, oligossintomático e assintomático de acordo com o Manual de Vigilância e Controle da leishmaniose visceral, elaborado pelo Ministério da Saúde (2006). A classificação é definida como: cães assintomáticos, que têm ausência de sinais clínicos relacionados com a infecção pelo protozoário; cães oligossintomáticos, que apresentam adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pêlo opaco; cães sintomáticos, que apresentam alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e parestesia dos membros posteriores. Os cães positivos foram submetidos à eutanásia e posteriormente, enviados ao Setor de Patologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia para realização da necropsia.

**Necropsia:** A necropsia foi realizada de acordo com a técnica utilizada rotineiramente no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Uberlândia. As alterações macroscópicas dos animais observadas durante a necropsia foram analisadas registradas e fotografadas, para posteriormente serem correlacionadas com o resultado do exame parasitológico.

**Exame parasitológico:** Foram retirados linfonodos poplíteos e fragmentos de baço de todos os cães sororreagentes e realizado *imprints* dos órgãos em lâminas histológicas que, logo após, foram coradas com corante do tipo Panótico Rápido®. Realizou-se avaliação das lâminas em microscópio óptico, com objetiva de imersão (aumento de 100x), observando-se toda a extensão da lâmina com o objetivo de identificar formas amastigotas da *Leishmania* em ensaio cego (o observador não tinha conhecimento do grupo ao qual o animal

avaliado pertencia). Os critérios utilizados para se considerar uma amostra positiva foram: visualização das três estruturas básicas do parasita (núcleo, citoplasma e cinetoplasto), presença de estruturas íntegras, independência da carga parasitária (TRONCARELLI et al., 2009) e presença de formas livres ou dentro de macrófagos (MOREIRA et al., 2002). Após a leitura, as amostras positivas foram classificadas de acordo com o parasitismo em alto, moderado e baixo parasitismo.

## RESULTADOS

Os animais apresentavam graus variáveis de sinais clínicos sendo divididos em grupos assintomáticos (n=7), oligossintomáticos (n=15) e sintomáticos (n=12). Na necropsia foram observadas as alterações macroscópicas e verificou-se que dos 34 animais avaliados 27 (79,4%) apresentaram alterações em pele e anexos; 17 (50%) esplênicas; 21 (61,8%) em linfonodo; 23 (67,6%) hepáticas; 16 (47,1%) renais; 14 (41,2%) respiratório; cardíacas 12 (35,3%) e oftálmicas 8 (23,5%).

Dos 34 animais avaliados, treze (38,2%) apresentaram positivos no exame parasitológico em pelo menos um dos órgãos em questão, sendo que 9 (26,5%) destes eram positivos tanto no linfonodo como no baço e 4 (11,8%) apresentavam formas amastigotas apenas no baço, e nenhum animal apresentou resultado positivo apenas no linfonodo. Segundo BARROUIN-MELO (2006) devido ao intenso parasitismo no baço de animais sintomáticos esse órgão foi escolhido por alguns autores como um ótimo local para a obtenção material para o diagnóstico da LVC. Dos animais positivos para no exame parasitológico, 3 (8,8%) eram assintomáticos, 2 (5,9%) oligossintomáticos e 8 (23,5%) sintomáticos.

No grupo assintomáticos 3 (42,9%) foram positivos para o exame parasitológico no baço (1 animal - 14,3% - apresentou alto parasitismo e 2 animais - 28,6% - apresentaram baixo parasitismo) destes, 2 cães (28,6%) também foram positivos no linfonodo (1 animal - 14,3% - com alto parasitismo e 2 - 28,6% - baixo parasitismo). As alterações macroscópicas mais comuns encontradas

na necropsia dos animais assintomáticos, sendo que, um cão pode ter apresentado mais de uma alteração, foram alterações hepáticas - congestão hepática em 3 animais (42,9%) e hepatomegalia em 4 (57,15%). Foram observados também: alterações linfáticas – aumento de volume do linfonodos pré-escapulares em um animal (14,3%), esplenomegalia em um animal (14,3%) e baço diminuído de volume em um animal (14,3%); alterações pulmonares - hiperemia pulmonar em 2 animais (28,5%), edema pulmonar em 2 (28,5%) e pneumonia em 1 (14,3); alterações renais – rins hiperêmicos em 2 cães (28,5%), áreas de fibrose renal em um (14,3%) e rins aumentados de volume em um (14,3%); alterações cardíacas – hipertrofia ventricular esquerda em 2 cães (28,5%) e dilatação ventricular direita em 1 animal (14,3%). Apenas um animal apresentou alterações em pele sendo região interdigital avermelhada.

Dos animais oligossintomáticos, 2 (13,3%) apresentaram resultado parasitológico positivos, sendo 6,7% (1 cão) com baixo parasitismo e 6,7% com moderado parasitismo, tanto no baço quanto no linfonodo. As alterações macroscópicas mais comuns neste grupo ocorreram em pele e anexos – 8 (53,3%) animais com graus variáveis de alopecia pelo corpo, alopecia com eczema periocular em 4 animais (26,7%), hiperqueratose de focinho em 3 animais (20%) e foliculite em um animal (6,7%); em fígado – hepatomegalia em 10 animais (66,7%) e esteatose hepática em um (6,7%); em baço – esplenomegalia em 9 animais (60%), hiperplasia de polpa branca em 2 (13,3%) e baço diminuído de volume em 1 (6,7%); em linfonodo com linfadenomegalia ocorrendo em 4 cães (26,7%). Também foram observadas alterações renais – rim hiperêmico em 4 animais (26,7%) e rim aumentado de volume também em 4; alterações cardíacas – hipertrofia ventricular esquerda em 4 animais (26,7%) e dilatação ventricular direita em 2 (13,3%); alterações pulmonares – 2 cães pneumonia (13,3%) e um com edema pulmonar (6,7%).

Dos animais sintomáticos 8 (66,7%) foram positivos para o exame parasitológico no baço (4 animais com alto

parasitismo, 2 com moderado e 2 com baixo parasitismo) destes, 5 (41,7%) também foram positivos no linfonodos sendo todos com baixo parasitismo. O sistema mais afetado neste grupo de animais, considerando que um animal pode ter apresentado mais de uma alteração, foi o tegumentar sendo que 7 animais (58,3%) apresentou alopecia em várias partes do corpo, 6 (50%) eczema, 6 (50%) onicogribose, 4 (33,3%) alopecia de ponta de orelha, 2 (16,6%) alopecia periocular, 2 (16,6%) foliculite e um animal (8,3%) hiperqueratose de focinho. Também foram comuns as alterações: hepáticas – hepatomegalia em 6 cães (50%) e esteatose em 2 (16,6%); linfáticas – linfadenomegalia em 7 animais (58,3%), hepatomegalia em 3 (25%) e hiperplasia branca de baço em 2 (16,6%); cardíacas – dilatação ventricular direita em 2 cães e hipertrofia ventricular direita também em 2 (16,6%); oftálmicas – secreção ocular purulenta em 4 (33,3%) e opacidade de córnea em 2 animais (16,6%); respiratórias - edema pulmonar em 3 cães (25%) e pneumonia em um (8,3%). Observou-se neste grupo caquexia em 4 cães (33,3%).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível perceber o envolvimento de órgãos de vários sistemas dos animais com LVC, comprovando a característica sistêmica da doença, fato que dificulta o diagnóstico. Uma quantidade significativa de animais assintomáticos apresentaram lesões à necropsia e também apresentaram-se positivos para exame parasitológico, mostrando a importância desses animais na disseminação da doença uma vez que são reservatórios inaparentes da *Leishmania chagasi*. Foi encontrado maior parasitismo no baço dos animais infestados em relação ao linfonodo, portanto, deve-se preferir coleta de amostras do baço para o diagnóstico de LVC.

## ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis is a zoonosis of great public health importance. The dog is a domestic

reservoir of *Leishmania chagasi* and source of infection for humans. The disease causes a systemic access and a variety of clinical signs and pathological changes. Due to this variety, the diagnosis becomes complex becoming a challenge for health professionals. For an accurate diagnosis is important the knowledge of laboratory methods and their relationship with pathological changes. The aim of the study was to verify the performance of parasitological examination in the diagnosis of dogs infected by *Leishmania*, correlating with gross lesions found in various organs affected by the disease. 34 animals were used in the study, 13 (38,2%) of these were positive to the parasitological test, 3 (8.8%) were asymptomatic, 2 (5.9%) oligosymptomatic, and 8 (23.5%) symptomatic. In the asymptomatic group 3 (42.9%) were positive in the spleen and 2 dogs (28.6%) were also positive in the lymph node. In the group of oligosymptomatics, 2 (13.3%) were positive in the parasitological both in the spleen and in the lymph node. Of symptomatic animals 8 (66.7%) were positive for parasitological test in the spleen, of these 8, 5 (41.7%) were also positive in the lymph node. The main macroscopic changes observed were, 27 dogs (79.4%) with alterations in skin and appendages; 17 (50%) splenic, 21 (61.8%) in lymph nodes, 23 (67.6%) liver. There was systemic involvement of infected dogs and high percentage of positive test in asymptomatic dogs, a fact that confirms the importance of the test for disease control.

**Keywords:** Leishmaniasis. Canine. Parasitologic. *Imprints*. Amastigots.

## REFERÊNCIAS

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológico: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 259-265, 2004.

ALVES, C. R.; CÔRTEZ L. M.; BRAZIL R. P. The vectorial potential of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* and *Lutzomyia (N.) whitmani* in the transmission of *Leishmania (V.) braziliensis* can also be related to proteins attaching. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 210, article ID 827851, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BARROUIN-MELO, S. M.; LARANJEIRA, D. F.; ANDRADE FILHO, F. A.; TRIGO, J.; JULIÃO, F. S.; FRANKE, C. R.; PLIS-AGUIAR, P. H.; SANTOS, W. L. C.; CARVALHO, L.P. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.

CABASSU, J. P., GERVAIS, P., SEGURET, N. Manifestations cliniques de La leishmaniose canine. **Prat. Med. Chir. Animal Comp.**, v. 23, p. 29-31, 1988.

COLLA-JACQUES, F. E.; CASANOVA, C.; DO PRADO, A. P. Study of sand fly fauna in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in the municipality of Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p.208-215, 2010.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. canine leishmaniasis: an update. **Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum**, Barcelona. Ed. R. Killick Kendrick, 1999, pp 6-10.

FERRER, L. M. The pathology of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**. Sevilla, Spain, 2002, pp 21-24.

GOMES, A. H.; FERREIRA, I. M.; LIMA, M. L.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.;

ARAÚJO, M. F.; PEREIRA-CHIOCOOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 234-241, 2007.

LUVIZOTTO, M. C. R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: 1º FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. **Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral canina 2006**. p.15-22.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. In XII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE RICKETIOSIS, 2004, Ouro Preto. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v.23, suplemento 1, p 41-45, 2004.

MOREIRA, M. A. B., LUVIZOTTO, M. C. R., NUNES, C. M., DA SILVA, T. C. C., LAURENTI, M. D., CORBETT, C. E. P. Aplicação da Técnica de Imunofluorescência direta para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral canina em aspirado de linfonodo. **Brazilian journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 2, 2002.

NOGUEIRA, J. L.; SILVA, M. V. M.; PASSOS, C. C.; AMBRÓSIO, C. E. A importância da Leishmaniose Visceral Canina para a Saúde Pública: Uma Zoonose Reemergente. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VII, n. 13, p12, 2009.

REIS, A. B., MARTINS-FILHO, O. A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., CARVALHO, M. G., MAYRINK, W., FRANCA-SILVA, J. C., GIUNCHETTI, R. C., GENARO, O., CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

ROSYPAL, A. C., TROY, G. C., ZAJAC, A. M., FRANK, G., LINDSAY, D. S.

Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970-2, 2005.

SLAPPENDEL, R. J., FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE C. E ed. **Infectious diseases of the dog and cat**, Philadelphia: WB Saunders Co: 769-777, 1990.

SOUZA, C. B. P. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/65/5/510.full.pdf>. Acesso em: 15/11/2012.

TRONCARELLI, M. Z., LUCHEIS, S. B., CAMARGO, J. B., MACHADO, J. G., LANGONI, H. Análise clínica e laboratorial em cães eutanasiados no centro de controle de zoonoses de Bauru- SP, com vistas ao diagnóstico de leishmaniose visceral (LV). **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 2, p. 343-353, 2009.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M. A.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis, **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.