

Ocorrência de *Leishmania infantum* em fezes de cão

[Occurrence of *Leishmania infantum* in dog feces]

G. Nery, I.D.S. Meneses, I. Trueb, D.F. Larangeira, S.M. Barrouin-Melo

Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia – EMVZ-UFBA – Salvador, BA

RESUMO

Este é o primeiro relato sobre a ocorrência de *Leishmania* sp. em fezes de cão. Foram encontradas formas amastigotas intra e extracelulares por meio de citologia de amostra fecal de um cão apresentando hematoquezia recorrente associada à leishmaniose visceral canina. O diagnóstico de *Leishmania infantum* foi confirmado por PCR de fezes e por cultura e PCR em amostras de baço.

Palavras-chave: leishmaniose visceral canina, citologia, fezes

ABSTRACT

This is the first report of the occurrence of *Leishmania* sp. in dog feces. Intra and extracellular amastigote forms were found by cytology in fecal samples from a dog presenting recurrent hematochezia associated with canine visceral leishmaniasis. Diagnosis of *Leishmania infantum* was confirmed in the feces by PCR and in spleen samples by culture and PCR.

Keywords: canine visceral leishmaniosis, cytology, stool

INTRODUÇÃO

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença zoonótica sistêmica, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida por meio do inseto vetor do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo. A doença afeta o homem e outros mamíferos, como os cães, que são incriminados como o principal reservatório da doença em áreas urbanas. Nos cães, formas amastigotas vêm sendo frequentemente descritas no baço, no fígado, na medula óssea, nos linfonodos, no sangue e na pele (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Eventualmente, os parasitos podem se espalhar para outros tecidos, como já foi descrito no trato gastrointestinal (Ellul *et al.*, 2007; Toplu e Aydogan, 2011). No entanto, o achado de formas parasitárias de *Leishmania* sp. nunca foi descrito em fezes de cão.

A presença de formas amastigotas de *Leishmania* em diferentes tecidos e órgãos do hospedeiro provoca uma reação inflamatória, que ocasiona as diversas lesões observadas na leishmaniose

visceral canina (LVC) (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Devido a fatores inerentes à competência imunológica do indivíduo, a infecção pode ocorrer com ou sem sinais clínicos, podendo aparecer meses ou anos após a infecção. Os sinais clínicos mais frequentes são anemia, onicogrifose, emagrecimento progressivo, apatia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, lesões cutâneas, lesões oftálmicas e lesões renais (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

O objetivo deste trabalho foi descrever um achado atípico de *Leishmania infantum* em fezes de um cão naturalmente infectado que apresentava hematoquezia. Este é o primeiro relato encontrado na literatura sobre a observação de formas de *Leishmania* sp. em amostra fecal de cão.

MATERIAL E MÉTODOS

Um cão, macho, de três anos de idade e da raça Boxer, apresentando histórico de intensa perda de peso associada à hematoquezia por dois

meses, foi examinado no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Bahia. O cão havia sido tratado com drogas anti-helmínticas (2.310mg de Drontal Plus®, Bayer, Brasil) e metronidazol (50mg/kg SID, por cinco dias), sem melhora dos sinais clínicos relatados. O animal também apresentava intensa redução do apetite. O guardião não relatou nenhuma outra alteração.

Por viver em uma área considerada endêmica para LV, no nordeste do estado da Bahia, o cão havia sido vacinado previamente com a vacina contra LVC (Leishmune®, Fort Dodge, Brasil). O protocolo vacinal anual contra doenças infecciosas também havia sido realizado corretamente.

Amostras de sangue foram coletadas para realização de hemograma (Bioeasy, Brasil), bioquímica sérica como proteína total, globulina, albumina, amilase, ureia, creatinina, ALT e fosfatase alcalina (Doles, Brasil) e sorologia para diagnóstico de erliquiose (Immunocomb Dot-Elisa, Biogal, Israel). Esfregaços sanguíneos foram corados com *kit* panótico (Isntaprov, Brasil) e examinados em microscópio óptico (1000x) para contagem diferencial dos leucócitos e avaliação da morfologia celular.

O teste qualitativo para tripsina fecal foi realizado em amostras de fezes frescas coletadas diretamente do reto com um cateter uretral macio e flexível. Um fino esfregaço de fezes frescas foi preparado utilizando-se um *swab* de algodão em uma lâmina de vidro de microscopia para realização da citologia. Depois de secas à temperatura ambiente (23°C), as lâminas foram coradas com *kit* panótico (Isntaprov, Brasil) e examinadas em microscópio óptico (1000x). Amostras fecais também foram submetidas aos métodos de sedimentação e flutuação, em solução saturada de açúcar, para se investigar infecção por helmintos gastrointestinais e por protozoários.

A técnica de PCR foi utilizada para confirmar o diagnóstico citológico de *Leishmania* em fezes e para definir a espécie de parasito que causou a infecção. O DNA da amostra fecal foi extraído com o *kit* comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit, conforme protocolo sugerido pelo fabricante (Qiagen, Alemanha). A técnica de PCR foi realizada como descrita por Lachaud *et al.* (2002), utilizando-se os *primers* RV1 (forward;

5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e RV2 (reverse; 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3') (Invitrogen Life, Brasil), que são específicos para *L. infantum*. O cão foi também submetido à punção esplênica para realização de diagnóstico parasitológico, por meio de cultura (Barrouin-Melo, *et al.*, 2004), e molecular, por PCR (Lachaud *et al.*, 2002). Antes da realização da PCR, as amostras de baço foram submetidas à extração de DNA utilizando-se o *kit* comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit*® (Invitrogen Life, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

Um protocolo terapêutico contra LVC foi imediatamente iniciado (Amusatogui *et al.*, 1995). O protocolo incluiu uma associação entre drogas como metronidazol (16mg/kg, via oral (VO), BID, por 30 dias), cetoconazol (10mg/kg, VO, SID, por 40 dias), e, a partir do 31º dia do início do tratamento, foi iniciado o alopurinol (10mg/kg, VO, BID). O cão foi examinado depois de quatro semanas, para nova avaliação e monitoramento de resposta ao tratamento, e após três meses do início do tratamento, quando os exames foram novamente repetidos.

O presente estudo teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, sob o protocolo nº 19/2011.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira avaliação, o cão apresentava emaciação e estava pesando 25kg, peso definido como muito baixo, considerando-se o sexo e a raça do animal. Hipertermia e aumento de baço e linfonodos poplíteos também foram observados durante o exame físico.

O cão apresentou resultado negativo ao exame sorológico para erliquiose, e também não foram visualizados parasito, inclusão ou outra anormalidade morfológica no exame microscópico do esfregaço do sangue.

Antes do tratamento, as anormalidades observadas no hemograma e em exames bioquímicos séricos foram aumento de bastonetes, hiperproteinemia e elevação de amilase (Tab. 1).

Nas fezes, o resultado do exame de tripsina estava dentro dos valores de normalidade. A

citologia fecal revelou numerosas formas amastigotas de *Leishmania* sp., visualizadas entre diversas bactérias, células epiteliais colunares, eritrócitos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos (Fig. 1).

Tabela 1. Resultados do hemograma e da bioquímica sérica antes (D0) e depois (D90) do tratamento de um cão com LVC apresentando hematoquezia recorrente e *L. infantum* em fezes

| Eritrograma | D0 | D90 | Valor de referência |
|---------------------------|---------|---------|-------------------------|
| Hemácia (milhão/ μ L) | 5,94 | 7,1 | (5.500.000 - 8.500.000) |
| Hemoglobina (g/dL) | 13,4 | 14,7 | (12,0-18,0) |
| Hematócrito (%) | 40% | 43,50% | (37-55) |
| MCV (fL) | 67,3 | 61,4 | (60,0-77,0) |
| MCH (pg) | 22,6 | 22,8 | (19,0- 23,0) |
| MCHV (g/dL) | 33,5 | 33,8 | (32,0- 36,0) |
| Leucograma | | | |
| Leucócitos (μ L) | 9.300 | 10.500 | (6.000-17.000) |
| Neutrófilos (μ L) | 5.952 | 7.980 | (3.500-11.500) |
| Bastonete (μ L) | 1.395 | 0 | (0-300) |
| Eosinófilos (μ L) | 186 | 630 | (100-1.250) |
| Linfócitos (μ L) | 1.023 | 1.470 | (1.000-4.800) |
| Monócitos (μ L) | 744 | 420 | (150-1.350) |
| Plaqueta (μ L) | 408.000 | 284.000 | (166.000-540.000) |
| Bioquímica sérica | | | |
| Proteína total (g/dL) | 9,0 | 8,6 | (5,4-7,1) |
| Globulina (g/dL) | 6,8 | 6,5 | (2,7-4,4) |
| Albumina (g/dL) | 2,2 | 2,1 | (2,6-4,0) |
| Amilase (U/L) | 2.049 | 1.470 | (269-1.500) |
| Creatinina (mg/dL) | 1,2 | 1,2 | (0,5-1,6) |
| ALT (UI/l) | 18,3 | 56 | (21-102) |
| Fosfatase alcalina (UI/l) | 27,9 | 133 | (20-156) |

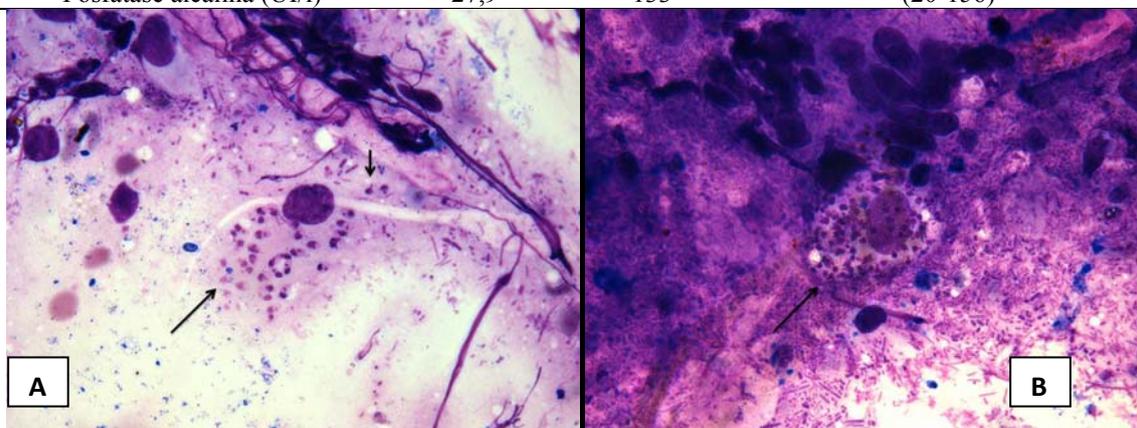


Figura 1. Citologia de amostra fecal coletada de um cão com LVC apresentando hematoquezia recorrente. A - Visualização intracelular (seta grande) e extracelular (seta pequena) de formas amastigotas de *L. infantum*. B - Visualização intracelular de formas amastigotas de *L. infantum* (seta grande) (1000x – coradas por panótico).

A pesquisa de DNA parasitário por PCR para diagnóstico de infecção por *L. infantum* foi positiva nas amostras fecal e esplênica. Por meio da cultura da amostra de baço, foi possível a visualização e o isolamento do parasito.

Depois de quatro semanas de tratamento, o cão ganhou peso (1,6kg), apresentou melhora no quadro de diarreia e recuperou o apetite habitual. Depois de três meses de tratamento, todos os parâmetros hematológicos estavam dentro dos valores de normalidade, exceto os valores de

proteína total, albumina e globulina (Tab. 1). Nenhuma anormalidade clínica foi observada, e o cão ganhou mais 1,5kg na avaliação do terceiro mês pós-tratamento. A PCR do baço continuou positiva, mas, na cultura de aspirado esplênico, não foi mais visualizado o parasito.

A literatura contém relatos de achados de macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania* na lâmina própria da mucosa intestinal e da submucosa do trato gastrointestinal (Toplu e Aydogan, 2011; Pinto et al., 2011; Ferrer et al., 1991; Silva et al., 2002; Adamama-Moraitou et al., 2007). No entanto, acreditava-se que a probabilidade de macrófagos infectados passarem para as fezes dos cães seria baixa (Pinto et al., 2012). Há apenas um trabalho recente na literatura que relata a presença de *Leishmania major* em fezes de gorilas (Hamad et al., 2014), mas esta nunca havia sido observada em fezes caninas.

No presente caso, o diagnóstico de LVC foi confirmado por citologia e por outras técnicas, incluindo cultura e PCR de aspirado esplênico. A positividade da amostra de fezes na PCR para *L. infantum* confirmou não apenas a presença do material genético nas fezes, mas também o diagnóstico etiológico, atestando o diagnóstico parasitológico por microscopia direta, indicado pela citologia fecal. A presença do parasito, associada à intensa resposta inflamatória, parece ter contribuído para a lesão crônica e persistente das camadas da mucosa e da submucosa, indicada pela diarreia sanguinolenta de longa duração.

Poder-se-ia supor que uma possível contaminação da amostra fecal com *Leishmania* poderia ter acontecido devido à perfuração acidental de lesões perianais contendo parasitos. Entretanto, o cão não tinha evidências clínicas de lesões anais ou perianais, e também não foram observados parasitos em esfregaço de sangue avaliado no hemograma. Além disso, a amostra foi cuidadosamente coletada utilizando-se um cateter fino e macio, de modo a impedir lesões na mucosa do reto e possível contaminação com sangue.

As alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas observadas no presente relato, apesar de serem inespecíficas, são frequentemente observadas em cães com

leishmaniose visceral (Ciaramella et al., 1997). A melhora dos parâmetros clínicos e laboratoriais, após o início do tratamento com drogas anti-*Leishmania*, reforça o diagnóstico etiológico.

Células inflamatórias e de descamação foram observadas na citologia fecal, indicando presença de colite distal. Esse tipo de lesão já foi descrito em estudos histopatológicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. (Pinto et al., 2011; Adamama-Moraitou et al., 2007). Pinto et al. (2011) relataram alto índice de parasitismo nas extremidades do intestino, do cólon e do ceco. Clinicamente, a colite associada à LVC é caracterizada por aumento da frequência da defecação, presença de muco nas fezes e hematoquezia (Adamama-Moraitou et al., 2007). Esses sinais são equivalentes aos sinais que o cão avaliado estava exibindo e podem indicar um desenvolvimento fisiopatológico de lesões intestinais causadas pela *Leishmania*. Adicionalmente, a diarreia com sangue cessou apenas após o início do tratamento contra LVC. É importante enfatizar que nenhuma melhora do quadro clínico foi observada anteriormente com o tratamento ministrado com drogas anti-helmínticas ou com doses baixas de metronidazol. Dessa forma, o sucesso da abordagem terapêutica, considerando-se a manifestação intestinal de LVC, reforçou a constatação de *L. infantum* como agente etiológico da diarreia sanguinolenta.

A leishmaniose visceral canina pode ocorrer com uma grande variedade de manifestações clínicas em áreas endêmicas, incluindo casos em que o único sinal clínico é diarreia com sangue (Adamama-Moraitou et al., 2007). Apresentações atípicas não devem ser excluídas da suspeita de LVC, mas devem ser investigadas com a maior variedade possível de ferramentas laboratoriais, considerando-se as características e a localização da lesão principal, assim como a natureza da amostra biológica.

O exame microscópico da citologia fecal tem sido aplicado para elucidar a etiologia de enterites agudas ou crônicas, incluindo casos em que a etiologia é infecciosa, as quais envolvem microrganismos como *Giardia* sp., *Campylobacter* sp., *Clostridium* sp., *Histoplasma* sp. e *Prototheca* sp. No entanto, a citologia fecal nunca havia sido descrita para diagnóstico de enteropatia relacionada com *Leishmania*. Este é

o primeiro relato da utilização da citologia fecal como uma ferramenta capaz de diagnosticar uma apresentação clínica atípica de LVC, caracterizada principalmente por hematoquezia.

CONCLUSÃO

No presente caso, o sucesso do diagnóstico etiológico obtido por meio de citologia fecal é relatado pela primeira vez em cão. Tal achado indica a necessidade de mais estudos para avaliar a fisiopatologia da infecção por *L. infantum* no trato gastrointestinal de cães.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo fundo de pesquisa PRONEM-FAPESB 498/2011- PNE 0002/2011. As autoras agradecem à Fapesb, pela bolsa de estudos de doutorado (G.N.), e à Capes, pelas bolsas de mestrado (I.T) e de doutorado (I.D.M). Os financiadores não tiveram nenhuma participação no desenho do estudo, na coleta e na análise de dados, na preparação ou na decisão de publicar o manuscrito. Também agradecem à Dra. Isadora Lima (MV, MS – Fiocruz – Bahia), por ter realizado as fotos da citologia fecal.

REFERÊNCIAS

- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M.A. Tratamento de la leishmaniosis canina. *Med. Vet.*, v.12, p.289-298, 1995.
- ADAMAMA-MORAITOU, K.K.; RALLIS, T.S.; KOYTINAS, A.F. *et al.* Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.76, p.53-57, 2007.
- BARROUIN-MELO, S.M.; LARANGEIRA, D.F.; TRIGO, J. *et al.* Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.99, p.95-197, 2004.
- CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.*, v.141, p.539-543, 1997.
- ELLUL, P.; PISCOPO, T.; VASSALLO, M. Visceral leishmaniasis diagnosed on duodenal biopsy. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, v.5, p.A26, 2007.
- FERRER, L.; JUANOLA, B.; RAMOS, J.A.; RAMIS, A. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet. Pathol.*, v.28, p.342-343, 1991.
- HAMAD, I.; FORESTIER, C.L.; PEETERS, M. *et al.* Wild Gorillas as a Potential Reservoir of *Leishmania major*. *J. Infec. Dis.*, v.211, p.267-73, 2014.
- LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P. *et al.* Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*, v.125, p.197-207, 2002.
- PINTO, A.J.; FIGUEIREDO, M.M.; SILVA, F.L. *et al.* Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet. Scand.*, v.53, p.67, 2011.
- SILVA, F.L.; TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.; TAFURI, W.L. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: A case report, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, 2002.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors*, v.4, p.86, 2011.
- TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. *Parasitol. Res.*, v.109, p.1051-1057, 2011.