

MANUAL TÉCNICO

Leishmanioses Caninas



Manual Técnico de Leishmanioses Caninas

Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral

CORPO TÉCNICO

Alceu Bisetto Junior

Aline Kuhn Sbruzzi Pasquali

Andre Souza Leandro

Eliane Maria Pozzolo

Italmar Teodorico Navarro

Luciana Chiyo

Regina Mitsuka Breganó

Renata Cristina Ferreira Dias

Ricardo Friedrich

Roberta Lemos Freire

Vanete Thomaz Soccol

APOIO



PREFÁCIO

A leishmaniose é uma importante doença de impacto na saúde pública e de notificação obrigatória. Tendo em vista o recente primeiro caso de leishmaniose visceral humana no Paraná e a constatação de cães com sorologia positiva em território paranaense, é necessário que os Médicos Veterinários estejam atentos para o diagnóstico.

O Conselho Federal e os Conselhos Regionais de Medicina Veterinária vêm conquistando o reconhecimento da sociedade pelo desempenho do Médico Veterinário como agente promotor de saúde.

As Resoluções nº 287/98 e nº 218/97 do Ministério da Saúde incluem o Médico Veterinário como profissional legalmente reconhecido como atuante na promoção da saúde. Há muitos anos os Médicos Veterinários compõem os quadros de funcionários das Vigilâncias Epidemiológicas municipais, estaduais e federal. Em 2011, o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 2.488 incluindo o Médico Veterinário no Núcleo de Apoio à Saúde da Família (NASF) com o objetivo de ampliar a abrangência e o escopo das ações de atenção básica à saúde. O Médico Veterinário atua na promoção e na proteção da saúde no âmbito individual e coletivo, ajudando na prevenção de agravos, diagnóstico, tratamento, reabilitação, redução de danos e na manutenção da saúde.

Alguns exemplos de ações desenvolvidas pelos profissionais que compõem a equipe do NASF: desenvolvimento de projetos de saúde com base na vulnerabilidade dos indivíduos frente a animais e demais riscos ambientais no território, avaliação dos fatores de risco à saúde relativos à interação entre humanos, animais e o meio ambiente no domicílio e áreas circunvizinhas, intervenções no território e na saúde de grupos populacionais e da coletividade, prevenção e diagnóstico situacional de riscos de doenças transmissíveis por animais vertebrados ou invertebrados, controle de doenças de caráter antroponozoonótico, identificação de condições socioambientais propícias à proliferação de vetores de doenças, pragas urbanas e animais sinantrópicos, ações de prevenção e promoção da saúde,

construção conjunta de projetos terapêuticos, educação permanente.

Como a composição do NASF é definida por gestores municipais a partir dos critérios de prioridade conforme os dados epidemiológicos e as necessidades locais, o Estado do Paraná, por meio do Sistema CFMV/CRMVs, Sindicatos, Associações e do próprio Médico Veterinário, principalmente em nível de Conselhos Municipais de Saúde, deve sugerir a inclusão de mais Médicos Veterinários no NASF.

Além do Médico Veterinário atuante nas Vigilâncias Epidemiológicas e no NASF, é importantíssimo que o Clínico de pequenos animais saiba identificar a doença (leishmaniose visceral e tegumentar), para notificá-la e, observando o Código de Ética do Médico Veterinário, bem como os princípios básicos de saúde pública, legislação de proteção aos animais e normas do CFMV, promover a eutanásia dos casos devidamente justificados, enquanto tal medida se fizer necessária no Brasil.

Esta cartilha foi cuidadosamente desenvolvida por uma equipe técnica, com a coordenação da Professora Doutora Vanete Thomaz Soccol, preocupada em fornecer o maior detalhamento sobre a leishmaniose tegumentar e visceral. São abordados temas como agente etiológico, ciclo, transmissão, patogenia, sinais clínicos, diagnóstico e eutanásia, de acordo com a bibliografia mais atualizada e de acordo com as pesquisas epidemiológicas regionais. Fotografias e modelos de fichas foram disponibilizados para facilitar a rotina clínica dos Médicos Veterinários Paranaenses. Desta maneira, espero que todos os Médicos Veterinários e outros Profissionais interessados encontrem as informações que necessitam para o melhor desempenho de seus trabalhos e para a melhoria do status sanitário da leishmaniose no Estado do Paraná.

Nossos agradecimentos a toda a equipe envolvida no desenvolvimento deste trabalho.

Méd.Vet. Eliel de Freitas

CRMV-PR nº 00826

Presidente CRMV-PR

SUMÁRIO

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA).....	9
Agente etiológico	9
Espécies de Leishmania : seus vetores, reservatórios e distribuição geográfica	10
Transmissão	12
Ciclo evolutivo.....	12
Vetor.....	13
Características morfológicas do vetor.....	13
Manifestações clínicas da LTA.....	14
Diagnóstico	15
Escarificação.....	16
Impressão por aposição (imprint).....	17
Biópsia para exame histopatológico, cultura do parasito ou PCR (Reação em Cadeia Polimerase).....	17
Punção aspirativa.....	18
Inoculação em animais de laboratório	18
Molecular.....	18
Tratamento.....	19
LEISHMANIOSE VISCERAL (LV).....	20
Agente etiológico	21
Transmissão	22
Patogenia.....	22
Manifestações clínicas.....	23
Diagnóstico	25
Impressão por aposição (<i>Imprint</i>)	26

Punção aspirativa por agulha fina (PAAF)	27
Biópsia para exame histopatológico, cultura do parasito ou PCR (Reação em Cadeia Polimerase).....	27
Molecular.....	28
Tratamento.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	35
Ficha Epidemiológica para Leishmaniose Visceral.....	35
Ficha Epidemiológica para Leishmaniose Tegumentar Americana	36
Colheita de Material para Diagnóstico de Leishmaniose.....	37
Técnica de Escarificação e Coloração:.....	40
Coloração de May-Grunwald-Giemsa.....	41

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose com distribuição mundial. O parasito é transmitido ao hospedeiro vertebrado (animais selvagens, canídeos domésticos e homem) pela picada do inseto vetor. Os vetores são fêmeas de *Lutzomyia* spp., pertencentes à família Psychodidae, subfamília Flebotominae. Mais de 40 espécies de flebotomíneos estão presentes no Estado do Paraná, com predominância de *Lutzomyia neivai* e *Lu. whitmani*.

Nas áreas endêmicas onde a LTA ocorre em humanos, com frequência os cães domésticos podem estar infectados. A participação de animais domésticos no ciclo epidemiológico da LTA é conhecida desde o século XX.

A primeira notificação de LTA no Estado do Paraná foi feita por Rabelo em 1917. Na década de 40, Pessoa & Barreto notificaram vários casos da doença na região norte do Paraná. Miranda et al. nos anos 50 assinala casos na região do Vale do Rio Ribeira. Portanto, a LTA é endêmica no Paraná e vem sendo notificada anualmente. No final dos anos 80, nos anos 93-94 e 2001 apresentou surto epidêmico. Na região central do Estado a doença tem notificação mais recente. Portanto são três as principais áreas de transmissão: Vale do Rio Ribeira, norte-noroeste do Estado do Paraná e região central.

Agente etiológico

Os agentes etiológicos pertencem à família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* Ross, 1903. No Brasil, 10 espécies já foram descritas, sendo que sete podem afetar o homem e animais (*L. (V.) braziliensis*, *L. (L.)*

amazonensis, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (L.) infantum*) e três, apenas animais (*L. enriettii*, *L. deanei*, *L. forattini*).

O parasito é intracelular obrigatório nos hospedeiros vertebrados e nos vetores estão no intestino, portanto são dimórficos e heteroxenos;

- Forma promastigota (flagelada): encontrada no tubo digestivo do inseto vetor ou em meios de cultura (NNN, CCS) (Fig. 01);
- Forma amastigota (aflagelada): presente nas células do sistema monocítico fagocitário (SMF) dos hospedeiros vertebrados (Fig. 02).

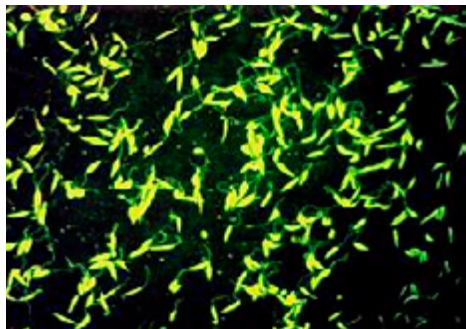


Fig. 01: Promastigotas.
Foto: Vanete Thomaz Soccol

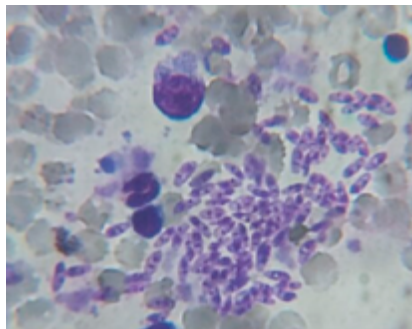


Fig. 02: Amastigotas.
Foto: João R. Ruthes

Espécies de *Leishmania*: seus vetores, reservatórios e distribuição geográfica

Aqui serão apresentadas apenas as três espécies que possuem mais ampla distribuição geográfica e com maior número de casos registrados.

Leishmania (Viannia) braziliensis

Distribuição geográfica: possui ampla distribuição, indo do sul do

Pará ao nordeste do Brasil, atingindo também o centro e o sul do país. Na Amazônia, a infecção é usualmente encontrada em áreas de terra firme.

Reservatório: cão, raposa, equino, mula, roedores domésticos ou sinantrópicos e outros presentes no peri-domicílio;

Vetores: *Lutzomyia whitmani*, *Lu.intermedia*, *Lu. pessoai*, *Lu. migonei*, *Lu. wellcomei*. A espécie vetora pode ser diferente dependendo da distribuição geográfica dos flebotomíneos.

Leishmania (Leishmania) amazonensis

Distribuição geográfica: florestas primárias e secundárias da região Amazônica, principalmente em áreas de igapó e floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o nordeste (Bahia), sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e centro-oeste (Goiás).

Reservatório: roedores selvagens (“rato-soiá” - *Proechimys*, além de *Oryzomys*, que às vezes apresentam parasito na pele sem lesões cutâneas). Tem sido observada também em marsupiais.

Vetores: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. olmecanociva* e *Lu. reducta*.

Leishmania (Viannia) guyanensis

Distribuição geográfica: Limitada ao norte da bacia amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará), estendendo-se pelas Guianas, é encontrada principalmente em florestas de terra firme (áreas que não alagam no período de chuvas).

Reservatório: Bicho-preguiça (*Choloepus didactylus*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), marsupiais e roedores. A infecção animal é geralmente inaparente (verdadeiros reservatórios), com parasitos encontrados na pele e vísceras.

Vetores: *Lutzomyia umbratilis*, *Lu. anduzei*.

Transmissão

Ocorre pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas com promastigotas. A presença do vetor é essencial para a disseminação do parasito. Não ocorre transmissão do parasito de hospedeiro vertebrado para hospedeiro vertebrado.

Ciclo evolutivo

A fêmea de flebotomíneo se infecta ao realizar a hematofagia em um reservatório (mamíferos) infectado, ingerindo a forma amastigota.

No intestino do inseto se transforma em promastigota, multiplicando-se por divisão binária simples.

Por fim ocorre a migração para a probóscida e pode ser inoculada na pele do próximo hospedeiro vertebrado, quando do repasto sanguíneo.

Após a inoculação, os parasitos são fagocitados e assumem a forma amastigota, iniciando novos ciclos de multiplicação (Fig. 03).

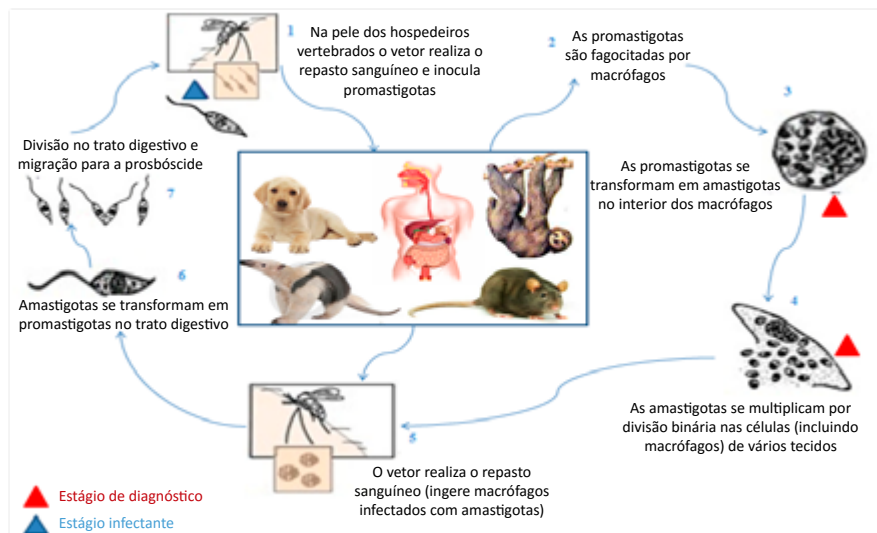


Fig. 03: Ciclo evolutivo da LTA.
Fonte: Adaptado de CDC.

Vetor

Os vetores de *Leishmania* sp. são flebotomíneos (Fig. 04), conhecidos popularmente como: mosquito-palha, cangalhinha, flebótomo, arrepiado, assadura, asa-da-palha, birigui, orelha-de-veado e tatuíra.

Diferentemente de outros vetores que se desenvolvem em água, estes se desenvolvem em solo úmido, mas não molhados, ou em detritos ricos em matéria orgânica em decomposição e com pouca luminosidade.

Possuem hábitos noturnos, iniciando suas atividades após o crepúsculo até ao amanhecer. Durante o dia vivem escondidos em buracos ou troncos de árvores, nas casas, nos estábulos, canis, pocilgas, frestas, fendas de paredes, lixo, entre outros (Fig. 05). Apresentam voo em zigue-zague.



Fig. 04: Flebotomíneo fêmea adulta ingurgitada.
Fonte: Ministério da Saúde



Fig. 05: Local propício para desenvolvimento do vetor.
Fonte: Itamar Teodorico Navarro

Características morfológicas do vetor

Ambos os sexos são de cor castanho-clara ou cor de palha, corpo piloso, cabeça fletida sob o tórax arqueado, olhos grandes, pretos, afastados, palpos nos cinco artículos e antenas com 16 artículos. Asas são hialinas, grandes, lanceoladas, pilosas, em posição ereta. Pernas são compridas. A

extremidade posterior do abdômen é bem diferenciada entre machos e fêmeas (em machos é bifurcada e nas fêmeas a extremidade é levemente arredondada). Os adultos medem de 2 a 3mm de comprimento. Existem várias espécies de flebotomíneos, de diferentes gêneros (*Psychodopygus*, *Lutzomyia*), que transmitem o parasito. Abaixo são descritas as espécies de *Leishmania* e seus respectivos vetores.

Tabela 1 - Espécies de *Leishmania* e seus respectivos vetores.

Gênero e Espécie	
<i>Leishmania</i>	Vetor
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>Lu. whitmani</i>
	<i>Ps. welcomei</i>
	<i>Lu. neivai</i>
	<i>Lu. intermedia</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>Lu. umbratilis</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	<i>Lu. ubiquitalis</i>
<i>L. (V.) naiffi</i>	<i>Ps. ayrozai</i>
	<i>Ps. paraensis</i>
	<i>Ps. squamiventris</i>
<i>L. (V.) shawi</i>	<i>Lu. whitmani</i>
<i>L. (V.) deanei</i>	<i>Lu. furcate</i>

Manifestações clínicas da LTA

Na LTA há o aparecimento de pequena lesão eritemato-papulosa no local da picada do vetor, onde ocorre a multiplicação do protozoário no interior dos macrófagos. Posteriormente forma-se um nódulo que dá origem à úlcera. A lesão possui formato arredondado, com bordas elevadas e infiltradas, podendo ser única ou múltipla, dependendo do número de picadas (Fig. 06).

Alguns animais podem apresentar nódulos com aspecto tumoral na pele ou mucosas. As lesões geralmente são de difícil cicatrização. Estas não são pruriginosas nem doloridas, e em cães se apresentam principalmente em regiões como saco escrotal, focinho (Fig. 07), boca, prepúcio, e demais áreas rarefeitas ou ausentes de pelos, cuja exposição da pele ao vetor é maior.



Fig. 06: Úlcera clássica de LTA em orelha
Foto: Rafael André Ferreira Dias



Fig. 07: Ferida de LTA em processo de cicatrização, região de focinho.
Foto: Itamar Teodorico Navarro

Diagnóstico

Clínico

- Avaliar características das lesões de pele (localizada, única, múltipla);
- Úlceras com bordas elevadas em moldura;
- Fundo granuloso com ou sem exsudação;
- Úlceras indolores;
- No cordão linfático podem se desenvolver nódulos que ulceram, lembrando esporotricoses;
- Podem ser observadas pápulas na periferia das lesões.

Epidemiológico

Avaliar se:

- Animal é proveniente de área endêmica;
- Se o animal visitou áreas endêmicas;
- Verificar se o caso é autóctone.

Sorológico

O teste recomendado para triagem no diagnóstico de LTA é o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Para confirmação do diagnóstico sorológico deve ser feito um segundo exame.

SOROLOGIA NEGATIVA NÃO DESCARTA A INFECÇÃO!
O exame parasitológico é o padrão ouro

Parasitológico

O exame parasitológico direto é o procedimento de primeira escolha, por ser mais rápido, menor custo, fácil execução e ser o exame de certeza. Para a pesquisa direta são utilizados os seguintes procedimentos:

Escarificação

Antes da colheita de material, deve-se fazer uma antisepsia com água e sabão (Fig.08). A colheita de material pode ser realizada após anestesia local (Fig. 09), na borda interna da lesão ulcerada recente, sem secreção purulenta, ou na superfície da lesão não ulcerada, utilizando um estilete descartável, lâmina de bisturi ou palito de madeira, com extremidade em bisel, previamente esterilizados.

Após a colheita, realiza-se a distensão do material em lâmina (limpa previamente com álcool). Na medida do possível, deve-se colher material abundante para aumentar a probabilidade de confirmação de diagnóstico. Após a confecção da lâmina a mesma deverá ser fixada em metanol por cinco minutos e posteriormente encaminhada para laboratório de referência para coloração da lâmina e pesquisa do parasito.



Fig. 08: Antissepsia da lesão
Fonte: Rafael André Ferreira Dias

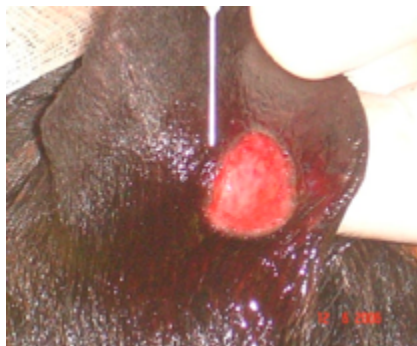


Fig. 09: Anestesia local na borda da lesão
Fonte: Rafael André Ferreira Dias

Impressão por aposição (imprint)

O fragmento de tecido obtido em biópsia deve ser comprimido sobre uma lâmina de vidro. Após fixação e coloração com corante específico para protozoários a lâmina será observada à microscopia óptica (400x).

Biópsia para exame histopatológico, cultura do parasito ou PCR (Reação em Cadeia Polimerase)

A biópsia pode ser realizada com punch de 4mm de diâmetro ou em cunha, com o uso de bisturi.

A histopatologia mostra que o sítio principal de reação é a derme. Os parasitos, quando presentes, são encontrados em vacúolos intracitoplasmáticos dos macrófagos ou nos espaços intercelulares, ou isolados.

O material obtido por biópsia poderá também ser colocado em meio de cultura (NNN, CCS) para multiplicação dos parasitos e facilitar a leitura ou ainda ser macerado e inoculado em animais de laboratório.

Punção aspirativa

Pode ser realizada na borda interna da lesão, utilizando uma seringa de 5mL e agulha 25x8 mm, com 3mL de solução salina estéril com antibiótico (Penicilina G potássica 25.000 U + estreptomicina 100 µg/mL). O material colhido por punção poderá ser utilizado para esfregaço, inoculação em meio de cultivo (NNN, CCS) ou em animais de laboratório. As lâminas devem ser fixadas em metanol para envio ao laboratório de referência, onde será corada e avaliada a microscopia óptica para pesquisa do parasito.

Inoculação em animais de laboratório

A inoculação em animais de laboratório é possível, mas geralmente é usada apenas em pesquisa. O animal de escolha é o hamster (*Mesocricetus auratus*) para *L. braziliensis* e Balb C para *L. amazonensis*, e os locais de preferência são as extremidades, principalmente na parte superior das patas posteriores. O inóculo deve ser obtido a partir de uma suspensão homogeneizada do material de biópsia em solução salina estéril. As lesões no hamster se desenvolvem tardiamente (a partir de um mês).

Molecular

A pesquisa de DNA do parasito *Leishmania* pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é amplamente utilizada para verificar a presença ou ausência do DNA do parasita tendo a vantagem de diferenciar as espécies de *Leishmania*. Para isso é necessário usar primers marcadores específicos para cada espécie.

Diagnóstico diferencial

Vários sinais clínicos da LTA podem estar presentes em outras enfermidades, sendo necessário o diagnóstico diferencial. As principais patologias que podem ser confundidas com LTA são: linfoma, leucemia, doenças infecciosas, dermatite, pulicose, escabiose, foliculite, dermatite alérgica, pododermatites, não desgaste das unhas, desnutrição, erlichiose, endoparasitos, ectoparasitos, doenças cardíacas e intestinais crônicas, trauma.

Tratamento

Não há, até o momento, nenhum tratamento eficaz para LTA em cães, visto que o animal permanece reservatório do parasito.

Quando o animal for diagnosticado com leishmaniose, o caso deve ser notificado aos órgãos públicos citados, visto que esta é uma doença de notificação compulsória (ver anexos):

- **ADAPAR**

Ver IN 50, 24 DE SETEMBRO DE 2013

<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=456>

LEISHMANIOSE VISCERAL (LV)

Nomes populares da LV: Calazar e Barriga-d'água.

A LV tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas.

O primeiro registro do caso humano da doença no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso em material de necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso. A partir de um estudo realizado para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, encontrou-se 41 casos positivos para *Leishmania* sp., sendo identificados em lâminas de viscerotomias praticadas post-mortem em indivíduos oriundos das regiões norte e nordeste do Brasil.

A seguir, *Lu. longipalpis* foi incriminado como vetor e foram descobertos os primeiros casos da infecção em cães.

Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários estados da Federação, principalmente nas regiões nordeste (nos anos 80) e nos anos 90, nas regiões sudeste e centro-oeste. Na região sul do país, a LV foi registrada primeiramente no Rio Grande do Sul, com registros dos primeiros casos canino e humano em 2008 e 2009, respectivamente. Em Santa Catarina foi registrado somente LV canina.

No estado do Paraná, a Leishmaniose Visceral Canina foi registrada em 2013 e o primeiro caso de LV em humano foi confirmado em julho de 2015.

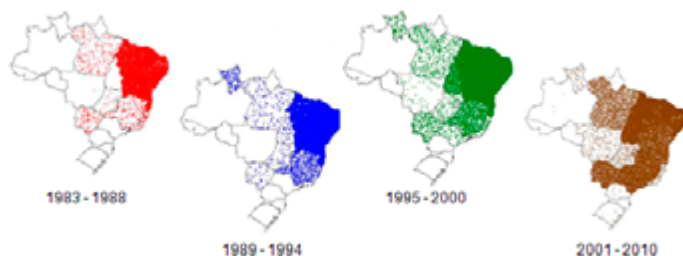


Fig. 10- Distribuição especial de LV no Brasil de 1983 a 2010. Fonte: SINAN SVS

Agente etiológico

Leishmania sp.:

- Ordem Kinetoplastida
- Família Trypanosomatidae
- Parasito intracelular obrigatório e heteroxeno
- Formas: amastigota e promastigota.
- Hospedeiros vertebrados: cães, humanos e animais selvagens
- Hospedeiros invertebrados: *Lutzomyia longipalpis*

***Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*)**

Duas espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *Leishmania* (*L.*) *donovani* são causadoras de doença visceral no mundo. *Leishmania* (*L.*) *donovani* é o agente etiológico presente na Ásia e *L. (L.) infantum* é encontrada em países da região Mediterrânea e nas Américas. Os reservatórios da LV são os cães (*Canis familiaris*) e raposas (*Dusycion vetulus*) e o vetor é *Lu. longipalpis* (Fig. 11).



Fig. 11: Flebotomíneo
Foto: GeniltonVieira/IOC/Fiocruz

Transmissão

O vetor (flebotomíneo) se infecta ao realizar a hematofagia no hospedeiro vertebrado, ingerindo formas amastigotas. No intestino do inseto se transforma em promastigota, multiplicando-se por divisão binária simples. As formas promastigotas migram para a probóscida quando já podem ser inoculadas na pele do próximo hospedeiro vertebrado pela picada. Após a inoculação, os parasitos são fagocitados e se transformam em amastigota, iniciando novos ciclos de multiplicação.

Característica marcante deste protozoário é o fato de parasitar o compartimento fagolisossomal de fagócitos mononucleares, conhecidos como células hospedeiras.

A diferença entre a LTA e a LV é que, na última, os parasitos ou macrófagos parasitados podem se expandir e promover infecção em órgãos distantes como fígado, baço, medula óssea.

Patogenia

Na forma visceral as manifestações clínicas refletem o equilíbrio entre a multiplicação dos parasitos nas células do sistema fagócito mononuclear. Os parasitos se aderem rapidamente às células desse sistema e se diferenciam em forma amastigota; a resposta imunitária do indivíduo e as alterações degenerativas são resultantes desse processo.

Os órgãos mais afetados são: linfonodo, baço, fígado, medula óssea e pele.

Manifestações clínicas

É importante ressaltar que a leishmaniose visceral pode cursar de forma assintomática, oligossintomática ou sintomática. Cerca de 60% dos cães são assintomáticos, ou seja, nem todos os animais desenvolvem a doença. Os sinais clínicos podem demorar de meses a anos para se manifestar após a infecção. Após a infecção a manifestação clínica pode iniciar como uma lesão cutânea e, posteriormente, disseminar-se sistemicamente.

Cães assintomáticos: ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania infantum* (Fig. 12).

Cães oligossintomáticos: apresentação de alguns sinais clínicos como moderada perda de peso, lesões de pele e/ou pelos opacos (Fig. 13).

Cães sintomáticos: todos ou alguns sinais mais comuns da doença como (Fig. 14):

Sinais neuromusculares – paresia, convulsão, atrofia muscular

Adenomegalia – linfonodo poplíteo, pré escapular e submandibular

Sinais oftalmológicos – blefarite, uveíte, conjuntivite, ceratite

Mucosa – palidez, epistaxe, úlceras e nódulos

Derme – eritema, prurido, alopecia, hiperqueratose, onicogribose (Fig. 15)

Outros sinais – gástricos (vômito, diarreia), insuficiência renal, artrose, abdominais (hepatomegalia, esplenomegalia).



Fig. 12: Cão assintomático.
Foto: Luciana Chyio



Fig. 13: Cão oligossintomático.
Foto: Luciana Chyio



Fig. 14: Cão sintomático.
Foto: Luciana Chyio



Fig. 15: Onicogrifose.
Foto: Luciana Chyio



Fig. 16: Descamação de pele e caquexia.
Foto: Luciana Chyio



Fig. 17: Descamação de pele e lesão em articulação.
Foto: Vanete Thomaz Soccol

Diagnóstico

Clínico

Evolução lenta e insidiosa. Muitas vezes confundido com sarna demodécica

Epidemiológico

Verificar se:

- Animal é proveniente de área endêmica;
- Se o animal visitou locais endêmicos;
- Se o caso é autóctone.

Sorológico

Durante muitos anos, para inquérito sorológico canino no Brasil eram utilizadas as metodologias: ensaio imunoenzimático (ELISA) como teste de triagem e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) como exame confirmatório.

Atualmente, segundo a nota técnica conjunta No 01/2011 – CGDT – CGLAB/DEVIT/SVS/MS, o diagnóstico sorológico para cães preconizado pelo Ministério da Saúde é o teste imunocromatográfico denominado “TR DPP® Bio-Manguinhos”, que é usado como exame de triagem, e o teste ELISA indireto como exame confirmatório.

Teste triagem: TR DPP®
Teste confirmatório: ELISA

O teste imunocromatográfico TR DPP é um teste que segundo a literatura apresenta sensibilidade de 93 a 100% e especificidade de 92 a 100%. Porém, alguns artigos já mostraram que a sensibilidade do teste

depende da situação clínica do animal, sendo observada maior sensibilidade de diagnóstico em cães sintomáticos. Em cães assintomáticos a sensibilidade registrada em diferentes artigos publicados variou de 12 a 47%.

A RIFI continua sendo uma técnica interessante especialmente para o clínico pois apresenta sensibilidade de 90 a 100% e especificidade entre 80 a 100%.

Para um diagnóstico correto, além dos testes sorológicos, pode ser realizado o exame parasitológico, pois é o padrão ouro. Os exames sorológicos indicam apenas que o hospedeiro entrou em contato com o parasito.

Parasitológico

O método parasitológico consiste na observação de formas amastigotas em material biológico (punção de linfonodo e medula óssea). O material obtido é utilizado para a confecção de esfregaço ou impressão em lâminas, histologia, isolamento em meios de cultura ou inoculação em animais de laboratório. As punções hepáticas são sugeridas por alguns autores, porém, são consideradas procedimentos invasivos e exigem ambientes apropriados para a colheita, não sendo procedimentos adequados para estudos epidemiológicos em larga escala.

O exame parasitológico apresenta 100% de especificidade, porém a sensibilidade é variável de acordo com material colhido, o grau de parasitemia e com o treinamento do técnico que realiza a leitura. É o procedimento de primeira escolha, por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução.

Para a pesquisa direta são utilizados os seguintes procedimentos:

Impressão por aposição (*Imprint*)

Este método é realizado pela compressão do fragmento de tecido,

obtido por biópsia, sobre uma lâmina de microscopia, depois da retirada do sangue em uma superfície absorvente (papel filtro). As lâminas devem ser fixadas em metanol para envio ao laboratório de referência, onde serão coradas e avaliadas à microscopia óptica para pesquisa do parasito.

Punção aspirativa por agulha fina (PAAF)

Pode ser realizada em linfonodos ou nódulos, utilizando uma seringa grande e agulha fina (ex.: seringa de 10 ou 20mL e agulha de 25x8mm), com 1mL de solução salina estéril e antibiótico (Penicilina G potássica 25.000 U + estreptomicina 100 µg/mL). O material colhido por punção poderá ser utilizado para esfregaço, inoculação em meio e cultivo (NNN, CCS), ou em animais de laboratório. Para a realização da coleta é imprescindível realizar antisepsia criteriosa no local da punção. As lâminas devem ser fixadas em metanol para envio ao laboratório de referência, onde serão coradas e avaliadas a microscopia óptica para pesquisa do parasito.

Biópsia para exame histopatológico, cultura do parasito ou PCR (Reação em Cadeia Polimerase)

O local onde será realizada a biópsia deve ser limpo com água e sabão. A seguir, realiza-se um bloqueio anestésico com a infiltração de lidocaína (Xilocaína®) a 2% para anestesiá-lo localmente.

Para o exame histopatológico o material retirado por biópsia deve ser fixado em formol a 10%, em quantidade aproximadamente 20 vezes maior que o volume do fragmento. O diagnóstico confirmatório pela histopatologia somente é dado quando se identifica o parasito nos tecidos.

O material colhido também poderá ser inoculado em meio de cultivo (NNN, CCS) ou em animais de laboratório (ver item Isolamento do parasito ou colheita de material para PCR).

Molecular

A pesquisa de DNA do parasito *Leishmania* pela técnica de PCR vem sendo amplamente utilizada para verificar a presença ou ausência do DNA do parasito sendo utilizado primers específicos para *L. infantum*.

Diagnóstico diferencial

A leishmaniose visceral canina deve ser diferenciada de erlichiose, linfossarcoma, mieloma, seborréia, pênfigo e infecções fúngicas sistêmicas assim como outras doenças que causam proliferação do sistema reticuloendotelial.

Tratamento

Não há, até o momento, nenhum tratamento eficaz para LVC, visto que o animal permanece como fonte de infecção para o mosquito-palha.

Até o presente momento a recomendação é a eutanásia dos cães com dois testes sorológicos positivos.

Todo cão com sorologia positiva tem que ser submetido à eutanásia, o que está de acordo com a Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV, Capítulo 1, Artigo 3, inciso II.

O médico veterinário que realizará a eutanásia deve elaborar um Termo de Consentimento do Proprietário para procedimento de eutanásia, conforme a Resolução CFMV nº 1071/2014. Caso o proprietário se recuse a realizar a eutanásia, o médico veterinário deve lavrar um Termo de Responsabilidade por Recusa à Eutanásia. O termo deve deixar claro que o

proprietário está ciente dos riscos à saúde pública ocasionados pela recusa da eutanásia e que tem conhecimento das sanções legais que lhe podem ser aplicadas.

Após a eutanásia, o médico veterinário deve lavrar o Atestado de Óbito do Animal, conforme a Resolução CFMV n° 844/2006, a qual dispõe sobre o atestado de óbito animal.

Conforme o Código de Ética do Médico Veterinário é um dever do médico veterinário realizar a eutanásia nos casos devidamente justificados, observando os princípios básicos de saúde pública (inciso XIII, artigo 6° da Resolução CFMV n° 722/2002).

Quando o animal for diagnosticado com leishmaniose, o caso deve ser notificado aos órgãos públicos citados, visto que esta é uma doença de notificação compulsória (ver anexos):

- **SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE**

Telefone CIEVS: 0800-643-8484

http://formsus.datasus.gov.br/site/formulario.php?id_aplicacao=5376

- **SERVIÇO DISQUE NOTIFICA**

Telefone disque notifica: 0800-644-6645

E-mail: notifica@saude.gov.br | Site: www.saude.gov.br/svs

- **ADAPAR**

Ver IN 50, 24 DE SETEMBRO DE 2013

<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=456>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBISCHER, T. *Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites?* Parasitology Today, v. 10, 1994.

ALENCAR, J. E.; NEVES, J.; DIETZE, R. *Leishmaniose Visceral (Calazar)*. In: VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 8 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. *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*. Caderno Saúde Pública, v. 20, 2004.

BRASIL, Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Mato Grosso do Sul. *Cartilha sobre Leishmaniose Visceral Canina*. Campo Grande, 2002.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. *Resolução CFMV nº 722, de 16 de agosto de 2002*. Aprova o Código de Ética do Médico Veterinário, 2002.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. *Resolução CFMV nº 844, de 20 de setembro de 2006*. Dispõe sobre o atestado de sanidade e óbito de animais, assim como os de vacinação de animais e os de sanidade dos produtos de origem animal e dá outras providências, 2006.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. *Resolução CFMV nº 1000, de 11 de maio de 2012*. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências, 2010.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. *Resolução CFMV nº 1071, de 17 de novembro de 2014*. Dispõe sobre a normatização de documentos emitidos pelos serviços veterinários de clínica e cirurgia destinados aos animais de companhia, com relação a declarações, atestados, autorizações e /ou solicitações dos responsáveis pelos animais submetidos a procedimentos, 2014.

CASTANIA, V.A. *Enxerto cortiço esponjoso homogêneo processado quimicamente, esterilizado em óxido de etileno e embebido em medula óssea autógena*. Tese (Doutorado em Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

CASTRO, E.A., et al. *Eco-epidemiological survey of Leishmania (Viannia) braziliensis American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil*. Acta Tropica, n. 93, 2005.

CASTRO, E.A., et al. *Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998*. Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, n. 35, 2002.

COLES, E. H. *Cerebrospinal fluid*. In: COLES, E. H. Veterinary clinical pathology. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986.

COUTINHO, S. G., et al. *A survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur*. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, n. 80, 1985.

CURTI, M. C. M., et al. *Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná*. Revista Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas, n. 30, 2009.

DIAS, M., et al. *Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana. I – Estudo de reservatórios em área endêmica no Estado de Minas Gerais*. Revista Instituto Medicina Tropical, n. 19, 1977.

DIAS, R.C.F., et al. *Occurrence of anti-Leishmania spp. antibodies in domiciled dogs from the city of Foz do Iguaçu, state of Paraná, Brazil*. In: Fifth World Congress on Leishmaniasis, Paraná, Brazil, 2013.

FALQUETO, A., et al. *Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil*. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, n. 81, 1986.

FIGUEIREDO, F.B., et al. *Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos*

autóctones no município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina. Acta Scientiae Veterinariae, n. 40, 2012.

FOSSUM, T. W. *Cirurgia de pequenos animais*. 3 ed. Rio de Janeiro – RJ: Elsevier, 2008 .

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. *Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects*. *Revista Brasileira Epidemiologia*, v. 07, n. 3, set.. 2004.

GRIMALDI, G.J., et al. *The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine **Leishmania infantum** infections in an endemic area with high transmission rates*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 06, n. 86, 2012.

KIRK, R. W.; BISTNER, S. I. *Manual de Procedimentos e Tratamento de Emergência em Medicina Veterinária*. São Paulo: Editora Manole, 1987.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. ***Lutzomyia longipalpis** and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 8, 2005.

LEONARDO, F. S.; REBELO, J. M. M. ***Lutzomyia whitmani** periurbanization in a focus of cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil*. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical* [online], v. 37, n. 4, mai. jun., 2004.

LONARDONI, M. V. C., et al. *Nota sobre leishmaniose canina no noroeste do Estado do Paraná, sul do Brasil*. *Revista Saúde Pública*, n. 27, 1993.

LUZ, E., et al. ***Lutzomyia whitmani** (Diptera: Psychodidae) as vector of **Leishmania (V.) braziliensis** in Paraná state, southern Brazil*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, n. 4, 2000.

MARZOCHI, M. C., et al. *Vacuum aspiratory puncture system For **Leishmania** culturing, isolation and transport preliminary report*. *Revista Instituto Medicina Tropical*, v. 03, n. 35, mai. jun. 1993.

MAZIERO, N., e al. *Rural–urban focus of canine visceral leishmaniosis in the farwestern region of Santa Catarina State, Brazil*. *Veterinary Parasitology*,

n. 205, 2014.

MENDONÇA, C.L., et al. *Avaliação clínica e hematológica em bezerros Nelore infectados experimentalmente com isolados de **Babesia bigemina** das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil*. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v.23, n.2, 2003.

METTLER, M., et al. *Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel test) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic **Leishmania** infections in dogs*. Journal Clinical Microbiology, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MS, Ministério da Saúde. *Guia de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. FNS/CENEP, Brasília, 1994.

MS, Ministério Da Saúde. *Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília, 2000.

MS, Ministério Da Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília, 2003.

MS, Ministério Da Saúde. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília, 2006.

MS, Ministério Da Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2 ed. Brasília, 2007.

MS, Ministério Da Saúde. *Nota técnica N° /2011 – UVR/CGDT/DEVEP/SVS/ MS, 2011*. Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. 2011.

MIRANDA, R. N.; CUNHA, C.; SCHWEIDSON, J. *A Leishmaniose Tegumentar no Paraná*. Revista Médica do Paraná, n. 24, 1955.

PARANÁ, Governo do Paraná. *Paraná registra primeiro caso de leishmaniose visceral em humanos*. 16 jul. 2015. Disponível em: <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=84980> Acesso em: 20 jul. 2015.

PENNA, H. A. *Leishmaniose Visceral no Brasil*. Brasil-Médico, v. 48, 1934.

PESSÔA, S. B.; BARRETTO, M. P. *Leishmaniose tegumentar*. Imprensa Nacional, 1944.

ROMERO, G.A.S. WHO, *Control of leishmaniasis: report of a WHO Expert Committee*. Wld l techn., 1990.

SAVANI, E. S. M. M., et al. *Inquérito sorológico sobre leishmaniose tegumentar americana em cães errantes no Estado de São Paulo, Brasil*. Revista Saúde Pública. [online], v. 33, n. 6, dez., 1999.

SESSA, P. A.; FALQUETO, A.; VAREJÃO, J. B. M. *Tentativa de controle da leishmaniose tegumentar americana por meio do tratamento dos cães doentes*. Caderno Saúde Pública, n. 10, 1994.

SILVA, D. A., et al. *Leishmaniose Visceral Canina em Cachoeiras de Macacu, RJ - Relato de Caso*. Clínica Veterinária, n. 95, 2011.

Steindel, M., et al. *Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil*. Pesquisa Veterinária Brasileira, n. 33, 2013.

TEODORO, U., et al. *Reorganization and cleanness of peridomiciliar area to control sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in South Brazil*. Brazilian Archives Biology and Technology, n. 47, 2004.

THOMAZ-SOCCOL, V., et al. *A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of the State of Paraná, south of Brazil*. Acta Tropica, n. 111, 2009.

VELASQUE-GAMA, F. G., et al. *Colheita de líquido cefalorraquidiano em cães: modificação de técnica prévia*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n. 2, abr. jun., 2009.

ZAMPROGNO, H. *Células-tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas*. Acta Science Veterinariae, v.35, n.2, 2007.

ANEXOS

Ficha Epidemiológica para Leishmaniose Visceral

FICHA EPIDEMIOLÓGICA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

Data: ____/____/____

RG: _____

Encaminhamento: ☐ CCZ ☐ HV ☐ PARTICULAR

RESENHA

Nome do animal: _____ Raça: _____

Idade: _____ Peso: _____ Pelagem: _____ Sexo: ☐ M ☐ F

Nome do proprietário: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Município: _____ Estado: _____

Procedência: _____

ANAMNESE

Queixa principal: _____

Tratamento: ☐ SIM ☐ NÃO Se sim, qual? _____Vacinação: ☐ SIM ☐ NÃO Se sim, qual? _____Vermifugação: ☐ SIM ☐ NÃOEctoparasitos: ☐ SIM ☐ NÃO

Outras observações: _____

EXAME CLÍNICO

Temperatura: _____

Emagrecimento: ☐ SIM ☐ NÃO

Mucosa: _____

Outros sinais clínicos:

☐ Epistaxe☐ Onicogrifose☐ Descamação☐ Erosões e úlceras☐ Hiperqueratose☐ Lesões oculares☐ Alopecia (peri-orbital)☐ Alopecia localizada☐ Alopecia generalizada☐ Hepatomegalia☐ Esplenomegalia☐ Linfonodo reativo☐ Apatia

Observações: _____

Ficha Epidemiológica para Leishmaniose Tegumentar Americana

FICHA EPIDEMIOLÓGICA PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Data: ____/____/____

RG: _____

Encaminhamento: ☐ CCZ ☐ HV ☐ PARTICULAR

RESENHA

Nome do animal: _____ Raça: _____

Idade: _____ Peso: _____ Pelagem: _____ Sexo: ☐ M ☐ F

Nome do proprietário: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Município: _____ Estado: _____

Procedência: _____

ANAMNESE

Queixa principal: _____

Tratamento: ☐ SIM ☐ NÃO Se sim, qual? _____Vacinação: ☐ SIM ☐ NÃO Se sim, qual? _____Vermifugação: ☐ SIM ☐ NÃOEctoparasitos: ☐ SIM ☐ NÃO

Outras observações: _____

EXAME CLÍNICO

Temperatura: _____

Emagrecimento: ☐ SIM ☐ NÃO

Mucosa: _____

Outros sinais clínicos:

☐ Epistaxe☐ Onicogribose☐ Descamação☐ Erosões e úlceras☐ Hiperqueratose☐ Lesões oculares☐ Alopecia (peri-orbital)☐ Alopecia localizada☐ Alopecia generalizada☐ Hepatomegalia☐ Esplenomegalia☐ Linfonodo reativo☐ Apatia

Observações: _____

Colheita de Material para Diagnóstico de Leishmaniose

Colheita de soro

Para o diagnóstico sorológico da LVC é necessária a colheita de sangue em tubos sem anticoagulantes ou com ativador de coágulo para separação de soro e hemácias. A qualidade do soro é fundamental para evitar resultado falso positivo ou falso negativo. Material turvo, lipêmico, hemorrágico ou com contaminação bacteriana podem comprometer o resultado do exame.

Antes da colheita de sangue deve ser feita a contenção do animal, evitando o estresse do mesmo, em seguida deve-se limpar a área para colheita de sangue com álcool 70, secar com gaze esterilizada e pressionar a área da veia com torniquete ou manualmente para ocluir o fluxo sanguíneo e proceder com a colheita de sangue.

As áreas mais indicadas para colheita de sangue são as veias jugular, cefálica, safena lateral ou femoral. Para cada área de colheita de sangue há uma contenção adequada para facilitar o procedimento.

Para colheita de sangue na veia cefálica ou safena lateral o animal deve estar em decúbito esternal, sendo contido por um assistente ficando do lado oposto ao que será puncionada a veia. A cabeça e o pescoço devem ser imobilizados e segurar o membro torácico.

Para a colheita de sangue na veia jugular, quando o animal estiver a campo deve-se colocar o braço na região esternal do animal e colocá-lo ao seu lado. Após este procedimento, imobiliza-se os membros torácicos com a mão na região das articulações úmero-carpo radial e com a outra mão ergue-se a mandíbula do cão para cima e para trás estendendo.

Após a colheita do sangue e a correta etiquetagem das amostras, é fundamental e devem ser mantidas em caixas isotérmicas até a chegada ao laboratório para separação do soro por centrifugação (1.300g por

10 minutos). Após a centrifugação o soro deve ser transferido para um microtubo de 2mL, devidamente identificado, e armazenar o soro a 4°C até o momento de envio para laboratório credenciado ou a execução do exame. Para envio ao laboratório são utilizadas caixas isotérmicas com gelo reciclável, a caixa deve ser lacrada e identificada como material de risco biológico. A quantidade de soro a ser enviada deve ser 100 a 500 µL.

Separação de camada leucocitária para cultura, pesquisa de formas amastigotas ou reação em cadeia da polimerase

Para obtenção de camada leucocitária para isolamento do parasito ou realização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), o sangue deve ser colhido conforme metodologia descrita acima, porém os **tubos a serem usados são com anticoagulante** (EDTA para uso em PCR). Após colheita a amostra deve ser enviada em no máximo 48 horas para laboratório credenciado. A amostra para cultura deve ser conservada e enviada a temperatura ambiente, e se for para PCR, tem que manter refrigerado e enviar com gelo devidamente identificadas como material de risco biológico.

Isolamento do parasito ou colheita de amostra para PCR

Material de escolha:

- 1) punção de linfonodo - LN
- 2) líquido cefalorraquidiano - LCR
- 3) medula óssea - MO

A colheita de LN é feita por aspiração com auxílio de agulha de calibre 23 ou 25. Primeiro o animal é contido e feito anestesia local. O local a ser colhido deve ser limpo com álcool 70. Após secar a área com gaze

esterilizada, insere-se a agulha no parênquima do linfonodo, puxa o êmbolo da seringa (de 20mL) em até no mínimo 10mL de pressão negativa. Após a retirada da agulha do linfonodo remove-se a agulha da seringa e o material pode ser inoculado em meio de cultura ou preparar lâminas para coloração específica para pesquisa de formas amastigotas. O gânglio de eleição é o poplíteo, que em caso de LVC geralmente está aumentado.

A colheita do LCR é realizada por punção do espaço sub-aracnoideo na região do forame magno ou com os cães posicionados em decúbito lateral direito e com a cabeça flexionada em ângulo aproximado de 90° em relação à coluna vertebral. Com o dedo polegar esquerdo palpa-se o processo espinhoso do áxis, em sentido caudo-cranial, palpando e deslizando o dedo até atingir o tubérculo dorsal do atlas, no qual o dedo fica apoiado. Com a mão direita introduz-se uma agulha (espessura de 0,55 a 0,80mm e comprimento oscilando entre 20 e 40mm), sem mandril, dependendo do tamanho do animal, cranialmente ao dedo apoiado.

As punções de MO podem ser feitas na crista ilíaca, trocanter maior do fêmur, área transilíaca e região epifisária proximal do úmero. O animal deve ser anestesiado, realiza-se uma antisepsia com álcool 70. A posição do animal para colheita deve ser de acordo com o local de eleição. Se colheita no osso femoral ou tibial, deve-se manter o animal em decúbito lateral. Já se a colheita for realizada na crista ilíaca, deve-se manter o animal em decúbito ventral.

Para melhores resultados nas colheitas de LN, LCR ou MO a seringa pode ser preparada com 0,5mL de soro fisiológico esterilizado e contendo antibióticos (penicilina G potássica 25.000 U + estreptomicina 100 µg/mL). Após a colheita da amostra o material deve ser inoculado em meio de cultura (de preferência meio Novy, Neal e Nicolle – NNN) e enviado ao laboratório em caixas isotérmicas e no máximo de 48 horas, ou ainda pode ser usado para preparação de lâminas para pesquisa de formas amastigotas.

Material de necropsia

Quando o animal for necropsiado os seguintes materiais podem ser colhidos para isolamento do parasito: fragmento de baço, fígado, gânglios poplíteos e medula.

Técnica de Escarificação e Coloração:

Material utilizado

- Luvas;
- Lanceta, estilete apropriados, devidamente esterilizados;
- Gaze ou algodão;
- Água destilada ou solução fisiológica;
- Lâminas novas com borda fosca;
- Esparadrapo.

Procedimento

- Fazer a limpeza da lesão ou da pele com água destilada ou solução fisiológica, usando gaze. Se o animal tiver mais de uma lesão, eleger duas lesões mais recentes;
- Secar com gaze esterilizada;
- Com auxílio do estilete apropriado, escarificar três áreas diferentes da borda interna de cada lesão, de preferência na área eritematosa de superfície íntegra que a circunda;
- Identificar as lâminas;
- Colher material rico em linfa, tendo o cuidado de comprimir a lesão para não sangrar;
- Fazer, em cada lâmina, três esfregaços em um só sentido, cuidando para não retornar com o estilete sobre o material já estendido para não retirá-lo de volta. O estilete deve ficar na posição horizontal em relação à lâmina. Obs.: havendo uma

lesão, fazer duas lâminas com três esfregaços, e se houver mais de uma lesão, fazer uma lâmina de cada lesão (duas), com três esfregaços;

- Proteger a lesão com gaze e esparadrapo.

Coloração de May-Grunwald-Giemsa

- Cobrir a lâmina com metanol por 2 minutos para a fixação;
- Em um tubo tipo falcon de 15mL, misturar 3 gotas do corante Giemsa para cada 2mL de água destilada;
- Cobrir a lâmina com 15 a 20 gotas de corante May-Grunwald por 3 minutos;
- Acrescentar 20 gotas de água destilada, homogeneizar e deixar agir por 2 minutos;
- Deixar escorrer a água da lâmina, após cobrir com solução diluída de Giemsa (preparada no início do procedimento), e deixar agir por 10 minutos;
- Deixar escorrer o corante e lavar a lâmina em água corrente;
- Secar a lâmina em temperatura ambiente;
- Fazer a leitura em microscópio óptico (objetiva de 100x) com óleo de imersão.

Na observação microscópica, deve-se procurar formas amastigotas, isoladas, ou intracelularmente, que se apresentam arredondadas ou de forma ovóide, com citoplasma azul pálido, núcleo excêntrico violeta, e cinetoplasto em forma de bastonete de cor idêntica à do núcleo.

Pode-se observar também que as amastigotas podem se apresentar no esfregaço sob formas típicas e atípicas – sem núcleo; sem cinetoplasto; com núcleo, mas sem cinetoplasto visível; sem núcleo, mas com cinetoplasto; arrebatamento de núcleo; arrebatamento de membrana citoplasmática

– forma em ponta de lança. Podem também apresentar alterações em tamanho, estando maiores ou menores; o cinetoplasto pode estar sob a forma de bastão, arredondadas ou puntiformes. No microscópio, formas atípicas são achadas frequentemente. Em caso de dúvidas, procurar a observação de formas típicas.

Resultado positivo: presença de formas amastigotas de *Leishmania*.

Erros de técnica:

- **Sangue:** deve-se evitar a colheita do material com muito sangue, porque o sangue dilui o material e a quantidade de amastigotas diminui.
- **Leucócito:** é encontrado em abundância em lesão contaminada, geralmente por bactérias. Pode significar erro de colheita, uma vez que os leucócitos vão se concentrar mais no centro da lesão, lugar inadequado para a pesquisa de formas amastigotas.
- **Má coloração:**
 - » Corante forte: geralmente o aspecto das estruturas morfológicas fica com um azul intenso, o que atrapalha uma boa visualização;
 - » Corante fraco ou pouco tempo de coloração: as estruturas morfológicas ficam avermelhadas, o que leva a uma difícil observação do citoplasma, núcleo e cinetoplasto do parasito;
 - » Uso de água destilada (não tamponada): a água destilada tem um pH ácido e, se usada para a coloração,

as estruturas morfológicas tendem a ficar muito acidófilas.

- **Corante com problemas:** à observação microscópica, o esfregaço apresenta grumos de corante que, quando em demasia, qualquer estrutura contida no esfregaço não fica observável.

CRMV | PR

CONSELHO
REGIONAL DE
MEDICINA
VETERINÁRIA