

## **Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina**

### ***Available and possible methods for the diagnosis of American canine visceral leishmaniasis***

**Cássia Rejane Brito Leal**

Departamento de Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS, Brasil

---

#### **RESUMO**

Nesta revisão são apresentadas as técnicas disponíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana, em especial para o diagnóstico do reservatório doméstico canino, sendo discutidas as vantagens e desvantagens de cada método, em termos de diagnóstico individual, em programas de controle e para avaliação epidemiológica.

**PALAVRAS-CHAVES:** Métodos de diagnóstico laboratorial. Leishmaniose visceral americana canina.

#### **ABSTRACT**

This review presents available techniques for American Visceral Leishmaniasis diagnosis, especially for the diagnosis of the canine domestic reservoir, discussing advantages and disadvantages of each method, in terms of individual diagnosis, in control and epidemiologic evaluation programs.

**KEY WORDS:** Laboratory diagnosis methods. Canine american visceral leishmaniasis.

O diagnóstico de uma enfermidade como a leishmaniose visceral americana (LVA) requer o uso de métodos que possam, de maneira segura e confiável, identificar os indivíduos infectados. As técnicas empregadas para este fim devem ser providas de algumas propriedades, tais como: capacidade de detecção da infecção em sua fase inicial, resultados precisos, fácil execução, baixo custo e repetibilidade. A escolha do método ou teste de diagnóstico deve ser orientada após cuidadosa avaliação da situação na qual será empregado. Variáveis como características epidemiológicas da doença, dados de prevalência e incidência, hospedeiros envolvidos, modo de transmissão e período de incubação, dentre outras, precisam ser conhecidas.

O diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina (LVA canina) pode ser realizado por diversos métodos, e a confiabilidade desse diagnóstico será proporcionada pela combinação de técnicas, uma vez que não há uma única técnica que possa de modo inequívoco indicar a infecção.

A LVA canina é uma doença severa, caracterizada por evolução crônica com sintomas viscerocutâneos que ocorrem em cerca de 50% dos cães infectados. Estes cães podem apresentar alterações renal, hepática, ocular e cutânea; muitos, no entanto, podem permanecer por longos períodos com infecção assintomática.

Cães infectados e assintomáticos apresentam um perfil de resistência ao parasita associado com uma resposta imune celular, manifestada por uma forte resposta proliferativa dos linfócitos do sangue periférico contra antígenos de *Leishmania* e produção de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*. Em contraste, animais doentes apresentam depressão das funções mediadas pelas células T e altos níveis de anticorpos específicos.<sup>1,2,3</sup>

O diagnóstico clínico da LVA canina é dificultado pela variabilidade dos sinais e pelo grande número de animais sem manifestações clínicas. Dessa forma, o diagnóstico laboratorial é uma importante ferramenta para identificação dos animais infectados.

O diagnóstico de certeza baseia-se na demonstração das formas amastigotas presentes na pele, no sangue ou em órgãos linfóides. Pode-se considerar que a detecção do parasito constitui o padrão ouro no diagnóstico da LVA canina. Porém, é importante ressaltar que esses métodos apresentam limitações, tanto pela sensibilidade, tendo em vista a variação na intensidade do parasitismo, como por dificuldades técnicas ou operacionais que possam interferir na obtenção do material.

A demonstração do parasito pode ser conseguida em esfregaços sanguíneos confeccionados com material obtido de biópsia de medula óssea, aspirado de baço ou linfonodo ou de fragmento de pele. Os corantes de Giemsa, Wright, Leishman ou Panóptico<sup>®</sup> podem ser usados com resultados muito similares na evidência das formas amastigotas. De baixo custo, esse método requer profissional especializado para execução da coleta do material e leitura das lâminas. A sensibilidade dessa técnica pode variar de 70% a 98%, a depender da qualidade do material, do período de evolução da infecção, do estado imunitário do animal e até mesmo do número e tempo de leitura das lâminas.<sup>4-7</sup>

BARROUIN-MELO *et al.*<sup>8</sup> confirmaram a segurança da técnica de punção esplênica em cães como uma alternativa ao diagnóstico direto em lâmina e também para obtenção de amostras para cultura e métodos moleculares.

O material usado para a confecção de lâminas também pode ser destinado ao procedimento de cultivo axênico em hamster (*Mesocricetus auratus*) e cultivo em meios artificiais.

A inoculação em hamster é um procedimento de boa sensibilidade, mas a demora na reprodução da infecção inviabiliza esse método como rotina para o diagnóstico da LVA canina. Em estudo realizado por CORTADA<sup>9</sup> um período de até 108 dias foi necessário para obter resultado positivo em animal inoculado. Os animais inoculados devem ser observados por até um ano, sendo então esse método mais importante para investigações epidemiológicas a fim de confirmar não só a presença do parasito, mas também sua espécie em conjunto com outros métodos.<sup>10,4</sup>

O cultivo da *Leishmania* pode ser conseguido pelo uso de meios artificiais. O meio de cultura NNN (Neal, Novy e Nicolle), com fase líquida constituída por Schneider (Sigma) ou caldo infuso de cérebro e coração (BHI) acrescido de soro fetal bovino e antibióticos, pode ter boa eficiência no diagnóstico da LVA canina. Os parasitos crescem em cultura no período de 4 dias a 6 semanas; em geral, a maioria das culturas mostra-se positiva em 7 a 10 dias.

A LVA canina pode ser diagnosticada indiretamente por métodos sorológicos ou técnicas de imunodiagnóstico. Os métodos sorológicos auxiliam o estabelecimento do diagnóstico, sendo mais empregados em inquéritos epidemiológicos.

O teste de hipersensibilidade tardia ou teste de intradermoreação de Montenegro (IDRM) não tem bom desempenho para o diagnóstico da LVA canina, pois a resposta celular contra *Leishmania* não é bem evidenciada durante o curso da infecção.<sup>7</sup>

Os antígenos purificados têm melhor desempenho no diagnóstico que os antígenos brutos, mas sua preparação requer métodos de purificação sofisticados. Uma alternativa é a produção de antígenos recombinantes, cujo desenvolvimento foi incrementado na última

década. Muitos já foram disponibilizados para o diagnóstico da LVA humana e/ou canina.

A maioria dos testes sorológicos utiliza antígenos de promastigotas obtidas em culturas, o que pode comprometer a especificidade do teste devido à possibilidade de reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae.

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utiliza como antígeno promastigotas de várias espécies do gênero *Leishmania* fixadas em lâmina. Pode ser usada para pesquisa de IgM ou IgG, mas está suscetível às reações cruzadas com diversos outros agentes que infectam os cães. Em regiões de ocorrência da leishmaniose tegumentar americana (LTA) e doença de Chagas esse teste pode não ser a melhor opção para o diagnóstico da LVA canina, se usado isoladamente. Contudo, é bastante utilizado em inquéritos soroepidemiológicos e em programas de controle da doença.<sup>10</sup>

O ensaio de imunoadsorção enzimática (Elisa) é um teste rápido, de fácil execução e leitura. Tem boa sensibilidade e especificidade, permitindo o processamento de grande número de amostras simultaneamente. Também vem sendo utilizado em programas de controle<sup>10</sup> e em estudos epidemiológicos. As possíveis reações cruzadas podem ser minimizadas pelo uso de antígenos purificados ou recombinantes. A leitura automatizada elimina erros de interpretação e torna a execução do teste mais simples.

O teste de aglutinação direta (DAT) foi desenvolvido, inicialmente, para o diagnóstico da LVA humana, mas tem sido usado em caráter experimental para o diagnóstico da LVA canina. Sua execução é simples e o teste é quantitativo, porém requer longo período de incubação (18 horas), o que pode ser um fator limitante do seu uso.

Outro teste, muito semelhante ao DAT, é o *fast agglutination-screening test*, também chamado de teste de aglutinação rápida (FAST), cujo período de incubação é curto (três horas). O FAST é apenas qualitativo e seu desempenho, associado à facilidade de execução, o torna um bom candidato como teste de triagem da LVA canina.<sup>11</sup>

Um teste de imunocromatografia foi desenvolvido para o diagnóstico da LVA humana, e vem sendo aplicado em estudos para a LVA canina. O teste rápido anticorpo anti-*Leishmania donovani* (TraLd) utiliza o antígeno recombinante rK39, podendo ser aplicado para amostras de soro ou sangue. A proteína A conjugada com ouro coloidal, como sistema de detecção deste antígeno, permite uma ligação com o anticorpo específico em segundos e a totalidade do teste pode ser completada entre 1-10 minutos.<sup>12</sup> Trabalho de GENARO *et al.*<sup>13</sup> comparou este teste com o Elisa e a RIFI empregando amostras de cães, verificando que seu desempenho foi superior pela ausência de reações cruzadas com *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*.

A técnica de Western blot (WB) é descrita

como a mais sensível e específica para detecção da infecção canina, tendo desempenho superior a RIFI ou Elisa. Em 2006, um estudo com infecção experimental em cães revelou que o WB foi capaz de discriminar animais na fase de infecção recente ou tardia. Bandas imunodominantes foram detectadas indicando, inclusive, o prognóstico negativo para animais cujo parasitismo persistiu após o tratamento. Isso sugere que essa técnica pode ser usada como preditora da infecção e do parasitismo no cão.<sup>14</sup>

Os exames hematológicos podem auxiliar no diagnóstico, especialmente em regiões de ocorrência de outras enfermidades, cuja sintomatologia possa ser confundida com a LVA canina. A dosagem de proteínas plasmáticas e a inversão nas frações albumina gamaglobulina podem ter forte associação com a infecção nos cães.

Podemos concluir que o diagnóstico da LVA canina deve ser realizado com critério, empregando mais de uma técnica para triagem e confirmação. Devem-se considerar vários parâmetros como o diagnóstico epidemiológico, clínico, parasitológico, sorológico e exames complementares.

## REFERÊNCIAS

1. Lanotte G, Rioux JA, Periers J, Vollhardt Y. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes evolutives de la leishmaniose viscerale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalite epidemiologique. Ann Parasitol. 1979;54:277.
2. Sacks DL, Lata Lal S, Shvivastava SN, Blackwell J, Neva FA. An analysis of T cell responsiveness in indians kalazar. J Immunol. 1987;38:908-13.
3. Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJ, Rutten VP, Gebhard D, Del Real G, Ruitenber EJ. *Leishmania infantum*-specific T cell lines

**Financiamento:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). Brasil. Proc-04/13192-6.

Artigo referente à palestra apresentada no II Fórum de Discussão da Sociedade Paulista de Parasitologia: Leishmaniose visceral americana, situação atual e perspectivas futuras. Organizado por Regina M. B. Franco, da Sociedade Paulista de Parasitologia, Vera L. F. de Camargo-Neves e Cecília Abdalla, da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, o evento foi realizado em 3 de julho de 2007, no auditório Luiz Mussolino (SES-SP).

- derived from asymptomatic dogsthat lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. Eur J Immunol. 1995; 25:1594-1600.
4. Pessoa SB, Martins AV. Gênero *Leishmania*; *Leishmania donovani*/leishmaniose visceral ou calazar. In: Rey, L. Parasitologia Médica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988. p. 67-77;104-24.
  5. Marzochi MCA, Marzochi KBF, Schubach AO. Leishmaniose Visceral Americana (Calazar Americano ou Neotropical). In: Cimermann B e Cimermann S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 65-80.
  6. Genaro O. Leishmaniose visceral americana. In: Neves, DP. Parasitologia Humana. 10 ed. São Paulo: Atheneu; 2003. p.56-72.
  7. Medeiros IM, Nascimento ELT, Hinrichsen SL. Leishmanioses (visceral e tegumentar). In: Hinrinchsen SL. DIP - Doenças Infeciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 398-409.
  8. Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Andrade Filho FA, Julião FS, Trigo J, Franke CR, et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on assymptomatic and symptomatic animals. Vet J. 2006;171:331-9.
  9. Cortada VMCL. Leishmaniose visceral canina no município de Anastácio, Mato Grosso do Sul [dissertação de mestrado]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul/Fiocruz; 2000.
  10. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília (DF); 2003.
  11. Silva ES, Schoone GJ, Gontijo CMF, Brazil RP, Pacheco RS, Schallig HDFH. Application of Direct Agglutination Test (DAT) and Fast Agglutination Screening Test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. Kinetoplastid Biol and Disease. 2005;4:4.
  12. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Cad Saúde Pública. 2004;20(1):259-65.
  13. Genaro O, Costa RT, França-Silva JC, Reis AB, Silva JC, Vieira EP, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis of dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi*, in Brasil. In: First World Congress on Leishmaniasis, 1997. Acta Parasitologica Turcica. Istanbul, Turkey, 1997;21:93.
  14. Talmi-Frank D, Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Baneth G. Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. Clin Vaccine Immunol. 2006;13(2):271-6.

Recebido em: 14/05/2009  
Aprovado em: 26/08/2009

**Correspondência/correspondence to**  
Cássia Rejane Brito Leal  
Rua Senador Filinto Muller, 2.443 – Jardim Ipiranga  
CEP: 79070-900 – Campo Grande/MS – Brasil  
Tel.: 55 67 3345-3612  
E-mail: cassialeal@nin.ufms.br