

Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo

Application of direct immunofluorescence technic for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in lymph nodes aspirate

Marcio Antônio Batistela MOREIRA¹; Maria Cecília Rui LUVIZOTTO¹;
Cáris Marone NUNES¹; Tereza Cristina Cardoso da SILVA¹;
Márcia Dalastra LAURENTI²; Carlos Eduardo Pereira CORBETT²

CORRESPONDÊNCIA PARA:
MÁRCIA DALASTRA LAURENTI
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César
1º andar - sala 1209
01246-903 - São Paulo - SP
e-mail: mdl Lauren@usp.br

1- Laboratório de Patologia do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba - SP
2- Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo - SP

RESUMO

Recentemente, foco de leishmaniose visceral canina (CVL) foi descrito na região noroeste do Estado de São Paulo - Brasil. O Hospital Veterinário - UNESP - Araçatuba, no ano de 2.000, desenvolveu 60 testes citopatológicos de casos suspeitos de leishmaniose usando aspirado por agulha fina (FNA). Os esfregaços de linfonodo foram corados pelo método de Romanowsky (Diff-Quik®) e observados em microscopia de luz. Os casos positivos mostraram formas amastigotas típicas de *Leishmania* livres ou em vacúolos de macrófagos. Sinais citopatológicos de reatividade do sistema linfo-histiocitário com ausência de parasitos foram também observados. Com o objetivo de implementar o diagnóstico da CVL, detectando parasitos e material antigênico nos esfregaços, aplicou-se a reação de imunofluorescência direta (IFD) usando anticorpo policlonal anti-*Leishmania* produzido em camundongo. Comparamos o método de IFD com a pesquisa direta do parasito em esfregaços corados pelo método de Romanowsky. Dos 60 cães com sinais clínicos da doença, o exame direto foi positivo em 50% (n=30), duvidoso em 36,7% (n=22) e negativo com reatividade do linfonodo em 13,3% (n=8). Quando os linfonodos foram submetidos a reação de IFD observamos reação positiva em 93,3% (n=56) e reação negativa em 6,7% (n=4). Nossos resultados mostraram que a reação de IFD apresentou alta sensibilidade quando comparada a pesquisa direta do parasito pela coloração de Romanowsky. A reação de IFD pode ser um método útil para confirmar os casos duvidosos da doença, onde as formas amastigotas não são identificadas com facilidade.

PALAVRAS-CHAVE: Imunofluorescência. Leishmaniose visceral. Linfonodos de animal. Cães.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma importante endemia brasileira causada pela *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. É transmitida ao homem por picada do mosquito *Lutzomyia longipalpis*, e tem como reservatório canídeos silvestres e domésticos.

O diagnóstico indireto da doença, como a pesquisa de anticorpos em soro, tem sido bastante empregado em inquéritos epidemiológicos e pode ser feito por diferentes métodos como o de imunofluorescência indireta^{8,12,14}, ELISA^{8,9,11,14}, aglutinação direta^{4,5} e fixação do complemento^{3,5}. Dentre os métodos utilizados no diagnóstico etiológico da leishmaniose visceral canina (LVC), a identificação microscópica dos parasitos em esfregaços obtidos por punção de linfonodo, baço e medula óssea constitui-se num método eletivo, podendo-se utilizar o cultivo deste material em diferentes meios de cultura para isolamento dos parasitos⁶.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido recentemente utilizada como um método de alta especificidade e sensibilidade na identificação de DNA parasitário em tecidos e fluidos provenientes de casos humanos e caninos¹.

O diagnóstico da LVC realizado a partir de esfregaços de punção de linfonodo poplíteo corados pelo método de Romanowsky (Diff-Quik®), tem mostrado, nos casos tipicamente positivos, a presença de formas amastigotas de *Leishmania* livres ou dentro de vacúolos de macrófagos com identificação bem definida de núcleo e cinetoplasto do parasito. Porém, em alguns casos observa-se sinais citopatológicos de reatividade do sistema linfo-histiocitário com ausência de formas amastigotas típicas. Com o objetivo de aprimorar o diagnóstico da LVC em regiões endêmicas, aplicamos o método de imunofluorescência direta para a pesquisa de parasitos e seus produtos antigênicos nos esfregaços de biópsia aspirativa de linfonodos de cães com sinais clínicos da doença.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; NUNES, C.M.; SILVA, T.C.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.2, p. 103-106, 2002.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras biológicas

As amostras biológicas foram provenientes de cães atendidos no Hospital Veterinário do Curso de Medicina Veterinária da UNESP, Araçatuba no ano de 2000. Os animais foram examinados clinicamente e aqueles com suspeita de LVC foram submetidos à punção aspirativa com agulha fina (PAAF) de linfonodo poplíteo. Foram colhidas 60 amostras, das quais, esfregaços pareados em lâminas de vidro eram submetidos à coloração de Romanowsky (Diff-Quik®) e fixados em álcool/éter volume a volume para a reação de imunofluorescência direta.

Preparo do conjugado

Camundongos BALB/c foram inoculados com 10^7 formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa HSJD-1) pela via subcutânea de inoculação. Após 60 a 90 dias de infecção, quando os animais já mostravam sinais clínicos da doença, caracterizados por lesões infiltrativas no coxim plantar traseiro, o sangue foi colhido através de punção do seio retro-orbitário para obtenção de soro imune. O título de anticorpos reagentes para antígenos de *Leishmania* neste soro imune foi testado por imunofluorescência indireta (IFD) utilizando-se anti-imunoglobulina de camundongo conjugada a fluoresceína (SIGMA, n° cat. F-8646) na diluição de 1/20, e resultou em um título reagente de 128. Este soro imune foi posteriormente conjugado com fluoresceína de acordo com Camargo² e estocado até o uso em freezer -20°C .

Reação de Imunofluorescência Direta

O anticorpo anti-*Leishmania* após conjugação com a fluoresceína foi titulado para a reação de imunofluorescência direta utilizando-se lâminas preparadas com promastigotas de *L. chagasi* e resultou em um título reagente de 200.

Os esfregaços de linfonodo fixados em álcool/éter por 30 minutos foram incubados com o anticorpo policlonal anti-*Leishmania* na diluição de 1/200 em Azul de Evans a 37°C por 60 minutos em câmara úmida. Após o período de incubação as lâminas foram lavadas com PBS 0,01M pH 7,2 por 10 minutos com três trocas, montadas com lamínulas utilizando-se glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,0 e observadas em microscópio de fluorescência (ZEISS). Como controle positivo da reação foi utilizado esfregaço de linfonodo de cão que apresentava grande quantidade de parasitos nos esfregaços corados pelo Romanowsky (Diff-Quik®) e lâminas preparadas com promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Como controle negativo, utilizaram-se esfregaços de linfonodo de cães saudáveis de área sem ocorrência de LVC.

RESULTADOS

Do total das amostras de punção de linfonodos corados pelo método de Romanowsky (Diff-Quik®) e

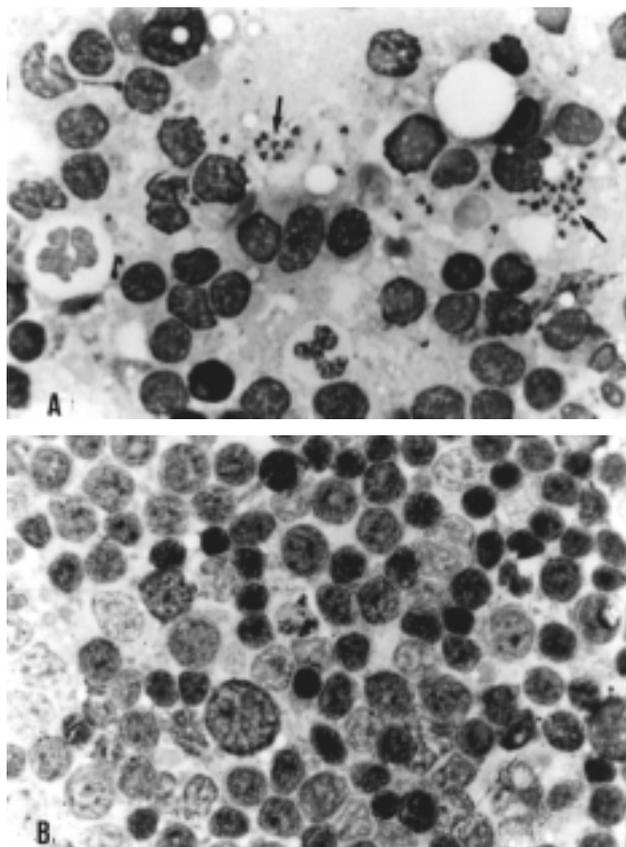


Figura 1

Esfregaço de aspirado de linfonodo poplíteo de cão com suspeita clínica de leishmaniose visceral. A – Presença de linfócitos, macrófagos, poucos neutrófilos e inúmeras formas amastigotas do parasito. B – Presença de células mononucleares, linfócitos, macrófagos e plasmócitos sem evidência de formas amastigotas do parasito (Método de Romanowsky - A.O. 100X).

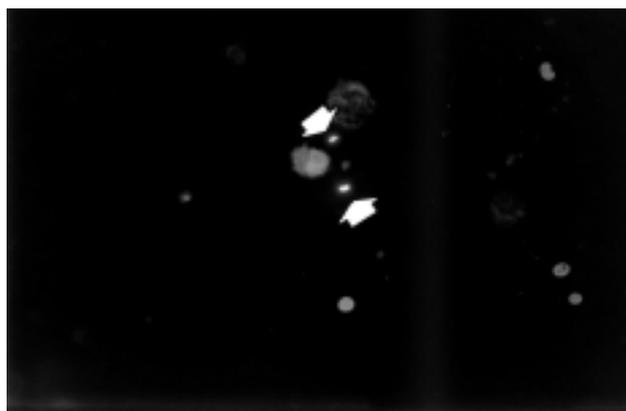


Figura 2

Esfregaço de aspirado de linfonodo poplíteo de cão com suspeita clínica de leishmaniose visceral, e com diagnóstico não confirmado pelo método de Romanowsky. Presença de formas amastigotas do parasito positivas para o anticorpo policlonal anti-*Leishmania* conjugado a fluoresceína (IFD - A.O. 63X).

Tabela 1

Distribuição de resultados, em número absoluto e porcentagem, de 60 esfregaços de aspirado de linfonodo poplíteo de cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral no município de Araçatuba (SP) no ano de 2000, de acordo com o método de Romanowsky (Diff-Quik®) e a imunomarcagem utilizando-se anticorpo policlonal anti-*Leishmania* conjugado a fluoresceína pelo método de imunofluorescência direta (IFD).

	Número de casos	Positivo	Suspeito	Negativo	Total
Metodologia					
Romanowsky		30 (50%)	22 (36,7%)	8 (13,3%)	60 (100%)
IFD		56 (93,3%)	0 (0%)	4 (6,7%)	60 (100%)

examinados em microscopia de luz convencional para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania*, 50% mostraram positividade (30/60) (Fig. 1A). Nestes casos foi possível observar formas amastigotas típicas medindo aproximadamente 5 µm, com núcleo e cinetoplasto característicos. O diagnóstico suspeito da doença foi atribuído a 22 amostras (36,7%), as quais mostraram macrófagos vacuolizados, proliferação linfoblástica, plasmocitose moderada e muitas vezes a presença de eosinófilos, sem no entanto, serem observadas formas amastigotas típicas do parasito (Fig. 1B). Oito casos (13,4%) apresentaram discreta reação linfocitária sem parasitismo, portanto, foram considerados negativos para leishmaniose. O método de imunofluorescência direta (IFD) mostrou positividade em 56 amostras (93,3%), com a observação de estruturas elípticas fluorescentes e a presença de cinetoplasto visível em alguns casos (Fig. 2). Em 4 casos (6,7%) a reação de imunofluorescência foi negativa (Tab. 1).

DISCUSSÃO

No presente estudo, os esfregaços de punção de linfonodo poplíteo de cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral foram primeiramente examinados em microscopia de luz e em seguida em microscopia de fluorescência. Ao diagnóstico citopatológico encontraram-se formas amastigotas típicas do parasito em 50% dos casos, sendo que esta metodologia foi realizado de modo rápido e mostrou alta especificidade. As amostras em que foram observadas reação celular pronunciada, com macrófagos e linfócitos, sem a presença evidente de formas amastigotas, resultaram em diagnóstico suspeito de LVC, pois mesmo sem a presença de formas amastigotas típicas a reação celular encontrada é característica da doença¹⁰. Somente para as amostras em que foram observadas reatividade discreta e nenhuma estrutura sugestiva de formas amastigotas é que foi atribuído o diagnóstico de linfonodo reativo e negativo para leishmaniose. Desta maneira, 50% dos casos foram

considerados positivos, 36,7% suspeitos e 13,3% receberam o diagnóstico de linfonodo reativo e negativo para leishmaniose, de acordo com o exame direto nos esfregaços citológicos corado pelo Romanowsky. Quando estas amostras foram submetidas ao método de IFD, observou-se um maior índice de positividade (93,36%) com a presença de pontilhados e formas elípticas fluorescentes, sendo que em algumas amostras foi possível a observação de estruturas intracelulares do parasito como o cinetoplasto. Essas estavam em maior frequência livres pelo esfregaço, entretanto, próximo as células linfóides e raramente no interior de células fagocíticas. Em 6,7% (4/60) dos casos observou-se reação totalmente negativa sem nenhuma estrutura fluorescente.

A pesquisa direta positiva de parasitos em lesão de pele e em vísceras tem sido considerada como diagnóstico de certeza para a leishmaniose tegumentar e visceral, respectivamente. Na leishmaniose visceral canina, a pesquisa direta de parasitos pelo método de Romanowsky em punção aspirativa de linfonodo tem sido utilizada com relativa eficiência⁷, porém não há relatos no que se refere à pesquisa do parasito por técnicas de imunomarcagem. Em 40 biópsias de pacientes com lesão cutânea causada pela LTA, 20% apresentaram pesquisa positiva do parasito por técnicas de rotina histopatológicas (H&E), enquanto que 64,51% por imunoperoxidase e 89,28% por imunofluorescência indireta. Estes resultados mostram maior índice de positividade para a pesquisa de parasitos quando utilizados métodos de imunomarcagem, sendo a imunofluorescência de maior sensibilidade quando comparada à imunoperoxidase¹³.

Nossos resultados mostraram que o método de imunofluorescência direta (IFD) apresentou maior sensibilidade quando comparado a pesquisa direta do parasito pela coloração de Romanowsky. Desta forma, o método de IFD deve ser utilizado para confirmação dos casos suspeitos de leishmaniose visceral canina em regiões endêmicas, onde o encontro de formas amastigotas do parasito pode não ser freqüente, face ao sensível incremento de sensibilidade quando comparado ao exame microscópico de rotina.

SUMMARY

Recently, canine visceral leishmaniasis (CVL) was detected in the northwest of São Paulo State - Brazil. The Veterinary Hospital - UNESP - Araçatuba, in 2.000, carried out 60 cytopathological test of suspected cases of leishmaniasis using the fine-needle aspiration (FNA). The smears of the FNA popliteal lymph nodes were stained by the Romanowsky stain (Diff-Quik®) and observed using a light microscope. The positive cases showed typical amastigotes forms of *Leishmania* either free or in macrophage vacuoles. Cytopathological signs of reactivity of the lymph-histiocitary system with the absence of parasites were also detected. In order to improve the diagnosis of CVL, looking for parasites and antigenic material detection in smears, we standardized the direct immunofluorescence assay (IFD) using mouse anti-*Leishmania* policlonal antibodies. We compared the IFD assay with the direct search of parasites in smears stained by Romanowsky stain. From the 60 dogs with clinical signs of the disease, the direct exam was positive in 50% (n=30), uncertain in 36,7% (n=22) and negative with lymph node reativity in 13,3% (n=8). When the lymph node smears were submitted to IFD assay we observed positive reaction in 93,3% (n=56) and negative reaction in 6,7% (n=4). Our results showed that IFD assay presented a high sensibility compared to parasite direct search by Romanowsky stain. The IFD assay could be useful method to confirm the uncertain cases of the disease, where amastigotes forms were not clearly identified.

KEY-WORDS: Immunofluorescence. Visceral leishmaniasis. Lymph nodes. Dogs.

REFERÊNCIAS

- 1- AVILES, H.; BELLI, A.; ARMIJOS, R.; MONROY, F. P.; HARRIS, E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: A comparison with classical diagnostic methods. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 181-187, 1999.
- 2- CAMARGO, M. **Introdução às técnicas de imunofluorescência**. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1973. Apostila.
- 3 - COSTA, C. A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P. A.; DIAS, M.; MICHALICK, S. M.; MELO, M. N.; COSTA, R. T.; MAGALHÃES ROCHA, N. M.; MYRINK, W. Leishmaniose visceral canina: avaliação da metodologia sorológica utilizada em inquéritos epidemiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 24, n. 1, p. 21-25, 1991.
- 4 - DE KORTE, P. M.; HARITH, A. E.; DEREURE, J.; HUIGEN, E.; FAUCHERRE, V.; VAN DER KAAAY, H. J. Introduction of an improved direct agglutination test for the detection of *Leishmania infantum* infection in southern France. **Parasitology Research**, v. 76, n. 6, p. 526-530, 1990.
- 5 - HARITH, A.; SLAPPENDEL, R. J.; REITER, I.; VAN KNAPEN, F.; DE KORTE, P.; HUIGEN, E.; KOLK, A. H. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 10, p. 2252-2257, 1989.
- 6 - HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
- 7 - LUVIZOTTO, M. C. R.; MOREIRA, M. A. B.; FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. Cytopathologic analysis of fine-needle aspiration biopsy of lymph node in dogs with visceral leishmaniasis in evolutive stage of the disease: clinical and pathological correlation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 95, p. 141-142, 2000. Supplement II.
- 8 - MILLESIMO, M.; ZUCCA, M.; CARAMELLO, P.; SAVOIA, D. Evaluation of the immune response in visceral leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious diseases**, v. 26, n. 1, p. 7-11, 1996.
- 9 - MUKERJI, K.; PAL, A.; BASU, D.; NASKAR, K.; MALLICK, K. K.; GHOSH, D. K. Direct enzyme-linked immunosorbent assay: a simple immunoassay using *Leishmania donovani* promastigote for diagnosis of kala-azar. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 5, n. 4, p. 299-301, 1991.
- 10 - PAIVA, M. C.; ANDRADE, H. M.; COSTA-VAL, A. P.; CARNEIRO, C. M.; CHIARELLI, I. M.; TAFURI, W. L. Some clinical and histopathological aspects of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 93, p. 276-277, 1998. Supplement II.
- 11 - RACHAMIM, N.; JAFFE, C. L.; ABRANCHES, P.; SILVA PEREIRA, M. C.; SCHNUR, L. F.; JACOBSON, R. L. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: Comparison of three methods. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 85, n. 5, p. 503-508, 1991.
- 12 - SOLEIMANZADEH, G.; EDRISSIAN, G. H.; MOVAHHED-DANESH, A. M.; NADIM, A. Epidemiological aspects of kala-azar in Meshkin-Shahr, Iran: human infection. **Bulletin of the world health organization**, v. 71, n. 6, p. 759-762, 1993.
- 13 - SOTTO, M. N.; YAMASHIRO KANASHIRO, E. H.; DA MATTA, V. L. R.; DE BRITO, T. Cutaneous leishmaniasis of the New World: Diagnostic, immunopathology and antigen pathway in skin and mucosa. **Acta Tropica**, v. 46, n. 2, p. 121-130, 1989.
- 14 - VEXENAT, J. A.; FONSECA DE CASTRO, J. A.; CAVALCANTE, R.; DA SILVA, M. R.; BATISTA, W. H.; CAMPOS, J. H.; PEREIRA, F. C.; TAVARES, J. P.; MILES, M. A. Preliminary observations on the diagnosis and transmissibility of canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Archives de Institut Pasteur de Tunis**, v. 70, n. 3-4, p. 467-472, 1993.

Recebido para publicação: 03/09/2001
Aprovado para publicação: 27/02/2002