

IDENTIFICAÇÃO DE *Leishmania* spp. PELO MÉTODO DE PAAF DE LINFONODOS DE CÃES POSITIVOS PARA LVC**IDENTIFICATION OF *Leishmania* spp. BY THE PAAF'S METHOD OF LYMPH NODS FROM POSITIVE DOGS TO LVC**

*Júlia Borém de Brito*¹
*Fernanda Cristine Alves Fonseca*¹
*Jamille Adriana Mayrink Carmo*¹
*Ronald Igor Simões de Oliveira*¹
*Yana Colares*¹
*Patrícia Natalícia Mendes de Almeida*²

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma antropozoonose causada pela *Leishmania donovani chagasi*, que é um protozoário parasita dos macrófagos e neutrófilos dos mamíferos. Animais positivos para leishmaniose geralmente apresentam linfadenomegalia. Assim, atribui-se a importância de punção aspirativa de linfonodos como um exame complementar para o diagnóstico da doença. Este estudo visa, portanto, divulgar aos médicos veterinários e acadêmicos da área, um exame que auxilie no diagnóstico de leishmaniose visceral em cães, através da observação direta de formas amastigotas de *Leishmania* spp, sendo uma técnica de baixo custo, rápida execução e elevada especificidade.

Foi realizada a punção aspirativa por agulha fina nos linfonodos poplíteos, submandibulares e pré-escapulares de 73 cães machos positivos para leishmaniose visceral, diagnosticados através do exame ensaio imunoenzimático realizados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Montes Claros – Minas Gerais. Após a coleta e análise dos resultados, foi observado que o linfonodo no qual mais se encontrou o protozoário foi no pré-escapular e onde menos se encontrou o protozoário foi no poplíteo, sendo o poplíteo de maior facilidade de aspiração para os pesquisadores. Conclui-se que o método de aspiração por agulha fina para o diagnóstico de Leishmaniose visceral é o exame que apresenta melhor custo-benefício e apresentou bons resultados na pesquisa de formas amastigotas dos linfonodos submandibulares, pré-escapulares e poplíteos de cães sorologicamente positivos, tendo em vista a exclusão de outras doenças infecciosas.

Palavras-chave: Leishmaniose. Cão. Linfonodos. PAAF.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is an anthrozoosis caused by *Leishmania donovani chagasi*, which is a parasitic protozoan of macrophages and neutrophils in mammals. Animals that are positive for leishmaniasis usually have lymphadenomegaly. Thus, the importance of aspiration of lymph nodes as a complementary examination for the diagnosis of the disease is attributed. This study aims to disseminate to the veterinarians and academics of the area an examination to assist in the diagnosis of visceral leishmaniasis in dogs through the direct observation of amastigote forms of *Leishmania*

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas do Norte de Minas.

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas do Norte de Minas.

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas do Norte de Minas.

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas do Norte de Minas.

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas do Norte de Minas.

² M.S.C. 2003. Professora Assistente do Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Integradas do Norte de Minas.

spp, being a technique of low cost, fast execution and high specificity. Fine needle aspiration was performed on the popliteal, submandibular and pre-glandular lymph nodes of 73 male dogs positive for visceral leishmaniasis, diagnosed through the immunoenzymatic assay performed by the Montes Claros Zoonoses Control Center - Minas Gerais. After the collection and analysis of the results it was observed that the lymph node in which the protozoan was most found was in the pre-scapular and where the protozoan was less found in the popliteal, and the popliteus was more easily aspirated for the researchers. It is concluded that the fine needle aspiration method for the diagnosis of visceral leishmaniasis is the most cost-effective exam and has shown good results in the investigation of submandibular, pre-scapular and popliteal forms of serologically positive dogs, exclusion of other infectious diseases.

Key words: Leishmaniasis. Dog. Lymph nodes. FNA.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina é uma doença infecciosa causada principalmente pelo protozoário *Leishmania donovani chagasi*. Esse parasito pertence à ordem *Kinetoplastida*, subordem *Trypanosomatina* e família *Trypanosomatidae* (MONTEIRO et al., 2005).

Animais positivos para leishmaniose visceral geralmente apresentam linfonodomegalia, e isso ocorre devido à predominância de macrófagos e plasmócitos, envolvendo todas as regiões do linfonodo e causando distorção deste órgão pela presença de granulomas atípicos associados à atrofia linfoide (MOREIRA, 2010).

A leishmaniose visceral canina manifesta-se na forma de lesões cutâneas, com descamação e eczema, principalmente no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, acometidas geralmente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações, além de pelo opaco. Com a progressão da doença, notam-se onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema da porção distal dos membros, vômito e hiperqueratose. No estágio final da infecção, ocorre em geral a paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e óbito. Porém, cães soropositivos para *Leishmania* spp podem permanecer assintomáticos por um determinado período de tempo (BRASIL, 2006).

Sob o ponto de vista epidemiológico, de todos os animais identificados como reservatório para leishmaniose visceral, o cão é considerado o reservatório doméstico mais importante sendo, por esta razão, um dos alvos do programa de controle da doença no Brasil (SILVA, 2014).

A Leishmaniose Visceral Canina é a segunda patologia de maior acometimento em cães. Esses casos correspondem a 13,54% dentre todas as patologias diagnosticadas nas clínicas veterinárias de Montes Claros, MG, sendo considerada uma região endêmica para a doença (COLARES *et al.*, 2015).

Dois tipos de materiais biológicos são utilizados nos testes sorológicos: o soro sanguíneo e o soro que é obtido após coagulação e centrifugação de sangue total coletado sem anticoagulante por venopunção das veias cefálica ou jugular, sendo esse o material recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

Das técnicas sorológicas efetivas, as mais empregadas e recomendadas pelo Ministério da saúde para o diagnóstico em cães são o Ensaio de Imunoenzimático (ELISA[®]) e a Reação de Imuno-fluorescência indireta-RIFI (BRASIL, 2014).

A observação da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase, que se unirá aos anticorpos específicos caso estejam presentes, formando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado sororreagente é aquele que aponte o valor da densidade ótica igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte (*Cut-Off*) do resultado do controle negativo (BRASIL, 2014). No entanto, existem fatores que influenciam na sensibilidade e especificidade do teste, como a escolha do antígeno em bruto ou recombinante o tempo de incubação e o tipo de microplaca utilizada (BRASIL, 2006; FERREIRA *et al.*, 2013).

É utilizado para o diagnóstico de várias parasitemias, sendo observadas reações cruzadas principalmente com a Leishmaniose Tegumentar Americana e a doença de Chagas. O sororreagente considerado é aquele que a titulação seja igual ou superior à diluição de 1:40 (BRASIL, 2014).

O teste RIFI apresenta baixa especificidade e uma das principais limitações é a ocorrência de reações cruzadas com outras doenças. Já o diagnóstico parasitológico apresenta especificidade de 100%, mas a sensibilidade é variável de acordo com o grau parasitológico. Moura *et al.*, (1999), Nogueira *et al.*, (2009) e Moreira *et al.*, (2002) afirmam que o diagnóstico mais confiável é a observação direta do parasita em esfregaço de medula óssea ou linfonodos.

Os métodos parasitológicos são exames considerados seguros para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp, em razão de serem observadas diretamente nos tecidos do animal as formas amastigotas do protozoário. Podem ser utilizadas amostras de esfregaço sanguíneo, ou de

conteúdo de tecidos dos linfonodos, medula óssea, fígado, baço e pele, sendo corados por corantes do tipo *Romanowski*. Com o uso de uma técnica bem executada, a sensibilidade do método é 100% e a especificidade depende do grau de parasitemia, tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina, ficando em torno de 80% para cães sintomáticos e menor para cães assintomáticos (BRASIL, 2006).

A punção aspirativa por agulha fina dos linfonodos tem sido o exame mais proposto devido a sua facilidade de execução, obtenção de material significativo para o exame e poucos riscos inerentes à técnica, além de apresentar baixa agressividade tecidual (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

A Reação em Cadeia de Polimerase é o método molecular capaz de identificar e ampliar fragmentos específicos do ácido desoxirribonucleico da *Leishmania* spp, por isso sua altíssima especificidade (em torno dos 100%) e sensibilidade que (varia de 82 a 100%). (BRASIL, 2006).

O diagnóstico precoce de cães infectados é imprescindível para prevenir e controlar a disseminação dessa patologia. A conduta recomendada pelo Ministério da Saúde para a profilaxia da leishmaniose visceral canina, além da eutanásia de cães infectados, inclui o controle de vetores, a detecção e o tratamento dos casos nos seres humanos, que são gratuitos (FARIA; ANDRADE, 2012).

A vacina é utilizada somente para animais assintomáticos com resultados sorológicos negativos para *Leishmania* spp. Vale ressaltar que o imunobiológico não é a única prevenção individual da leishmaniose visceral canina e existem outras medidas que devem ser tomadas, conforme normatização do Ministério da Saúde, como uso de telas protetoras nas janelas da casa, uso de citronela spray no animal e a própria planta em domicílio, uso de coleiras repelentes ao mosquito, deixar o ambiente livre de lixos e resíduos orgânicos e inorgânicos, como garrafas, pneus e vasilhames que facilitem a procriação do flebótomo. Os animais que apresentarem sintomatologia clínica compatível e/ou reações sorológicas reagentes estarão passíveis das medidas sanitárias vigentes (BRASIL, 2016).

Com o presente trabalho objetivou-se avaliar o método de punção aspirativa com agulha fina (PAAF) dos linfonodos, para a identificação de *Leishmania* spp em cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral canina.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado utilizando-se cães do sexo masculino que foram recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonozes (CCZ) de Montes Claros- MG. Todas as coletas foram realizadas do lado esquerdo dos animais. A pesquisa foi composta por 73 cães, diagnosticados como positivos para leishmaniose visceral canina por meio do exame ELISA[®]. Durante o estudo, foram utilizados os instrumentos: microscópio óptico NIKON E100[®], agulhas para aspiração, seringa estéril de 3 ml, kit panótico rápido LaborClin[®], lâminas, óleo de imersão, tricótomo, lâminas para tricótomo, álcool 70%, solução fisiológica, luvas para procedimento (descartáveis), algodão hidrófilo, câmera do *Smartphone* Samsung Galaxy J2 Duos e caixa de lâminas para transporte.

Imediatamente após a eutanásia dos animais que foi realizada pelos funcionários do CCZ, foi feita a devida assepsia, executou-se o método de punção dos linfonodos submandibulares, pré- escapulares e poplíteos, sendo introduzida a agulha estéril acoplada à seringa de 3 ml pela epiderme até atingir o linfonodo e feito o movimento em leque, sendo aspirado o conteúdo celular de cada linfonodo, logo, colocado na lâmina de vidro estéril e feito o esfregão. As lâminas foram identificadas por numeração animal e tipo de linfonodo.

As amostras biológicas resultantes da aspiração foram armazenadas em caixa para lâminas e levadas ao laboratório de histopatologia das Faculdades Integradas do Norte de Minas – FUNORTE, onde foram avaliadas no microscópio óptico NIKON E100[®] com o intuito da observação do protozoário em sua forma amastigota. Após visualizar a *Leishmania* spp, foi realizado o registro com a câmera do *Smartphone* Samsung Galaxy J2Duos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos linfonodos submandibulares, 65 animais foram positivos e 8 animais negativos. As punções dos linfonodos pré-escapulares apresentaram 66 de positividade e 7 negativos. Já nos linfonodos poplíteos, 61 animais foram positivos e 12 animais negativos.

Para os 73 animais, foram obtidas 219 lâminas. Destes, 54 foram positivos (73,97%), 4 foram negativos (5,48%) e 15 apresentaram linfonodos positivos e negativos (20,55%).(Tabela I). Nos linfonodos submandibulares, 65 animais foram positivos e 8 animais negativos. As punções dos

IDENTIFICAÇÃO DE *Leishmania* spp. PELO MÉTODO DE PAAF DE LINFONODOS DE CÃES POSITIVOS PARA LVC

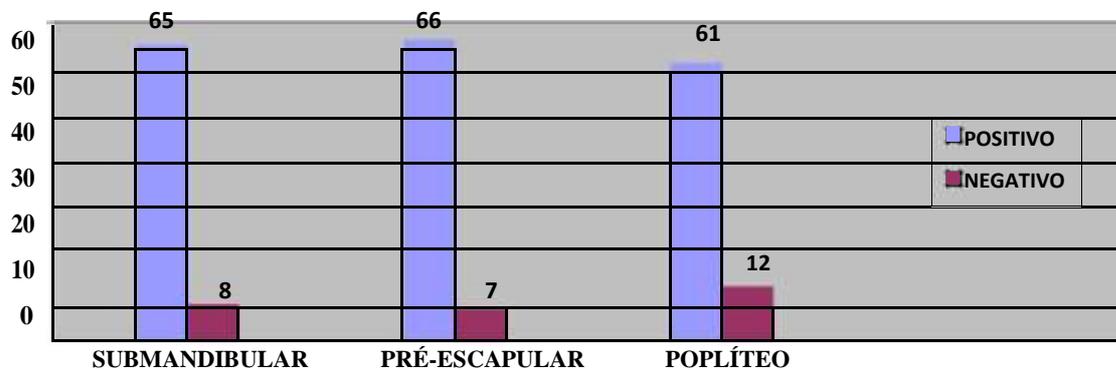
linfonodos pré-escapulares apresentaram 66 de positividade e 7 negativos. Já nos linfonodos poplíteos, 61 animais foram positivos e 12 animais negativos (Gráfico I).

Tabela 1 - Porcentagem de cães positivos e negativos para LVC após análise de esfregaço obtido por PAAF em linfonodos submandibulares, pré-escapulares e poplíteos em cães positivos, pelo teste ELISA[®], para LVC

Animais positivos	73,97%
Animais negativos	20,55%
Animais positivos e negativos	5,48%

Fonte: Arquivo pessoal

Gráfico 1 - Linfonodos positivos e negativos para presença de formas amastigotas após análise de esfregaço obtido por PAAF em linfonodos submandibulares, pré-escapulares e poplíteos em cães positivos, pelo teste ELISA[®], para LVC



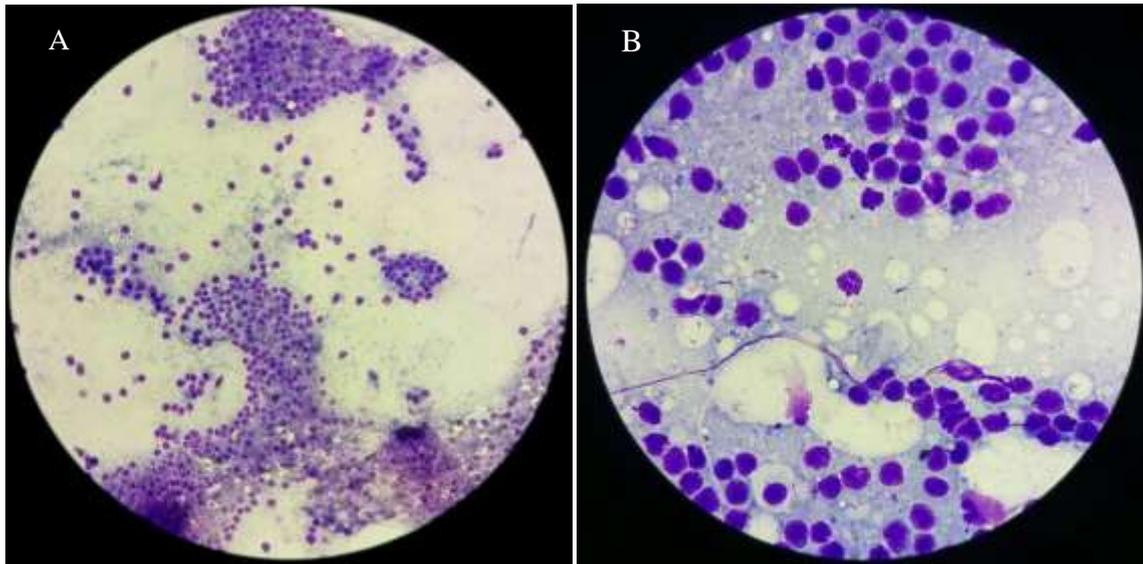
Fonte: Arquivo pessoal

Após a coleta e análise dos resultados, foi observado que o linfonodo no qual mais se encontrou o protozoário foi no pré-escapular e onde menos se encontrou o protozoário foi no poplíteo, sendo o poplíteo de maior facilidade de aspiração para as pesquisadoras.

Nas lâminas positivas para *Leishmania* spp, foi observada a forma amastigota do protozoário parasitando diversos macrófagos na objetiva 100x (fotografia1), em algumas lâminas com alto grau de parasitemia. Foi possível observá-los na objetiva 40x do microscópio óptico (fotografia 1). Alguns parasitas eram observados também sozinhos na lâmina. Foi observada intensa neutrofilia (fotografia 2) com predomínio de neutrófilos. As fotos foram capturadas da câmera do

Smartphone Samsung Galaxy J2 Duos.

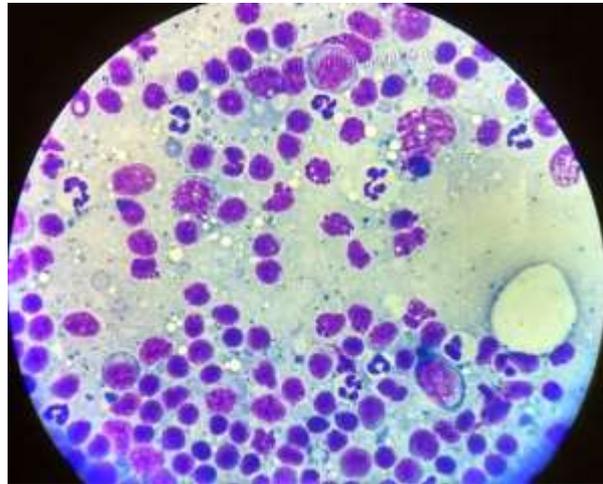
Fotografia 1 - Lâminas de esfregaço de linfonodo poplíteo na objetiva 40x (fotografia A) e objetiva 100x (fotografia B), coradas com kit panótico rápido LaborClin®. Forma amastigota do protozoário parasitando macrófagos



Fonte: Arquivo pessoal

Apesar do método de PAAF ser de alta especificidade, existem limitações ao seu uso, por ser um método que exige prática do profissional e apresenta dificuldade na punção do material, quando em linfonodos reduzidos, por exemplo. Essas limitações levam o método sorológico ser o mais utilizado pelos profissionais (ZANETTE, 2006). Em consonância com esta pesquisa, Sousa, 2012, encontrou 28 animais positivos (90,33%) e 3 animais negativos (9,67%) utilizando a técnica de PAAF, e constatou também que não houve diferença entre o diagnóstico por PAAF e o sorológico.

Fotografia 2 - Presença de neutrófilos e a forma amastigota da *Leishmania* spp parasitando macrófagos na objetiva 40x, corada com kit panótico rápido LaborClin®



Fonte: Arquivo pessoal.

Em um estudo em que foram utilizados 32 cães entre machos e fêmeas para analisar materiais obtidos por linfonodos, medula óssea, baço, sangue periférico e pele, de animais sorologicamente positivos para os testes de ELISA® e RIFI, observou-se a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp em linfonodo pré-escapular com incidência de 37,5% e linfonodo poplíteo também com incidência de 37,5% (FURTADO *et al.*, 2011). Esses resultados (GRÁFICO I) são reforçados por esta pesquisa, que obteve altos índices de positividade nos linfonodos poplíteos, embora os pré-escapulares e submandibulares tenham apresentado taxas sensivelmente mais elevadas.

Moreira *et al.*, (2002) encontraram 50% de positividade do total das amostras de punção de linfonodo poplíteo coradas com o método de *Romanowsky* para a pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp, todavia os animais de sua pesquisa não passaram por métodos laboratoriais para o diagnóstico da LVC, sendo diagnosticados apenas clinicamente. Talvez isso explique a baixa taxa de positividade frente a esta pesquisa. Já no presente estudo, dos animais diagnosticados como positivos para LVC através do ELISA®, 73,97% foram positivos para o método de PAAF, com lâminas coradas com o kit panótico rápido LaborClin®.

Em um relato de caso de uma cadela atendida no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia com suspeita de Leishmaniose visceral canina, Rodrigues

(2013) concluiu que o teste parasitológico é um método eficaz no diagnóstico de LVC, por ser um método de baixo custo, rápida execução e elevada sensibilidade.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o método de PAAF para o diagnóstico de LVC é o exame que apresenta melhor custo-benefício e apresentou bons resultados na pesquisa de formas amastigotas dos linfonodos submandibulares, pré-escapulares e poplíteos de cães sorologicamente positivos, tendo em vista a exclusão de outras doenças infecciosas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaríamos de agradecer a Deus, pelo dom da vida hígida, pois sem saúde não seria possível concluirmos o presente trabalho, à nossa professora mestra e orientadora Patrícia Natalícia, pela paciência e total apoio, pelas madrugadas de esclarecimentos e aprendizado, aos nossos pais, pelo apoio moral e carinho durante todo nosso trajeto, nossos irmãos, pelo carinho, apoio e por toda a ajuda que nos deram, os nossos companheiros e companheira pelo carinho e apoio incondicional, todos os membros do Centro de Controle de Zoonozes, pela oportunidade e paciência e aos funcionários do laboratório de histopatologia das Faculdades Integradas do Norte de Minas - FUNORTE.

REFERÊNCIAS

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. p. 9, 12, 122, 2006.

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. p.28-29, 2014.

BRASIL, Ministério da saúde. **Portal da saúde**. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/727-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11-leishmaniose-visceral-lv/11858-vacinacao-leishmaniose>>. Acesso em: 21 set. 2016.

COLARES, A. V. M.; SILVA, S. B.; ALMEIDA, P. N. M. **Levantamento das principais patologias que acometem cães de companhia no município de Montes Claros/MG.** Congresso de Medicina Veterinária de Especialidades. Curitiba, 2015.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática **Revista Pan Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2 p. 47- 57, 2012.

FERREIRA, P. R. B.; LARANJEIRA, D. F.; OLIVEIRA, L. S.; MALTA, M. C. C.; GOMES, M. C.; BASTOS, B. L.; PORTELA, R. W.; BARROUIN-MELO, S. M. Teste de ELISA® indireto para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral em canídeos silvestres. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Salvador, v. 33, n. 4, p. 528-534, 2013.

FURTADO, M. V. L.; VIOL, M. A.; BABO-TERRA, V. J. Pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp. em linfonodos, medula óssea, baço, pele e sangue de cães naturalmente infectados. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 30, Ed. 177, Art. 1198, 2011.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; LINS, G. L.; COELHO, M.; ROCHA, M. F.; DIAS, C. L. F.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Salvador, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; NUNES, C. M.; SILVA, T. C. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, E. P. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 103-106, 2002.

MOREIRA, P. R. R. **Apoptose em linfonodos de cães com leishmaniose visceral.** Dissertação. Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP. Jaboticabal, 2010.

MOURA, S. T.; FERNANDES, C. G. N.; PANDOLPHO, V. C.; RODRIGUES E SILVA, R. Diagnóstico de leishmaniose canina na área urbana do município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 101- 102, 1999.

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**, São Paulo, Ano VII, n. 13, p.6-7, 2009.

RODRIGUES, R. D.; SOUZA, R. R.; GOMES, L. R.; JÚNIOR, L. M. S.; SILVA, A. L. D. A.; MEDEIROS, A. A. Leishmaniose Visceral Canina–Diagnóstico Parasitológico: Relato de Caso. **Vet. Not.**, Uberlândia, v.19, n. 1, p. 1-6, jan./jun.2013.

SILVA, A. R. S. **Leishmaniose visceral canina: estudo imaginológico em cães naturalmente infectados.** Tese. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2014.

SOUSA, M. V. C. **Fatores que interferem na sensibilidade do teste parasitológico no**

diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina. 2012. 51 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, 2012. Disponível em<<http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/13082>>. Acesso em 10 mai 2017.

TEIXEIRA, L. V.; LOPES T. A.; MARTINS, D. B.; FRANÇA, R. T.; FIGHERA, R. A. Punção aspirativa por agulha fina como método de coleta de material para a histopatologia no osteossarcoma canino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, Feb. 2010.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2006. 70 f. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2006. Disponível em<<http://hdl.handle.net/11449/92183>>. Acesso em: 21 set 2016.