

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

TUANNE ROTTI ABRANTES

AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE CÃES
DOMÉSTICOS EM ITAIPUAÇU – MARICÁ, ESTADO
DO RIO DE JANEIRO, ÁREA DE OCORRÊNCIA DE
CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Rio de Janeiro

2012

Avaliação clínica e laboratorial de cães domésticos em
Itaipuaçu – Maricá, Estado do Rio de Janeiro, área de
ocorrência de casos de leishmaniose visceral canina

TUANNE ROTTI ABRANTES

Dissertação apresentada ao curso de Pós- Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Fabiano Borges Figueiredo e Dra. Maria de Fátima Madeira.

Rio de Janeiro

2012

TUANNE ROTTI ABRANTES

Avaliação clínica e laboratorial de cães domésticos em
Itaipuaçu – Maricá, Estado do Rio de Janeiro, área de
ocorrência de casos de leishmaniose visceral canina

Dissertação apresentada ao curso de
Pós- Graduação em Pesquisa Clínica
em Doenças Infecciosas do Instituto
de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências.

Orientadores: Dr. Fabiano Borges Figueiredo
Dra. Maria de Fátima Madeira

Aprovada em / / .

BANCA EXAMINADORA

Dr. Sandro Antônio Pereira (Presidente) IPEC/Fiocruz

Dr. Valmir Laurentino Silva (Componente) ENSP/ Fiocruz

Dra. Fernanda Nazaré Morgado (Componente) Fundação
Técnico-Educacional Souza Marques

Dr. Rodrigo Caldas Menezes (Suplente) IPEC/Fiocruz

“No final, vai dar tudo certo!”

(Fabiano Figueiredo)

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades.

Aos meus pais por toda luta e esforço, permitindo a minha chegada até aqui. Obrigada pelo apoio, e por terem sido meu alicerce. À minha mãe pela amizade, paciência, amor e ajudar nos momentos mais difíceis. Ao meu pai, pelo amor à nossa família, por ter me ensinado a ser dedicada, determinada e lutar pelos meus objetivos.

Aos meus lindos cachorros Aisha e Bob Marley e meu gatinho Fred, pelo companherismo e por serem a alegria da nossa casa.

Aos meus avós e tios pela convivência e carinho.

Aos meus padrinhos, apesar da distância, sempre me amaram e foram fundamentais na minha criação.

Ao meu orientador, Dr. Fabiano, por ser o chefe mais fofo! Obrigada por todas as oportunidades, pelos ensinamentos, pela paciência, orientação, força, carinho e amizade.

À minha orientadora, Dra Fátima, pelo apoio, orientação, dedicação e carinho.

Agradeço sempre por tê-los como meus orientadores. Posso dizer que vocês são fofos e especiais demais!

À minha querida amiga Adriana Mayrink, por ter sido uma excelente professora, contribuindo para a minha educação, pela ajuda na conquista do estágio na Fiocruz, por estar perto em todos os momentos importantes da minha vida e por ser o meu exemplo.

Aos meus grandes amigos Claudiane Nascimento, Ana Caroline, Carolina Perié, Denise Amaro, Denise Torres, Érica Guerino, Carla de Castro, Stella Maris, Valéria Batista e Tiago Abrahão, por serem fundamentais na minha vida.

Ao querido amigo Frederico Coutinho pelos ensinamentos, apoio e carinho.

A todos do LAPCLIN-DERMZOO pela ajuda, amizade, carinho e pelos momentos de descontração. Ao Sandro Pereira, Rodrigo Caldas, Isabella Dib, Tânia Pacheco e Fabiano Borges pelos ensinamentos, paciência e ajuda. À Denise Amaro, Denise Torres, Érica Guerino, Lívia Cardoso, Amanda Akemi, Marina Furtado, Marina Pinheiro, Carolina Perié, Ana Caroline de Sá, Monique Campos, Jéssica Nunes, Jéssica Boechat, Paula Viana, Iasmin Coelho, Luciana, Viviane Boechat, Luisa Miranda, Tatiana, Beatriz Wanderosck, Carla Honse, Emília, Carlos, Artur Augusto e Artur Mandacary pela grande amizade, companheirismo, alegria e ajuda.

A todos os médicos veterinários da Veterinária Xanadu: Carlos, Maurício, Frederico, Tiago, Marcus, Pedro, Stella, Valéria, Silvia, Ticiane, Marcelo pela ajuda e carinho, assim como todos os funcionários, desde os enfermeiros às recepcionistas.

Aos que me ajudaram nas coletas a campo: Carlos, Carolina, Fabiano, Denise e Artur. Apesar das dificuldades, como a distância, pude contar com o companheirismo de vocês.

À toda equipe dos laboratórios: VigiLeish (IPEC), Serviço de Anatomia Patológica (IPEC) e o Setor de Imunodiagnóstico (ENSP).

E a todos que, direta ou indiretamente, tornaram possível a realização desta conquista, agradecerei eternamente.

Abrantes, T. R. **Avaliação clínica e laboratorial de cães domésticos em Itaipuaçu – Maricá, estado do Rio de Janeiro, área de ocorrência de casos de leishmaniose visceral canina.** Rio de Janeiro, 2012.39f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A leishmaniose visceral americana é uma zoonose que afeta os seres humanos e outras espécies de animais domésticos e silvestres. É causada pelo protozoário *Leishmania (L.) chagasi* e sua transmissão ocorre através de picadas do inseto *Lutzomyia longipalpis*. No Brasil, esta doença continua sendo um desafio importante em questões de Saúde Pública, uma vez que está em processo de expansão em várias regiões, ocorrendo casos humanos e caninos tanto na área rural quanto em áreas urbanas. A partir de um segundo caso de leishmaniose visceral canino (LVC), notificado no bairro de São Bento da Lagoa, Itaipuaçu, município de Maricá, Rio de Janeiro, foi realizado um inquérito epidemiológico, através de busca ativa, em 145 cães. Os cães foram submetidos ao exame clínico e sedados para coleta de sangue, de fragmentos cutâneos e punção de medula óssea. Para a realização dos exames sorológicos, foram utilizadas as técnicas de imunofluorescência indireta, ELISA e o teste imunocromatográfico rápido. O diagnóstico parasitológico foi realizado através da cultura parasitológica, histopatologia e imunohistoquímica de fragmentos cutâneos. Com o material obtido do aspirado de medula óssea foi realizada a cultura parasitológica e técnica de imunohistoquímica através do fixador “cell block”. Na avaliação sorológica, 15,1% foram positivos na imunofluorescência indireta, 12,2% no ELISA e 6,3% no teste imunocromatográfico rápido. Seis cães (4,1%) foram positivos em pelo menos um dos testes parasitológicos. *Leishmania* sp. foi isolada através da cultura parasitológica em amostras de pele íntegra e medula óssea de dois animais e em um fragmento de lesão, apresentando uma prevalência de 1,4%. Estas amostras foram caracterizadas como *Leishmania chagasi*. Dentre os animais sororretores e ou com resultado parasitológico positivo, apenas dois animais apresentaram sinais clínicos compatíveis com LVC. A detecção de casos autóctones de LVC em Itaipuaçu e a alta prevalência de cães sororretores, confirma a circulação desse parasita nesta região e faz um alerta para o risco de sua expansão no estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, diagnóstico, zoonose, cão, Maricá

Abrantes, T. R. **Clinical and laboratory evaluation of domestic dogs in Itaipuaçu - Marica, Rio de Janeiro state, area of occurrence of cases of canine visceral leishmaniasis. Rio de Janeiro, 2012.**39p. Master [Science dissertation in clinic research in infectious diseases] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Abstract

American visceral leishmaniasis is a zoonotic disease that affects humans and other species of domestic and wild animals. It is caused by the protozoan *Leishmania (L.) chagasi* and its transmission occurs through bites of vector sandfly *Lutzomyia longipalpis*. In Brazil, this disease remains as a major challenge in public health issues, as it is in expanding process in several regions, leading to the occurrence of human and canine cases, both in rural and urban areas. After the occurrence of the second case of canine visceral leishmaniasis (CVL), which was notified in the District of São Bento da Lagoa, Itaipuaçu, Municipality of Marica, Rio de Janeiro, an epidemiological survey was carried out on 145 dogs through active search sampling. The dogs were submitted to clinical examination and sedation for collection of blood and tissue samples and bone marrow aspiration. Serological analysis was performed by using the following techniques: immunofluorescence, ELISA and immunochromatographic test. The parasitological diagnosis in cutaneous fragments was performed by parasitological culture, histopathology and immunohistochemistry. The bone marrow aspirate was submitted to parasitological culture and immunohistochemistry, after fixation with "cell block." In serological analysis, 15.1% were positive by indirect immunofluorescence, 12.2% by ELISA and 6.3% by immunochromatographic test. Six dogs (4.1%) were positive by at least one of the parasitological tests. *Leishmania* sp. was isolated by culture in samples of healthy skin and bone marrow of two animals and in a one sample of cutaneous lesion, with a prevalence of 1.4%. These samples were characterized as *Leishmania chagasi*. Among the animals which were seropositive and/or with positive parasitological tests, only two showed clinical signs consistent with CVL. The detection of autochthonous cases of CVL in Itaipuaçu and the high prevalence of seropositive dogs confirm the circulation of the parasite in this region and are can be considered as a warning sign for the risk of its expansion in the State of Rio de Janeiro.

Keywords: *Leishmania chagasi*, diagnosis, zoonotic disease, dog, Marica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	6
3. OBJETIVOS	7
3.1. OBJETIVO GERAL.....	7
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
4. METODOLOGIA.....	8
4.1 DESENHOS DO ESTUDO E POPULAÇÃO ALVO	8
4.1.1 Critérios de inclusão	8
4.1.2 Critérios de exclusão	8
4.2. ÁREA DE ESTUDO	9
4.3. MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS	11
4.3.1. Manejo dos animais	11
4.3.1.1 Avaliação clínica	11
4.3.1.2 Coleta de espécimes clínicos para o diagnóstico.....	11
a) Sedação.....	11
b) Sangue venoso.....	11
c) Biópsias de pele.....	12
c) Punção aspirativa de medula óssea.....	12
4.4. EXAMES LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO E IDENTIFICAÇÃO ETIOLÓGICA.....	13
4.4.1 Provas sorológicas	13
4.4.1.1 Imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (EIE).....	13
4.4.1.2. Teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (<i>Dual Path Platform - DPP[®]</i>)	13
4.4.2 Histopatologia.....	14
4.4.3 Imunohistoquímica	14
4.4.4 Imunohistoquímica de aspirado de medula óssea com fixador “cell block”	14
4.4.5 Isolamento parasitário em meio de cultura.....	15
4.4.6 Eletroforese de enzimas (MLEE)	15
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4.6. PROCEDIMENTO ÉTICO	17
5. RESULTADOS.....	18
6. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÕES.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXOS	30
TERMO DE CONSENTIMENTO (ANEXO 1)	30
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO (ANEXO 2)	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da cidade de Maricá, Rio de Janeiro – 2011. **9**
- Figura 2.** Mapa da região de Itaipuaçu, Maricá, Rio de Janeiro – 2011. **9**
- Figura 3.** Área de estudo em Itaipuaçu, Maricá, Rio de Janeiro – 2009. **10**
- Figura 4.** Área de estudo em Itaipuaçu Maricá, Rio de Janeiro – 2010. **10**
- Figura 5:** Avaliação clínica e coleta de amostras, Itaipuaçu, Maricá, Rio de Janeiro – 2011. **12**
- Figura 6:** Animal infectado com presença de descamação e lesão em pavilhão auricular – Itaipuaçu, Maricá, Rio de Janeiro – 2012. **20**

LISTA TABELAS

Tabela 1: Resultado dos testes sorológicos realizados em 145 cães.	19
Tabela 2: Resultado das sensibilidades e especificidades dos testes sorológicos realizados em 145 cães	19
Tabela 3: Resultados dos exames parasitológicos e sorológicos dos seis animais com comprovação parasitológica.	19

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- BSA** – Bovine serum albumin
- CEUA** – Comissão de ética no uso de animais
- DAB** – Diaminobenzidina
- DPP®** - *Dual-Path platform technology*
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- EIE** - Ensaio imunoenzimático
- ELISA** - *Enzyme linked immunosorbent assay*
- ENSP** – Escola nacional de Saúde Pública
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- HE** – Hematoxilina-eosina
- HP**- Histopatologia
- H₂O₂** – Peróxido de hidrogênio
- IFI** – Imunofluorescência indireta
- IHQ** - Imunohistoquímica
- LAPCLIN-DERMZOO** – Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
- LTA** – Leishmaniose tegumentar americana
- LTC** – Leishmaniose tegumentar canina
- LVA** – Leishmaniose visceral americana
- LVC** – Leishmaniose visceral canina
- MLEE** – Multilocus enzyme electrophoresis
- NNN** – Meio de cultura Novy, Nicolle e McNeal
- N₂** – Nitrogênio líquido
- PBS** – Phosphate buffered saline
- RPM** – Rotações por minuto
- SFB** – Soro fetal bovino

SPSS – *Statistical Package for the Social Science*

TAD – Teste de aglutinação direta

TBS – Tampão de lavagem

TRIS – *Tris Buffeded saline*

VigiLeish – Laboratório de Vigilância em Leishmanioses

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que acometem o ser humano e diferentes espécies de animais, em regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo, nesse último, clinicamente classificadas como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) (Ministério da Saúde, 2006a; W.H.O., 2011).

As leishmanioses são zoonoses de grande importância em saúde pública, endêmicas em 88 países, infectando cerca de 350 milhões de pessoas em todo mundo. Atualmente acredita-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas, com uma incidência anual de 1 a 2 milhões de novos casos (W.H.O., 2011).

No Brasil, a LVA é causada por *Leishmania (Leishmania) chagasi* [sinônimo *L. (L.) infantum*] e tem como seu principal vetor *Lutzomyia longipalpis*, e o cão (*Canis familiaris*) como reservatório no ambiente doméstico e peridoméstico, ambos contribuindo para o ciclo de manutenção da doença (França-Silva et al., 2005).

Acredita-se que a introdução da *L. (L.) chagasi* no país, tenha sido durante a colonização europeia, por meio de cães infectados e tenha se adaptado aqui a novos hospedeiro e vetores (Shaw, 2002). Em meados dos anos 80, observou-se uma mudança drástica na distribuição da LVA no Brasil. Antes, restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes, alcançando a periferia de grandes centros urbanos. A partir dos anos 90, os estados do Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro-oeste), Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influenciar de maneira significativa nas estatísticas da LVA no Brasil (Ministério da Saúde, 2006). Recentemente, foram relatados casos caninos autóctones na cidade de São Borja (RS), região sul do país, onde não havia registro da doença, demonstrando a expansão da doença (Souza et al., 2009)

Classicamente, a leishmaniose visceral canina (LVC) pode apresentar um espectro de manifestações clínicas bem variadas, condicionadas a imunocompetência individual do animal. Entre os sinais clínicos mais comuns na LVC estão alterações cutâneas, principalmente descamação, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, localizadas mais freqüentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se, com grande frequência, onicogribose, esplenomegalia,

linfadenopatia, alopecia, dermatites, hiperqueratose, edema de membros, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, apatia, diarreia, hemorragia intestinal e vômito. Pode ocorrer também paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição, que geralmente levam à morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (Deane e Deane, 1955a; b; Marzochi et al., 1994; Almeida et al., 2005), podendo estes representar cerca de 40 a 60% da população soropositiva (Marzochi e Marzochi, 1997).

Após a avaliação clínica e laboratorial, os cães podem ser classificados em quatro estágios. O primeiro estágio corresponde aos cães expostos, que apresentam diagnóstico parasitológico negativo, bem como baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* e clinicamente normais ou apresentando sinais associados com outras doenças; o segundo estágio são os cães infectados, que apresentam exame parasitológico positivo, mas possuem baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*, são clinicamente saudáveis ou apresentam sinais clínicos compatíveis com outras doenças; terceiro estágio inclui os cães doentes, que possuem exames parasitológicos positivos e altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* com um ou mais sinais comuns na leishmaniose; e quarto estágio são os cães severamente doentes, com condições clínicas severas, nefropatia ou insuficiência renal crônica, alterações oftálmicas, articulares, entre outros (Paltrinieri et al., 2010).

O diagnóstico das leishmanioses deve considerar a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais contam com ferramentas de diferentes complexidades, cuja aplicabilidade pode variar de acordo com a forma da doença (LTA ou LVA) ou da infraestrutura local. Os métodos parasitológicos incluem: identificação microscópica direta e isolamento do parasita em meio de cultura a partir de diferentes espécimes clínicos. Em áreas endêmicas de LVA, os testes sorológicos são usados como ferramenta nos inquéritos epidemiológicos para diagnóstico e posterior recolhimento dos cães considerados positivos (Ministério da Saúde, 2006).

Os espécimes clínicos coletados para o diagnóstico parasitológico podem ser obtidos a partir de aspirado de medula óssea, baço, fígado, linfonodos e em alguns casos de biópsias de pele íntegra, lesão ou vísceras. No exame parasitológico direto, é realizada a pesquisa de formas amastigotas em lâminas de impressão por aposição do material coletado na punção, corado pela técnica de Giemsa ou Leishman. O exame parasitológico indireto visa o isolamento do agente infeccioso em meios de cultivo apropriados, sendo comumente utilizado o meio de cultura bifásico Novy, MacNeal, Nicole (NNN) e meio Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino (Ministério da Saúde, 2006). O teste padrão de referência para o diagnóstico das leishmanioses é a cultura parasitológica positiva (Chouihi et al., 2009), porém

não é realizada na rotina, principalmente devido ao grande volume de trabalho e estrutura laboratorial especializada.

A análise histopatológica dos fragmentos coletados através da biópsia também é de fundamental importância no diagnóstico da LVA, pois pode identificar as formas parasitárias e ao mesmo tempo contribuir para o diagnóstico diferencial, porém tem uma baixa sensibilidade e muitas vezes pode ser inconclusiva (Tafari et al., 2004).

A imunohistoquímica (IHQ) vem sendo utilizada para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em amostras de diversos tecidos, como pele íntegra, linfonodo, fígado e baço, apresentando um desempenho diagnóstico superior ao exame histopatológico corado pela hematoxilina eosina (HE), além proporcionar uma leitura mais rápida, pois permite fácil visualização dos parasitos marcados (Tafari et al., 2004), mas ambas as técnicas possuem precisão limitada e não permitem a identificação de espécies (Quintela et al., 2009).

Amostras de medula óssea são excelentes para a detecção de *L. (L.) chagasi* em cães por métodos parasitológicos e moleculares (Moreira et al., 2007; Quaresma et al., 2009; Toplu e Aydogan, 2011). A técnica de bloco de células ou “cell block” é amplamente utilizada na medicina humana para o diagnóstico de várias doenças, utilizando células isoladas a partir de fluidos corporais ou aspirados (Nathan et al., 2000; Nga et al., 2005; Dharan, 2010). As células são concentradas por centrifugação ou filtração e um pellet de células resultante, é processado como uma amostra de tecido, o que permite o exame histopatológico e imunohistoquímico com excelente preservação da morfologia das células (Nathan et al., 2000), porém assim como a imunohistoquímica, não permite a identificação da espécie.

Na LVC, a distribuição do parasita pode ser extensiva, alcançando órgãos como baço, fígado, linfonodos, pele, medula óssea, etc. (Alvar et al., 2004), oposto do que ocorre no ser humano, onde o parasita é normalmente limitado à medula óssea, baço e fígado (Swenson et al., 1988). A presença do parasita nos mais diferentes tecidos e órgãos provocam reações características da LVC, entre as quais a ativação policlonal de linfócitos, produzindo elevados níveis séricos de imunoglobulinas, que, se por um lado não possui significado de proteção, por outro, facilita o diagnóstico laboratorial através de testes sorológicos, sendo a imunofluorescência indireta (IFI), um dos métodos mais empregados na rotina do diagnóstico da LVC. A IFI apresenta uma elevada especificidade e relativa sensibilidade, no entanto, algumas desvantagens, tais como, não automatização e avaliação subjetiva, têm sido apontadas como fatores limitadores para utilização em larga escala. Por outro lado, os ensaios

imunoenzimáticos (EIE), tais como *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) que são automatizados, possuem vantagens nesse aspecto (Rosati et al., 2003).

Nos últimos anos importantes avanços têm acontecido na elaboração de exames sorológicos para diagnóstico da *Leishmania*, incluindo testes de aglutinação direta (TAD) e ELISA, construídos a partir de antígenos puros ou recombinantes (El Harith et al., 1996; Ministério da Saúde, 2006a).

De acordo com o manual de controle da LVA, devem ser realizados inquéritos sorológicos (amostrais ou censitários) na população canina para avaliação da soroprevalência, empregando para isto a técnica de ELISA para triagem e a imunofluorescência indireta (IFI) para confirmação dos casos (Ministério da Saúde, 2006).

De um modo geral, os testes sorológicos são considerados muito sensíveis e específicos, entretanto, possuem limitações para detecção de baixos níveis de anticorpos e apresentam reatividade cruzada com a leishmaniose tegumentar canina (LTC), observada em áreas endêmicas de sobreposição (Ferrer et al., 1995). A sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos estão condicionadas a inúmeros aspectos e podem variar consideravelmente (Massunari et al., 2009).

Porém estudos vêm demonstrando alguns problemas encontrados na IFI quando comparada ao EIE, como baixa sensibilidade e especificidade, conseqüentemente gerando resultados falso positivos e falso negativos (Figueiredo et al., 2010b; Silva et al., 2011; Grimaldi et al., 2012).

A partir de 2012, nos inquéritos epidemiológicos, o ELISA passou a ser utilizado como teste confirmatório e o teste imunocromatográfico rápido *Dual-Path Platform technology* (DPP[®]), já validado pelo Ministério da Saúde (Nota técnica, 2012), como teste de triagem, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade, utilizando uma quantidade mínima de sangue, além dos resultados serem demonstrados em apenas 15 minutos (Grimaldi et al., 2012; Silva et al., 2012).

Com o crescimento geográfico e a urbanização da LVA é necessário estabelecer medidas de controle mais efetivas. Acredita-se que esta expansão para diversas regiões do Brasil pode ser atribuída a diversos fatores tais como: dificuldades na eliminação do reservatório, diversidade epidemiológica das regiões afetadas, capacidade adaptativa do vetor, medidas insuficientes no controle do vetor e alto custo financeiro e social, além de outros fatores desconhecidos (Oliveira et al., 2008).

Devido à severidade da LVA no ser humano e à complexidade do cenário epidemiológico, as ações sanitárias direcionadas para esta doença devem ser rigorosas. Assim, programas de controle são implantados nas áreas endêmicas, objetivando interromper o ciclo de transmissão. Tais programas assumem três pontos principais: detecção e tratamento dos casos humanos, borrifação de inseticidas no domicílio e peridomicílio; e monitoramento de cães domésticos, já que estes são a principal fonte de infecção para os insetos vetores, fato que tem direcionado grandes esforços na identificação e eliminação de animais considerados positivos, visando à interrupção do ciclo de transmissão (Ministério da Saúde, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A LVA encontra-se em processo de expansão em várias regiões brasileiras, sendo registrados casos humanos e caninos tanto em áreas rurais como em áreas urbanizadas (Bevilacqua et al., 2001; Gontijo e Melo, 2004; Ministério da Saúde, 2006).

No município do Rio de Janeiro, embora atualmente não sejam descritos, casos humanos de LVA, casos caninos são frequentemente diagnosticados, sendo que nos últimos anos, tem-se observado um aumento nos índices de soroprevalência canina em algumas regiões endêmicas, além da descrição de novos casos em outras cidades do estado onde não existiam casos autóctones (de Paula et al., 2009).

Em 2010, foi relatado um caso autóctone no bairro de Laranjeiras, zona sul do município do Rio de Janeiro (Figueiredo et al., 2010a). Durante os anos de 2011 e 2012 chegaram ao conhecimento da Vigilância Epidemiológica Estadual a ocorrência de casos de LVC nos municípios de Mangaratiba, Niterói, Rio de Janeiro e Volta Redonda, além da ocorrência de três casos humanos, um autóctone em Volta Redonda, outro indeterminado no Rio de Janeiro e o terceiro autóctone em Barra Mansa, que veio a óbito (Nota técnica, 2012)

A ocorrência de novos casos em várias regiões do município e estado do Rio de Janeiro, demonstra uma possível alteração no comportamento dessa endemia, possibilitando o surgimento de um surto em áreas urbanas, como já foi relatado em outras cidades brasileiras (Ministério da Saúde, 2006).

Foi identificado um segundo caso de LVC, no período de um ano, na região de Itaipuaçu, município de Maricá no estado do Rio de Janeiro. A notificação de um caso de LVC nesta região, onde anteriormente não havia registro de casos caninos ou humanos, expõe à fragilidade do controle da doença e o risco de sua expansão no estado do Rio de Janeiro, o que pode se agravar devido ao fato de que pouco se conhece sobre a dinâmica de transmissão nessa área.

Um importante passo para a vigilância da LVA no Rio de Janeiro, além de estudos relacionados à fauna flebotomínica local, é a avaliação de cães nas proximidades, para que o diagnóstico precoce possa ser instituído e as medidas preventivas tomadas em tempo hábil.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar clinicamente e por diferentes métodos laboratoriais cães domésticos, que residem em Itaipuaçu, Maricá, estado do Rio de Janeiro, região de ocorrência da leishmaniose visceral canina.

3.2. Objetivos Específicos

- Descrever as alterações clínicas encontradas nos animais e associá-las à infecção;
- Avaliar a soroprevalência da LVC utilizando as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (EIE) e o teste imunocromatográfico rápido na região de estudo;
- Avaliar a prevalência da LVC, através do isolamento em cultura a partir de fragmentos de pele íntegra, lesões cutâneas e amostras de medula óssea;
- Avaliar a prevalência da LVC, através da imunohistoquímica de aspirado de medula óssea com fixador “cell block”.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenhos do estudo e população alvo

Trata-se de um estudo seccional, com amostra de conveniência, que consistiu na investigação diagnóstica por busca ativa dos cães domiciliados no bairro São Bento da Lagoa, região de Itaipuaçu, cidade de Maricá, estado do Rio de Janeiro, através da realização de inquérito canino.

4.1.1 Critérios de inclusão

- Cães que residiam na região de estudo há mais de seis meses;
- Cães com idade igual ou superior a oito meses;
- Cães cujos proprietários aceitassem participar do estudo.

4.1.2 Critérios de exclusão

- Cães em estado geral ruim, sem condições de serem submetidos à sedação;
- Cadelas prenhas;
- Cães agressivos;
- Cães errantes;
- Cães submetidos a qualquer tratamento quimioterápico ou vacinal anti- *Leishmania*.

4.2. Área de Estudo

O município de Maricá (Figura 1) está localizado pelas coordenadas 22°55'10" de latitude Sul, 42°49'07" de longitude Oeste, a 5 metros de altitude e possui extensão territorial de 363 km² com uma população de 127.461 pessoas, com vegetação predominante constituída de Mata Atlântica. É dividida em quatro distritos: Maricá (sede), Ponta Negra, Inoã e Itaipuaçu (IBGE 2012). Itaipuaçu (Figuras 2, 3 e 4) possui uma população estimada com cerca de 30.000 habitantes, tendo uma taxa de crescimento relativamente alta, de cerca de 10% ao ano, devido à valorização imobiliária do local (IBGE, 2011).

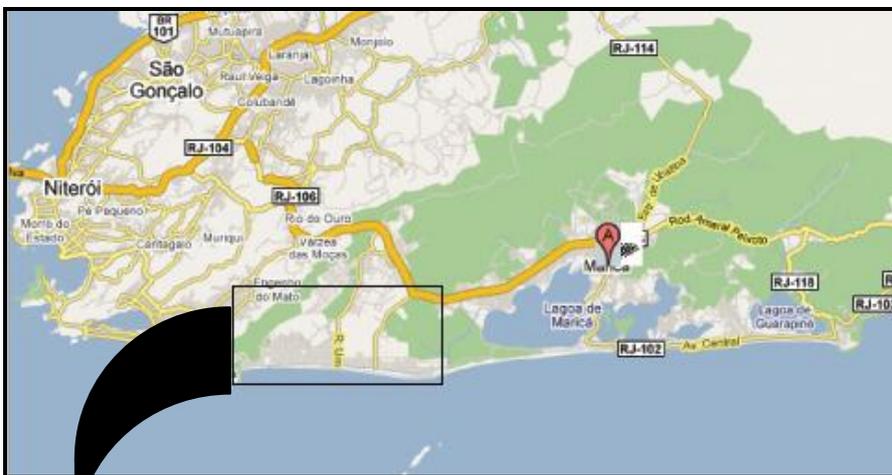


Figura 1: Mapa da cidade de Maricá, Rio de Janeiro – 2011.

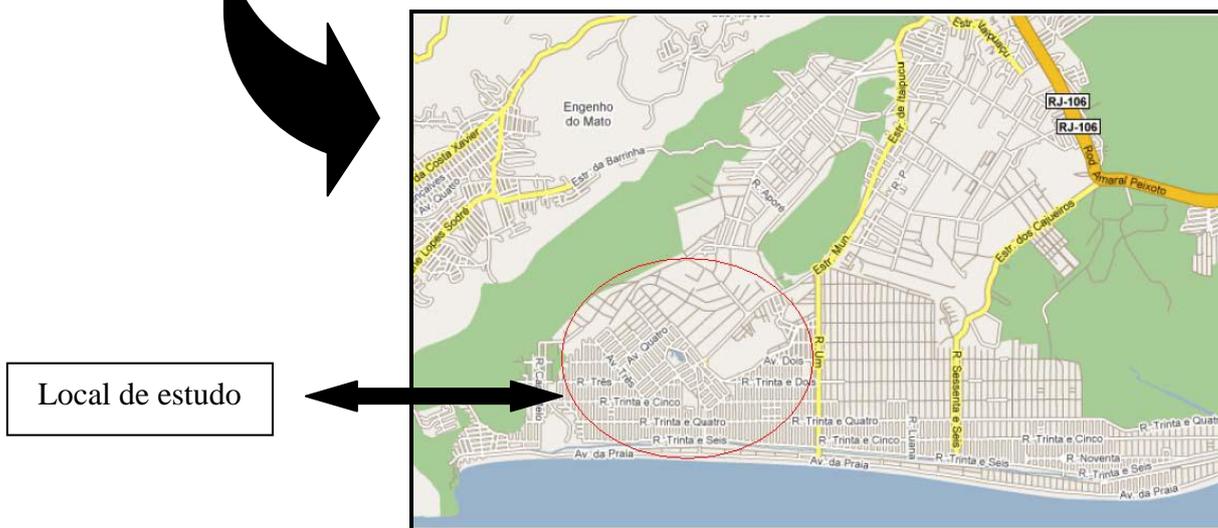


Figura 2: Mapa da região de Itaipuaçu, Maricá, Rio de Janeiro – 2011.



Figura 3: Área de estudo em Itaipuaçu, Maricá, Rio de Janeiro – 2009.

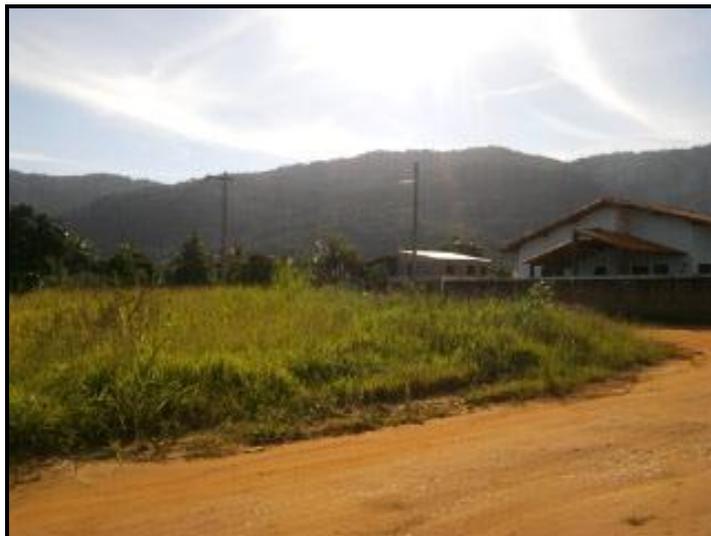


Figura 4: Área de estudo em Itaipuaçu, Maricá, Rio de Janeiro – 2010.

4.3. Materiais, Procedimentos e Técnicas

No momento da visita, era realizada uma entrevista com o proprietário do animal e solicitado ao proprietário a leitura e posterior assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1) para a realização do exame clínico e coleta de material biológico do animal.

4.3.1. Manejo dos animais

4.3.1.1 Avaliação clínica

Os cães foram amordaçados, contidos fisicamente e examinados detalhadamente (Figura 5) e as informações anotadas em uma ficha contendo identificação e sinais clínicos apresentados no momento da visita às residências (anexo 2).

4.3.1.2 Coleta de espécimes clínicos para o diagnóstico

a) Sedação

Após a avaliação clínica, realizou-se a sedação do animal com cloridrato de quetamina (10 mg/kg) associado ao maleato de acepromazina (0,2 mg/kg) por via intramuscular, e posteriormente o animal foi colocado sobre uma mesa de aço inoxidável para a coleta de espécimes clínicos.

b) Sangue venoso

Para a realização dos testes sorológicos IFI, ELISA e DPP®, foi coletado cerca de 5 mL de sangue, sem anticoagulante, por punção das veias cefálica ou jugular. As amostras foram transportadas sob refrigeração e, por centrifugação 5000 rotações por minuto (rpm), o soro foi separado e conservado a - 20°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

c) Biópsias de pele

Para a coleta do fragmento cutâneo por meio de biópsia, realizou-se tricotomia com lâmina de aço inoxidável descartável, antissepsia e anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2%, sem vasoconstrictor. Foram coletados quatro fragmentos de pele íntegra da região escapular de cada animal, utilizando “punch” de 3mm para exames parasitológicos direto e indireto. Dois fragmentos foram armazenados em salina estéril acrescida de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitocina), na tentativa do isolamento em cultura, e dois foram armazenados em formalina tamponada a 10%, para a realização dos exames histopatológico e imunohistoquímico. Das lesões tegumentares, quando presentes, também foram coletados dois fragmentos para exames parasitológicos.

c) Punção aspirativa de medula óssea

Em todos os animais tentou-se realizar o aspirado de medula óssea (MO), obtido do manúbrio do esterno, utilizando seringa de 20mL com agulha 40x12mm, após tricotomia, antissepsia e anestesia local com cloridrato de lidocaína 2%, sem vasoconstrictor. O material obtido foi semeado diretamente em meios de cultura NNN e Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino, para tentativa do isolamento da *Leishmania* sp. Uma parte desse material (cerca de 0,5 mL) foi acondicionado em tubo estéril com EDTA, acrescido do fixador “cell block” para a realização da imunohistoquímica, na tentativa da visualização de formas amastigotas.



Figura 5: Avaliação clínica e coleta de amostras, Itaipuaçu, Maricá, Rio de Janeiro - 2011.

4.4. Exames laboratoriais para o diagnóstico e identificação etiológica

4.4.1 Provas sorológicas

Foram empregados os testes de IFI, ELISA e DPP[®], utilizando os *kits* comerciais, ambos produzidos por BioManguinhos (FIOCRUZ; Rio de Janeiro) e distribuídos à rede pública. Os dois primeiros testes foram realizados no setor Imunodiagnóstico do Laboratório de Pesquisa e Serviço em Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ) e o DPP[®] realizado no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO) (IPEC/FIOCRUZ).

4.4.1.1 Imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático (EIE)

Para a IFI, as amostras foram diluídas a partir de 1:40 em microplacas e avaliadas até a diluição que não apresentasse reatividade. Para o ELISA, as amostras foram diluídas a 1:20, em duplicatas, cuja positividade foi determinada pela padronização do teste. A linha de corte entre amostras consideradas positivas (reatoras) e negativas (não reatoras) foi calculada tendo-se como base a média de leitura dos soros negativos mais dois desvio padrão.

4.4.1.2. Teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (*Dual Path Platform - DPP[®]*)

O teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (*Dual Path Platform - DPP[®]*) possui tecnologia já utilizada em testes de diagnóstico rápido para outras doenças, é produzido por Biomanguinhos (FIOCRUZ) para o diagnóstico da LVC. O *kit* contém um dispositivo impregnado com antígeno recombinante rK28 (quimera combinando K9, K26 e K39) de *L. (L.) chagasi* e permite a utilização de amostras de sangue ou de soro, fornecendo uma avaliação qualitativa do diagnóstico. O resultado foi obtido em 15 minutos, onde utilizou-se 5µl de soro de cada animal e a solução tampão, presente no *kit*, seguindo as recomendações do fabricante.

4.4.2 Histopatologia

Os fragmentos teciduais (pele e lesões) foram acondicionados em tubos do tipo *Ependorff*, contendo formalina tamponada a 10%. Os fragmentos foram desidratados e parafinados e os cortes histológicos obtidos corados com hematoxilina eosina (HE) para posterior observação em microscópio óptico. O diagnóstico definitivo dependia da visualização do parasito. As formas amastigotas possuem forma ovalada ou arredondada, contendo um núcleo e um cinetoplasto, sendo visualizadas no interior de células fagocitadas ou livres. Na histopatologia (HP), o núcleo e o cinetoplasto se coram de azul escuro e o cinetoplasto é fracamente eosinofílico (Genaro, 1995). Para correta visualização é imprescindível o exame em grande aumento (1000 X).

4.4.3 Imunohistoquímica

Os cortes histológicos obtidos a partir da clivagem dos blocos de parafina, foram fixados na lâmina silanizada. Os processos foram realizados, seguindo o protocolo de Quintela e colaboradores (2009). A positividade foi considerada pela observação de pelo menos uma estrutura marcada em castanho e morfológicamente compatível com uma amastigota.

4.4.4 Imunohistoquímica de aspirado de medula óssea com fixador “cell block”

O material obtido através de punção aspirativa de medula óssea foi armazenado em tubo estéril com EDTA, centrifugado 5000 rpm, durante 10 min e o sobrenadante foi descartado, sendo em seguida fixado com a solução “cell block” (850 mL de álcool absoluto, 100 mL de formaldeído e 50 mL de ácido acético). A mistura foi deixada em repouso durante 24 h para a fixação e a formação do bloco de células. O bloco de células foi então cortado e processado para inclusão em parafina. Os fragmentos foram fixados em lâminas silanizadas e posteriormente foram realizados processos similares aos da imunohistoquímica em fragmentos de pele.

4.4.5 Isolamento parasitário em meio de cultura

Os fragmentos teciduais (pele e lesões cutâneas), logo após a biópsia, foram mergulhados em solução PBS, pH 7,4 acrescido de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitocina) e conservados à temperatura de 4°C por 24 horas. Após tal período, as amostras foram semeadas em meio bifásico NNN contendo como fase líquida o meio Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino. Cerca de 0,2mL de MO, obtida por punção, foi semeada diretamente no meio de cultura. As culturas foram conservadas em estufa biológica a 26-28°C e examinadas semanalmente durante 30 dias por exames a fresco, buscando evidenciar formas flageladas. Nos casos onde ocorreu o isolamento parasitário, as amostras foram expandidas para produção de massa parasitária para posterior caracterização isoenzimática.

4.4.6 Eletroforese de enzimas (MLEE)

Todos os isolados obtidos independente do sítio anatômico, foram armazenados no banco de amostras do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish/IPEC/Fiocruz) e analisados pela eletroforese de enzimas. Inicialmente foi feita a expansão parasitária para obtenção de cerca de 10^9 parasitas, que posteriormente foi submetida à lavagem em tampão próprio, sob centrifugação 7000 rpm por 10 minutos a 4° C, até a obtenção de um “pellet”, que foi depositado em botijões de nitrogênio líquido (N_2) até a realização das corridas Eletroforéticas. Foram empregados cinco sistemas enzimáticos: 6PGDH; GPI; NH; G6PDH e PGM, cuja metodologia se baseou em protocolos já definidos (Cupolillo et al., 1994). Amostras de referência de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) foram empregadas em todas as corridas eletroforéticas. Para a corrida eletroforética, preparou-se um gel de agarose 1% (Tipo V) em tampão de acordo com o sistema enzimático utilizado, que depois de dissolvida e fundida foi colocada sobre um filme de poliestireno onde a amostra teste foi aplicada. A corrida eletroforética foi feita empregando-se uma cuba de eletroforese horizontal devidamente acoplada a um banho maria com circulação para manter a refrigeração em torno de 4°C. A revelação da atividade enzimática das amostras foi feita colocando-se diretamente

sobre o gel uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada enzima, baseados em protocolos já descritos na literatura (Cupolillo et al., 1994). A reação foi interrompida adicionando-se ácido acético a 5% e a mobilidade eletroforética dos isolados era comparada com o padrão das amostras de referência.

4.5. Análise Estatística

Com auxílio do programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 16.0, foi realizada uma análise descritiva quanto ao estado clínico e aos resultados das técnicas empregadas, obtendo-se a prevalência da doença. Foi realizada uma análise descritiva dos resultados da avaliação clínica e das técnicas laboratoriais empregadas no diagnóstico da infecção por *L. chagasi* em cães. Para o padrão de referência, as amostras que foram positivas em qualquer uma das técnicas (cultura parasitológica de pele e medula óssea, histopatologia, imunohistoquímica e imunohistoquímica de aspirado de medula óssea com fixador “cell block”) foram consideradas como resultado positivo e as negativas nas quatro técnicas, foram considerados como resultados negativos.

4.6. Procedimento ético

Os procedimentos realizados nos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- FIOCRUZ), sob a licença N° LW-43/10.

5. RESULTADOS

No período de estudo (2009-2011) foram avaliados 145 animais, sendo 54,5% destes, fêmeas. Dentre os animais sororretores e ou com resultado parasitológico positivo, apenas dois (1,3%) apresentaram sinais clínicos compatíveis com a LVC. Ambos apresentavam adenite regional, descamação, emagrecimento e alteração oftálmica (ceratoconjuntivite), além do diagnóstico positivo em todos os testes empregados. Um deles também apresentou lesão em pavilhão auricular (Figura 6). Os demais animais infectados, não apresentaram sinais compatíveis com a doença.

Através das técnicas sorológicas, encontramos uma soroprevalência de 25,2%. Na tabela 1, podemos observar os resultados de cada exame sorológico, e suas respectivas sensibilidades e especificidades, na tabela 2.

Seis cães (4,1%) apresentaram positividade em pelo menos um dos testes parasitológicos (Tabela 3). O isolamento parasitário foi obtido através da cultura em amostras de pele íntegra em dois animais (2/145), apresentando uma prevalência de 1,4%. Ambas as amostras foram caracterizadas como *Leishmania chagasi*.

Cento e trinta e nove animais apresentavam-se expostos (95,9%), seis animais infectados (4,1%), dois (1,3%) apresentavam-se doentes, nenhum animal foi considerado severamente doente.

Tabela 1: Resultado dos testes sorológicos realizados em 145 cães

	DPP®	ELISA	IFI
Positivos	9 (6,3%)	17(12,2%)	21(15,1%)
Negativos	134(93,7%)	122(87,8%)	118(84,9%)
Perdas	2(1,4%)	6(4,1%)	6(4,1%)

DPP, *Dual-Path Platform technology*; ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; IFI, *Imunofluorescência Indireta*.

Tabela 2: Resultado das sensibilidades e especificidades dos testes sorológicos realizados em 145 cães

	DPP®	ELISA	IFI
Sensibilidade	50 %	66,7%	66,7%
Especificidade	95,6%	90,2%	87,2%

DPP, *Dual-Path Platform technology*; ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; IFI, *Imunofluorescência Indireta*.

Tabela 3: Resultados dos exames parasitológicos e sorológicos dos seis animais com comprovação parasitológica

Animais	Cultura de pele	IHQ de pele	HP de pele	Cultura de M.O.	“Cell block”	DPP®	ELISA	IFI
1*	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

* único cão que apresentava lesão cutânea localizada na ponta de orelha. A amostra foi caracterizada como *L. chagasi*.

IHQ, *Imunohistoquímica*; HP, *Histopatologia*; M.O., *Medula Óssea*, DPP, *Dual-Path Platform technology*; ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; IFI, *Imunofluorescência Indireta*.



Figura 6: Animal infectado com presença de descamação e lesão em pavilhão auricular – Itaipuaçu, Maricá, Rio de Janeiro – 2012.

6. DISCUSSÃO

A partir da notificação de um caso de LVC em área indene, deve ser realizado um inquérito amostral canino, com o objetivo de verificar a existência de enzootia canina. Verificando-se a existência, deve-se confirmar a espécie de *Leishmania* circulante, nos laboratórios de referência nacional e uma investigação epidemiológica deverá ser realizada (Ministério da Saúde, 2006).

Em 2009, de Paula e colaboradores relataram o primeiro caso autóctone de LVC em Maricá, estado do Rio de Janeiro. Neste mesmo ano, a partir de um segundo caso autóctone, iniciamos um inquérito epidemiológico em outra área desse mesmo município e verificamos a presença de casos autóctones de LVC.

No inquérito realizado na área estudada, empregamos as técnicas de ELISA e IFI, ambas utilizadas pelo Ministério da Saúde nos inquéritos epidemiológicos, assim como o DPP[®], que passou a ser uma nova ferramenta utilizada como triagem nos inquéritos a partir de 2011. Foi encontrada uma maior soroprevalência utilizando-se a IFI comparada aos outros métodos sorológicos empregados, seguido do ELISA e DPP[®]. A sensibilidade da IFI foi semelhante ao ELISA e superior ao DPP[®].

Estudos vêm demonstrando alguns problemas encontrados na IFI quando comparada ao ELISA no diagnóstico da LVC, como baixa sensibilidade e especificidade, conseqüentemente gerando resultados falso positivos e falso negativos. O alto número de animais sororretores encontrados no estudo, através da IFI, mostra uma baixa especificidade da técnica, concordando com os resultados descritos na literatura (Figueiredo et al., 2010b; Figueiredo et al., 2010c; Silva et al., 2011).

O DPP[®], já validado pelo Ministério da Saúde, passou a ser uma nova ferramenta utilizada como triagem nos inquéritos epidemiológicos (Nota técnica, 2012), pois apresenta alta sensibilidade e especificidade, utilizando-se apenas 5µL de sangue, plasma ou soro, sendo os resultados demonstrados em apenas 15 minutos (Silva et al., 2012).

No nosso estudo, o DPP[®] apresentou sensibilidade inferior ao ELISA e à IFI. Os animais avaliados, apesar de infectados, apresentavam-se assintomáticos, concordando com Grimaldi et al. (2012), que em seu estudo, o DPP[®] apresentou menor sensibilidade quando o grupo avaliado era de animais assintomáticos. Entretanto, Silva et al (2012), obteve bons resultados no DPP[®], sendo estes semelhantes ao ELISA com antígenos de *L. Chagasi*. A discordância desses resultados pode estar relacionada à metodologia de seleção dos animais,

sendo que em nosso estudo e do grupo do Grimaldi as coletas foram a campo, e no estudo de Silva e colaboradores os animais eram provenientes de um inquérito sorológico para o controle da LVC.

A cultura parasitológica foi o método diagnóstico parasitológico que apresentou menor sensibilidade, utilizando amostras de pele íntegra e de medula óssea. O isolamento parasitário, através de cultura de fragmentos de pele íntegra de cães sororretores, vem mostrando sucesso na prática clínica para o diagnóstico da LVC (Figueiredo et al., 2010c). Um estudo realizado em Belo Horizonte, os autores descreveram o isolamento de *Leishmania chagasi* em 310 (78,7%) animais, de uma amostra de 394 cães sororretores. Foram utilizados três sítios de coleta, lesão e pele íntegra de orelha e escápula, e observado que a pele íntegra foi um dos melhores sítios para a confirmação da LVC em cães sororretores (Madeira et al. 2009). Esta técnica é considerada de fácil aplicação, porém dificuldades operacionais são encontradas por autoridades de Saúde Pública na implementação desses procedimentos nas práticas de rotina (Figueiredo et al., 2010c).

Apesar dos bons resultados descritos previamente (Madeira et al., 2004; Madeira et al., 2006), em nosso estudo, foi isolado *L. chagasi* em 2/36 animais, tanto dos fragmentos de pele íntegra quanto dos aspirados de medula óssea, demonstrando uma baixa sensibilidade da técnica comparada aos outros métodos diagnósticos empregados.

A histopatologia de fragmentos de pele íntegra apresentou resultado semelhante à cultura parasitológica. A IHQ de amostras de pele demonstrou uma maior sensibilidade quando comparada à cultura parasitológica e à histopatologia do mesmo sítio de coleta, isso se justifica pela deposição de um substrato cromógeno no local da reação antígeno-anticorpo, abreviando o tempo de leitura, pois permite fácil visualização dos parasitos marcados (Tafari et al., 2004).

A IHQ através do fixador “cell block” com amostras da medula óssea foi o método que demonstrou uma melhor sensibilidade, comparada às encontradas nos outros exames parasitológicos. Nesta técnica, as células são centrifugadas e os leucócitos são separados dos eritrócitos e há a formação de uma camada de leucócitos que contém células parasitadas com amastigotas de *L. chagasi*, sendo estas detectadas com maior facilidade através da reação antígeno-anticorpo (Menezes et al., 2012)¹.

¹ Artigo submetido à revista: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Menezes, RC; Madeira, MF; Ferreira, LC; Barbosa Filho, CJL; Figueiredo, FB. **Evaluation of immunohistochemistry and histopathology using bone marrow samples processed by the cell block technique for the diagnosis of *Leishmania infantum* in dogs.** 2012.

A maioria (98,6%) dos animais avaliados neste estudo, não apresentava sinais clínicos compatíveis com a LVC. Os dois animais que apresentaram sinais clínicos, foram positivos em todas as técnicas de diagnóstico empregadas.

Cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (Deane e Deane, 1955c; a; Marzochi et al., 1994; Almeida et al., 2005), sendo a forma assintomática relatada em proporções que podem representar cerca de 40 a 60% da população soropositiva (Marzochi e Marzochi, 1997), o que dificulta o diagnóstico da doença e demonstra a necessidade da confirmação laboratorial.

Na área urbana, o cão é a principal fonte de infecção para o vetor (Marzochi e Marzochi, 1997; Oliveira et al., 2008). Embora a LVC possa se manifestar de forma bem variável, o parasitismo da pele constitui uma das características mais importantes, fazendo do cão infectado um elo no ciclo epidemiológico (Travi et al., 2001). Não há tratamento eficiente para as enfermidades caninas, portanto, faz-se necessário a eutanásia dos animais infectados para se alcançar resultados efetivos nas ações de controle relacionadas aos agravos.

O Ministério da Saúde recomenda a retirada e eutanásia dos cães com diagnóstico parasitológico positivo ou sororretores no teste de imunofluorescência em diluições de 1:40 ou superior (Ministério da Saúde, 2006), visando a interrupção do ciclo de transmissão. Os animais que apresentaram diagnóstico parasitológico positivo foram retirados e eutanasiados, enquanto que os cães sororretores foram notificados à Prefeitura de Maricá e à Secretaria Estadual do Rio de Janeiro. Porém, a eutanásia trata-se de uma medida de controle que gera bastante discussão, devido à falta de consenso entre os pesquisadores quanto à exatidão dos testes atualmente empregados nos inquéritos (Scalone et al., 2002; de Paula et al., 2003; Alves e Bevilacqua, 2004; Silva et al., 2005). Silva et al., (2011) avaliou 155 animais sororretores, com títulos acima 1:40 na IFI realizada através de papel de filtro eluato, recolhidos e eutanasiados pelo programa de controle de leishmaniose do Município do Rio de Janeiro. Dos 155 cães avaliados, apenas 14 tiveram o isolamento de *Leishmania chagasi*, e 17 animais foram positivos em amostras de pele íntegra através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Noventa e um (59%) animais foram negativos em todos os testes realizados no estudo, demonstrando que estes animais foram recolhidos e eutanasiados, sem estes estarem infectados por *L. chagasi* ou outro agente. Os resultados encontrados nesse e em outros estudos, incentivaram a retirada da IFI com teste de triagem, sendo substituído pelo DPP, e o ELISA passou a ser o novo teste confirmatório.

Vem se observando a ocorrência de novos casos em várias regiões do município e do estado do Rio de Janeiro, o que demonstra uma possível alteração no comportamento dessa

endemia, possibilitando o surgimento de um surto em áreas urbanas, como já foi relatado em outras cidades brasileiras (Ministério da Saúde, 2006). Pelo fato da urbanização ser um fenômeno relativamente novo, pouco se conhece sobre a epidemiologia da LV nos focos urbanos. O município de Maricá vem enfrentando, ao longo dos últimos anos, movimentos migratórios do ser humano com seus animais, associado às alterações ambientais e vinculadas principalmente às atividades de veraneio (de Paula et al., 2009). Tal atividade já foi relacionada aos casos de leishmaniose tegumentar descritos nesse município (Serra et al., 2003).

Apesar da região estudada não ser considerada endêmica para LV, o inquérito canino mostrou um percentual significativo de animais sororretores, apesar do baixo número de animais com diagnóstico parasitológico positivo. Foi comprovada a circulação da *Leishmania chagasi* no local. Dessa forma, o nosso estudo confirmou a presença da LVC através do isolamento em meio de cultura e a identificação etiológica em Itaipuaçu, demonstrando a expansão da doença no município de Maricá, Rio de Janeiro.

7. CONCLUSÕES

- Entre os animais parasitologicamente positivos, a maioria não apresentava sinais clínicos de LVC;
- Entre as técnicas sorológicas empregadas, o ELISA e a IFI demonstraram maior sensibilidade e o DPP® maior especificidade;
- Os resultados da cultura parasitológica, do exame histopatológico e da imunohistoquímica das amostras de pele íntegra foram semelhantes, porém a última técnica demonstrou uma maior sensibilidade;
- A imunohistoquímica do aspirado de medula óssea com fixador “cell block” foi a técnica que demonstrou uma maior sensibilidade comparados aos outros métodos diagnósticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasit*. 2005;127(3-4):227-32.
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57:1-88.
- Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad de Saúde Publ*. 2004;20(1):259-65.
- Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq Bras de Med Vet e Zoot*. 2001;53(1).
- Chouihi E, Amri F, Bouslimi N, Siala E, Selmi K, Zallagua N, et al. [Cultures on NNN medium for the diagnosis of leishmaniasis]. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;57(3):219-24.
- Cupolillo E, Grimaldi JG, Momen H. A general classification of new world *Leishmania* using numeral zymotaxonomy. *Ame Journal Trop Med Hyg*. 1994;50:296-311.
- de Paula AA, da Silva AV, Fernandes O, Jansen AM. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. *Journal of Parasit*. 2003;89(4):832-6.
- de Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira Mde F. Canine visceral leishmaniasis in Marica, State of Rio de Janeiro: first report of an autochthonous case. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(1):77-8.
- Deane LM, Deane MP. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*. 1955a;47(1):75-87.
- Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comprovativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. *O Hospital*. 1955(1).
- Dharan M. Utility of cell block preparation in endometrial aspiration cytology: a report of 4 cases. *Acta Cytol*. 2010;54(5 Suppl):893-7.
- El Harith A, Chowdhury S, Al Masum, Semião SS, Das PK, Akhter S. Reactivity of various leishmanial antigens in a direct agglutination test and their value in differentiating post-kala azar dermal leishmaniasis from leprosy and other skin conditions. *J Med Microbiol* 1996;44:142-146.
- Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portus M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec*. 1995;136(20):514-6.

Figueiredo FB, Barbosa Filho CJ, Schubach EY, Pereira SA, Nascimento LD, Madeira Mde F. Report on an autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in the southern zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010a;43(1):98-9.

Figueiredo FB, Madeira MF, Menezes RC, Pacheco RS, Pires MQ, Furtado MC, et al. Efficacy of an indirect immunofluorescence test in the diagnosis of canine leishmaniasis. *The Veterinary Journal*. 2010b; Aug 6 doi.

Figueiredo FB, Madeira MF, Nascimento LD, Abrantes TR, Mouta-Confort E, Passos SR, et al. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010c;52(4):193-6.

França-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GL, Vieira EP, et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol*. 2005;131(3-4):213-20.

Genaro O. Leishmaniose tegumentar americana, in “Parasitologia Humana”. Ed. Atheneu, São Paulo. 1995. p. 41-60.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras de Epid*. 2004;7(3).

Grimaldi G, Jr., Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto IS, de-Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(1):54-9.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. [Acesso em 04 de junho de 2011]. 2011.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, Nascimento LD, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? *Res. Vet. Sci*. 2009; 87 (2) :260-2.

Marzochi MC, Marzochi KB, Carvalho RW. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol Today*. 1994;10(1):37-40.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev da Soc Bras de Med Trop*. 1997;30:162-167.

Massunari GK, Voltarelli EM, Santos DR, Santos AR, Poiani LP, de Oliveira O, et al. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Parana State, Brazil. *Cad Sau Pub*. 2009;25(1):97-104.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília-DF. Ministério da Saúde - MS (ed), Brasília. 2006.

Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado do Rio Grande do Sul sobre a situação da

Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina. Disponível em: [HTTP://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tec_front_br_argentina_lv_final_ses_rs.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tec_front_br_argentina_lv_final_ses_rs.pdf). [Acesso dia 27/11/2012]. 2010.

Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol.* 2007;145(3-4):245-52.

Nathan NA, Narayan E, Smith MM, Horn MJ. Cell block cytology. Improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000(114):599-606.

Nga ME, Lim GL, Barbro N, Chan NH. Successful retrieval of fine-needle aspiration biopsy material from previously stained smears for immunocytochemistry: a novel technique applied to three soft tissue tumors. *Mod Pathol.* 2005;18(5):728-32.

Nota técnica Nº 5/2012- GDTVZ/DTI/CVE/SVEA/SVS-SES RJ . Assunto: Intensificação da Vigilância para Leishmaniose Visceral no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.

Oliveira CD, Morais MH, Machado-Coelho GL. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cadernos de Saúde Pública.* 2008;24(12):2953-8.

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2010;236(11):1184-91.

Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, Xavier AA, Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* 2009;111(3):289-94.

Quintella, LP, Cuzzi, T, Madeira, Okamoto, T, Schubach, AO. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture confirmed American Tegumentary Leishmaniasis. *Rev do Inst de Med Tropl de São Paulo (Impresso)*, v. 51, p. 83-86, 2009.

Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, et al. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(6):1153-6.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.* 2002;104(4):275-85.

Serra CM, Leal CA, Figueiredo F, Schubach TM, Duarte R, Uchoa CM, et al. Canine tegumentary leishmaniasis in Morada das Aguias (Serra da Tiririca), Marica, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad de Saúde Pública.* 2003;19(6):1877-80.

Shaw JJ. New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmaniasis species in Central and South America. In Farrel (ed) World Class Parasites: *Leishmania*, 4 Kluwer Academic Publishe Boston, Dordrecht, London. 2002, p. 11-31.

Silva AV, Paula AA, Cabrera MA, Carreira JC. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. *Cad Saude Publica*. 2005;21(1):324-8.

Silva DA, Madeira MD, Abrantes TR, Filho CJ, Figueiredo FB. Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet J*. 2012.

Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol*. 2011.

Souza GD, Santos E, Andrade Filho JD. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalps* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem do Inst Osw Cruz* 2009; 104 (8): 1181-1182.

Swenson CL, Silverman J, Stromberg PC, Johnson SE, Wilkie DA, Eaton KA, et al. Visceral leishmaniasis in an English foxhound from an Ohio research colony. *J Am Vet Med Assoc*. 1988;193(9):1089-92.

Tafari WL, Santos Rde L, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*. 2004;292(1-2):17-23.

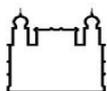
Toplu N, Aydogan A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. *Parasitol Res*. 2011;109(4):1051-7.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64(3-4):119-24.

W.H.O. World Health Organization Control of Leishmaniases. Technical Report Series 2011:793.

ANEXOS

Termo de Consentimento (Anexo 1)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos

Termo de Consentimento

Eu, _____, portador da carteira de identidade nº _____, expedida pelo órgão _____, proprietário (a) do animal _____, espécie _____, raça _____, registro _____; autorizo a participação do meu cão no projeto de pesquisa **“Avaliação clínica e laboratorial de cães domésticos em Itaipuaçu - Maricá, estado do Rio de Janeiro, área com ocorrência de casos de leishmaniose visceral canina.”**, autorizando que nele sejam aplicadas técnicas anestésicas como sedação, anestesia local e ou geral para a realização do exame clínico, coleta de fragmento cutâneo através de biópsia de pele, coleta de 5ml sangue através de punção venosa, coleta amostras de 1ml de medula óssea e 0,001ml do linfonodo, através de punção das regiões respectivas.

Os medicamentos utilizados para sedação como a acepromazina pode causar hipotensão e bradicardia dose-dependente (diminuição da pressão arterial e dos batimentos cardíacos) e a quetamina poderá causar rigidez muscular, sialorréia (excesso de salivação), mioclonias (contração muscular), taquicardia e hipertensão (aumento dos batimentos cardíacos e aumento da pressão arterial). Associação de ambas mantém estabilidade cardiovascular. Pode haver convulsão que será revertido com diazepam, IV (0,2 - 1,0 mg/kg). Na punção venosa pode ocorrer flebite (inflamação da veia), edema local e extravasamento de sangue, sendo realizada compressão local até interrupção. Aspirado de medula óssea pode ocasionar dor, controlada com anestesia local.

Autorizo também a utilização dos dados e materiais coletados para a pesquisa realizada pelo responsável técnico Fabiano Borges Figueiredo CRMV: 6519, sabendo que a identificação desse animal será mantida em sigilo e a participação nesse estudo não acarretará em qualquer custo financeiro para o proprietário.

O acompanhamento pós-operatório será realizado pela equipe de campo no sétimo dia após a realização da biópsia. Se houver algum problema em relação aos procedimentos realizados nos cães o veterinário responsável poderá ser encontrado pelos telefones (021) 38659536 / 38659553, no horário de 8:00 às 17:00 h.

O presente estudo além de trazer um benefício direto aos proprietários de cães da região de estudo, que terão a possibilidade de diagnosticarem seus animais em relação a uma zoonose grave como a leishmaniose visceral, região que atualmente não é realizado esse diagnóstico pela secretaria municipal de saúde, estarão também contribuindo para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnósticos para LVC mais sensíveis e específicas.

Nos casos em que o animal apresentar resultado positivo, a nossa equipe entrará em contato com a Secretaria Municipal de Saúde de Maricá pelo número (21) 26378332, para que os animais sejam recolhidos para eutanásia, medida baseada no Decreto número 51.838, de 1963.

Rio de Janeiro, ____ de ____ 20____

Ficha de identificação (Anexo 2)

4850541827		PROTOCOLO DE CAMPO VETERINÁRIO	
1-Nº	2-Data de Coleta		
<input type="text"/>	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>		
3-Nome do Animal:			
<input type="text"/>			
4-Proprietário:			
<input type="text"/>			
5-Endereço:			
<input type="text"/>			
6-Bairro:			7-Estado:
<input type="text"/>	<input type="text"/>		<input type="text"/>
8-Cidade:	9-Telefone:		
<input type="text"/>	<input type="text"/> - <input type="text"/>		
ANIMAL			
10-Raça:			
<input type="checkbox"/> SRD	<input type="checkbox"/> Outros	<input type="text"/>	
11-Sexo		12-Idade:	
<input type="checkbox"/> Macho	<input type="checkbox"/> Fêmea	<input type="checkbox"/> Até 12 Meses <input type="checkbox"/> Acima de 1 ano até 7 anos <input type="checkbox"/> Acima de 7 anos	
13-Tipo de Pelagem		14-Peso:	
<input type="checkbox"/> Curto	<input type="checkbox"/> Longo	<input type="text"/> , <input type="text"/>	
15-Vacinação:		16-Outras:	
<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> V8	<input type="text"/>	
<input type="checkbox"/> V10	<input type="checkbox"/> Anti-rábica		
<input type="checkbox"/> Contra Leishmaniose			
17-Castrado:			
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
EXAME CLÍNICO			
18-Estado Geral		19-Condição Corporal:	
<input type="checkbox"/> Bom	<input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Ruim	<input type="checkbox"/> Muito Magro <input type="checkbox"/> Magro <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Obeso	
20-Mucosas:		21-Temperatura:	
<input type="checkbox"/> Hipocoradas	<input type="checkbox"/> Normocoradas <input type="checkbox"/> Hiperemicas <input type="checkbox"/> Ictéricas	<input type="text"/> , <input type="text"/>	
22-Desidratação:		23-Prenhez:	
<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Severa	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
24-Presença de Ectoparasitos:		25-Lesões Cutâneas:	
<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Piolhos	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
<input type="checkbox"/> Pulgas	<input type="checkbox"/> Carrapatos	26-Início das Lesões:	
<input type="checkbox"/> Outros	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
28-Localizações das Lesões:		27-Nº de Lesões:	
<input type="checkbox"/> Orelha	<input type="checkbox"/> Nariz <input type="checkbox"/> Escroto <input type="checkbox"/> Não se aplica	<input type="text"/>	
<input type="checkbox"/> Outras	<input type="text"/>		

