

NEWSLETTER VETWECARE

Leishmaniose Visceral Canina: atualizações no diagnóstico, controle e prevenção

Msc., Dr. Claudio Nazaretian Rossi - Gerente Técnico da BU Pet da Ceva Saúde Animal.
Newsletter publicada e concedida como cortesia pela Ceva Saúde Animal.

Introdução, epidemiologia e etiopatogenia

A **leishmaniose visceral** (LV) é enfermidade zoonótica que apresenta ampla distribuição mundial, que acomete, além do homem, diversas espécies animais, tanto domésticas quanto silvestres. Trata-se de doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo a espécie *Leishmania infantum chagasi* o agente etiológico causador de endemia no Brasil, havendo referências de casos humanos e caninos de LV ocorridos, até o momento, em 23 e 25 unidades federativas do país, respectivamente. Dentre os hospedeiros vertebrados que podem ser infectados, o cão é aquele considerado importante na manutenção do ciclo epidemiológico da doença nas áreas urbanizadas pela alta capacidade de infectar o inseto vetor da enfermidade. Quanto à transmissão, a forma considerada epidemiologicamente importante para a manutenção do ciclo da doença é por meio da picada de flebotomíneos hematófagos infectados, sendo, no Brasil, as fêmeas das espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* aquelas implicadas até o momento como potencialmente transmissoras do protozoário. Isso se dá pelo fato de que parte do ciclo epidemiológico do parasito ocorre no tubo digestório desses vetores, que ao picarem o hospedeiro vertebrado infectado ingerem macrófagos com formas amastigotas (aflageladas) de *Leishmania*, ocorrendo, no flebotomíneo, o rompimento dessa célula e a liberação do parasito, que no seu tubo digestório, multiplica-se por divisão binária e se diferencia em formas promastigotas (flageladas), aquelas consideradas infectantes aos hospedeiros vertebrados suscetíveis. Embora não esteja claro o papel na epidemiologia da LV, outras formas de transmissão da **leishmaniose visceral canina** (LVC) incluem a vertical (da mãe para o filhote, via transplacentária), a venérea, e por transfusão sanguínea, dentre outras não comprovadas até o momento.

Com a inoculação do protozoário (forma promastigota) na pele do cão, promove-se inicialmente uma resposta inflamatória local e a fagocitose do parasito por macrófagos, no interior dos quais perdem o flagelo e se transformam em amastigotas. As amastigotas, por sua vez, se multiplicam por divisão binária no interior dos macrófagos, podendo rompê-los e serem fagocitadas por outros macrófagos, até a sua disseminação para qualquer órgão, tecido ou fluido corporal nos animais suscetíveis, mas particularmente para órgãos linfóides (linfonodos, medula óssea, baço e fígado). Na LVC, a resposta imune é basicamente mediada por células T auxiliares, sendo que a resposta celular (Th1) está normalmente associada à capacidade do hospedeiro em controlar a infecção pela produção de citocinas pró inflamatórias (interleucinas IL-2, IL-6 e IL-12, fator de necrose tumoral - TNF- α , e interferon gama - IFN- γ) e a resposta humoral (Th2) está correlacionada com a progressão da doença pela produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, e fator transformador do crescimento beta - TGF- β), sendo que a quantidade de anticorpos produzidos e imunocomplexos formados podem gerar desde um quadro subclínico até múltiplas manifestações clínicas e cujo período de incubação pode ser variável dependendo da imunocompetência do animal infectado. Apesar da aparente predisposição racial (Boxer, Rottweiler, Cocker Spaniel Inglês e Pastor Alemão) e sexual (machos) em desenvolver a doença, qualquer raça canina e sexo podem ser acometidos. Já quanto ao caráter etário, a enfermidade é mais comumente verificada em cães mais jovens (até 3 anos de idade) ou naqueles com idade superior a 7 anos, possivelmente pela predisposição genética ou por influência de causas imunodebilitantes como doenças crônicas, neoplasias, fármacos imunomoduladores, comorbidades, entre outros.

Manifestações clínicas e principais alterações laboratoriais

Relativo ao aspecto clínico, a LVC pode se manifestar com um amplo espectro de apresentações e em diferentes graus de gravidade, não havendo sinais considerados específicos ou patognomônicos da enfermidade. Dessa forma, podem ocorrer alterações clínicas relacionadas à qualquer órgão ou sistema, como o cardiorrespiratório, circulatório, digestório, geniturinário, locomotor, oftálmico, nervoso e, particularmente, o tegumentar, sendo as manifestações clínicas mais comumente observadas no cão doente: alopecia (Figura 1A), disqueratinização (Figura 1B), dermatite erodo-ulcerativa e/ou pápulo-nódulo-pustular, hiperqueratose nasodigital, onicogrifose (Figura 1B), dentre outras alterações cutâneas; linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia; emagrecimento progressivo, inapetência ou polifagia, diarreia; mucosas pálidas, letargia; poliúria, polidipsia, êmese; blefarite, ceratoconjuntivite, uveíte, endoftalmite; vasculite, quadros hemorrágicos, epistaxe, distúrbios de coagulação; artrite/poliartrite, osteomielite, polimiosite, atrofia muscular; e menos comuns, incluem-se manifestações neurológicas variadas, dentre outras.



Figura 1 - Cão com diagnóstico de leishmaniose visceral apresentando: A - Área de hipotricose em região cérvico-torácica, com presença de eritema, e crostas hemáticas (setas); B - Unhas compridas (onicogrifose), hipotricose em patas anteriores, além de escamas furfuráceas visíveis na mesa de consulta oriunda da descamação generalizada apresentada pelo animal. Fonte: Msc. Maurício Franco Zanette / Dr. Claudio Nazaretian Rossi.

Já quanto às alterações laboratoriais, de maneira semelhante às clínicas, são consideradas inespecíficas e podem estar relacionadas à problemas secundários ocasionados pela própria doença e/ou por comorbidades presentes. Dessa forma, os exames laboratoriais indicados para avaliação do estado geral e as respectivas alterações mais comumente verificadas nos animais com LVC são: proteinograma (hiperproteinemia, hipoalbuminemia, com diminuição da relação albumina:globulina); hemograma (eritograma - anemia, particularmente do tipo arregenerativa; leucograma - leucocitose ou leucopenia, linfopenia; hemostasia - trombocitopenia/citopatia, distúrbios de coagulação, fibrinólise); exame de urina (proteinúria; aumento da relação proteína:creatinina urinária - RPC); bioquímica sérica (azotemia renal; elevação do nível das enzimas hepáticas).

Diagnóstico específico

Quanto ao diagnóstico da LVC, está baseado em três categorias principais de provas, por meio dos seguintes métodos: parasitológicos, para identificação do parasito; sorológicos, para detecção de anticorpos anti- *Leishmania sp*; e moleculares, para amplificação do DNA do protozoário. Como não há nenhum método diagnóstico considerado 100% sensível e específico, cada um deles apresenta vantagens e desvantagens e são indicados dependendo dos aspectos clínico-laboratoriais apresentados pelo animal e do momento da sua infecção. Em infecções naturais da enfermidade, múltiplos métodos diagnósticos devem ser empregados, uma vez que uma única técnica pode não identificar todos os animais parasitados, na dependência particularmente do tipo de resposta imune apresentada pelo hospedeiro e do tempo decorrido entre a sua infecção e a ocasião do diagnóstico. Para cães que vivem em áreas não endêmicas para LV, é de suma importância questionar no momento da anamnese se o animal nasceu, viveu e/ou se visitou esse tipo de região, uma vez que existe a possibilidade de que tenha sido infectado pelo parasito nessas ocasiões.

Métodos parasitológicos

Os métodos parasitológicos apresentam alta especificidade (somente não permitem discernir os protozoários causadores das formas visceral e tegumentar de leishmaniose), mas cuja sensibilidade está diretamente relacionada com a carga parasitária do animal infectado e pode variar em função da amostra coletada, do tempo decorrido após a infecção e do momento da realização do exame. Tratam-se de técnicas indicadas para a detecção do parasito na sua forma amastigota (Figuras 2A e 2B), sendo que os métodos diretos são aqueles normalmente empregados na rotina clínica pela em geral fácil coleta (por decalque de lesão cutânea erodo-ulcerativa e/ou citologia aspirativa por agulha fina de lesões tegumentares pápulo-nódulo-tumorais e/ou de órgãos linfóides, particularmente a partir de linfonodos e/ou medula óssea) e execução do exame (corante hematológico de rotina – Panótico rápido, ou ainda, Giemsa, Leishman, Rosenfeld, dentre outros; leitura em microscopia óptica – aumento de 1000x, imersão).

Métodos sorológicos

Quanto aos exames sorológicos, em geral apresentam altas sensibilidade e especificidade, porém, não são indicados nos primeiros 3 a 5 meses pós infecção particularmente em animais assintomáticos (janela imunológica ou de soroconversão, que é o tempo decorrido entre a infecção e a formação de anticorpos anti-*Leishmania sp* passíveis de serem detectados por esses métodos). Existem, rotineiramente disponíveis no mercado nacional, tanto métodos sorológicos qualitativos quanto aqueles considerados quantitativos.

Em relação aos primeiros (testes rápidos comerciais – imunocromatográficos, ELISA), apresentam a vantagem de fornecerem resultados rápidos, porém, são indicados como métodos de triagem, sendo recomendado, nos casos positivos, que se proceda a confirmação do diagnóstico por outros métodos (sorológico quantitativo, parasitológico e/ou moleculares, dentre outros).

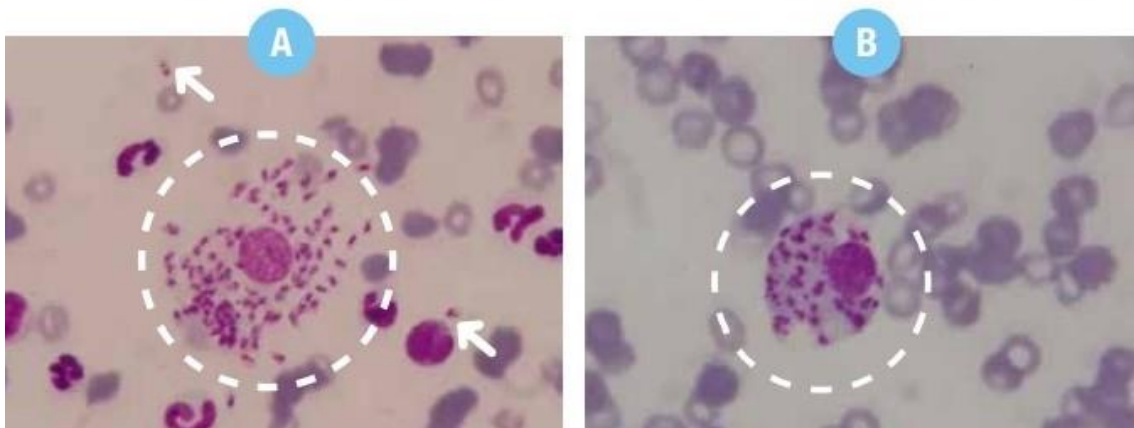


Figura 2 - Exame citológico de linfonodo de cão com leishmaniose visceral mostrando: A - Presença de formas amastigotas de *Leishmania sp* extracelulares (setas); A e B - Formas amastigotas de *Leishmania sp* localizadas no interior de macrófagos (circulados) (coloração panótico, microscopia óptica, aumento de 1000x - imersão). Fonte: Msc. Maurício Franco Zanette / Dr. Claudio Nazaretian Rossi.

Já quanto às técnicas sorológicas quantitativas, aquelas geralmente utilizadas na rotina clínica são o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), sendo possível, por ambas, se quantificar o nível de anticorpos circulantes contra o agente. Pelo método de ELISA, há que se ter conhecimento do ponto de corte da reação (cut-off, padronizado pelo laboratório que realiza o teste), e da densidade óptica do animal testado (DO). São considerados negativos por essa técnica animais com DO abaixo do ponto de corte da reação e aqueles com DO acima desse valor, são reputados como positivos para LVC. Ressalta-se que há consenso mundial de que se podem considerar positivos diretamente apenas por esse método, os casos nos quais o animal testado apresenta DO pelo menos 2 a 4 vezes acima do ponto de corte da reação. Quanto à RIFI, no Brasil, reputam-se como sendo positivos para a enfermidade os animais com títulos $\geq 1:40$, porém, consensual e internacionalmente, considera-se ser determinante o conhecimento do maior título apresentado pelo cão testado (denominada titulação plena ou total), uma

vez que se sugere que animais com títulos sorológicos até 1:80 sejam considerados como suspeitos para LVC, ou seja, apenas títulos $\geq 1:160$ seriam confirmatórios para o diagnóstico da doença diretamente por essa técnica. No Brasil, os testes sorológicos são aqueles indicados para o diagnóstico da enfermidade pelo Programa de Vigilância e Controle da LVC do Ministério Saúde, sendo o imunocromatográfico (DPP) recomendado como método de triagem dos animais e o ELISA como exame confirmatório nos casos positivos pelo primeiro.

Métodos moleculares

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) permite identificar e ampliar sequências de DNA do parasito a partir de material oriundo de diversos tecidos, particularmente de órgãos linfóides (linfonodos, medula óssea, baço, fígado) e de biópsias cutâneas (inclusive cortes histológicos de tecidos parafinados e congelados), dentre outros (swab de conjuntiva, sangue, líquido e vetor). É considerado o método diagnóstico mais sensível nas fases iniciais de infecção, particularmente se o material é oriundo de órgãos linfóides. Quanto à técnica de PCR empregada, aquelas em tempo real apresentam uma maior sensibilidade comparativamente às convencionais, uma vez que, nas primeiras, o risco de contaminação da amostra é menor tendo em vista se tratar de uma técnica fechada. Além disso, por meio dela pode-se quantificar a carga parasitária pela possibilidade de se determinar o número de cópias de DNA presentes na amostra biológica, o que se considera ser importante quando do monitoramento do paciente sob terapia ou pós tratamento de LVC.

Outros métodos

O diagnóstico também pode ser instituído pelo emprego de exame histopatológico, imunocito/histoquímica, intradermoreação (avaliação da resposta imune celular cutânea por meio de uma reação de hipersensibilidade tardia), citometria de fluxo (para detecção da proporção de linfócitos CD4+/CD8+), cultivo do parasito, inoculação experimental em animais de laboratório e xenodiagnóstico (detecção e isolamento do agente utilizando seu vetor natural).

Estadiamento clínico da doença canina

Os animais com LVC são divididos em estágios clínicos, existindo diferentes sistemas de classificação clínica no mundo. Dentre esses, segue distribuição por classes baseada no tipo e intensidade das alterações clínicas e laboratoriais, adaptada a partir da classificação proposta pelo grupo LeishVet:

- **Estágio I (doença branda):** sem manifestações clínicas detectáveis (exceto por possível linfadenopatia periférica ou dermatite papular), com diagnóstico sorológico negativo ou positivo (ELISA em baixos títulos, com densidade óptica menos que duas vezes acima do ponto de corte da reação; RIFI com resultado até 1:80; teste rápido qualitativo negativo ou positivo), mas sem anormalidades laboratoriais e sem confirmação por outros métodos diagnósticos (parasitológico / molecular), o que é considerado como animal suspeito para LVC por alguns autores;
- **Estágio II (doença moderada):** manifestações do estágio I além de outras lesões cutâneas (disqueratinização, onicogribose, ulcerações) e/ou sistêmicas associadas (anorexia, perda de peso, febre, epistaxe), com alterações laboratoriais (anemia arregenerativa branda, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia), diagnóstico sorológico (ELISA e/ou RIFI com títulos baixos ou elevados; teste rápido qualitativo positivo), parasitológico e/ou molecular positivo. Cães nesse estágio podem, ainda, ser classificados em dois subestágios: a) ausência de anormalidades no perfil bioquímico renal e ausência de proteinúria; b) creatinina sérica inferior a 1,4mg/dL e RPC entre 0,5 e 1;
- **Estágio III (doença grave):** manifestações clínicas dos estágios I e II associadas a alterações imunomediadas (vasculite, artrite, glomerulonefrite, uveíte) e laboratoriais (anemia arregenerativa, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, creatinina sérica inferior a 1,4mg/dL e RPC superior a 1 ou creatinina sérica entre 1,4 e 2mg/dL), além de diagnóstico sorológico (ELISA e/ou RIFI com títulos elevados; teste rápido qualitativo positivo), parasitológico e/ou molecular positivos;
- **Estágio IV (doença muito grave):** evidências clínicas dos estágios I a III associado a tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótico ou insuficiência renal terminal, além de alterações laboratoriais (anemia

arregenerativa, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, creatinina sérica superior a 2mg/dL, elevada proteinúria e RPC superior a 5), diagnóstico sorológico (ELISA e/ou RIFI com títulos médios a elevados; teste rápido qualitativo positivo), parasitológico e/ou molecular positivos.

Tratamento e prognóstico

Como colocado anteriormente, os animais com LVC são divididos em estágios clínicos de acordo com as manifestações clínico-laboratoriais e método(s) diagnóstico(s) empregado(s) para o diagnóstico da enfermidade. O tratamento é indicado na sua forma multimodal, ou seja, associando-se um fármaco leishmanicida (age eliminando parasitos) associado a leishmanostático (visa impedir a replicação do protozoário), imunestimulante (melhora a resposta imune contra o parasito), e/ou imunomodulador, (auxiliar na melhora clínica, diminuindo a resposta inflamatória e formação de imunocomplexos). Além disso, é imprescindível que o animal sob terapia receba tratamento suporte, de acordo com a necessidade, tendo em vista sua situação clínica, bem como seja vermifugado, utilize ectoparasiticida continuamente, imunizado contra outras doenças infecciosas, e acompanhado clínico-laboratorialmente de forma frequente durante toda a vida. O prognóstico é variável de acordo com o estágio que o animal se encontra, indo de bom, bom a reservado, reservado a mau, e mau, respectivamente, nos estágios I, II, III e IV conforme previamente descritos.

Controle e prevenção

Em virtude das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente quanto aos vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da LVC, as estratégias de controle indicadas pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) estão voltadas para a eliminação do reservatório (cão sororreagente); combate ao vetor por meio da borrifação de repelentes/inseticidas (piretróides, organoclorados, organofosforados), do manejo ambiental para a redução da proliferação de flebotômíneos (evitar o acúmulo de matéria orgânica), atividades de educação em saúde; e tratamento e redução do risco de infecção em humanos. Nesse contexto, quando se atua na prevenção da LVC, o ideal é que se trabalhe com o conceito de Double Defense (Dupla Defesa), abordagem multimodal baseada no conceito de proteger o animal topicamente por meio de princípios com ação repelente/inseticida (pipetas e/ou coleiras), controlando os flebotômíneos, vetores naturais da enfermidade; e sistemicamente, pelo uso de produtos que tenham ação contra o protozoário, quer seja coibindo o seu desenvolvimento ou eliminando-o pela ação direta do próprio fármaco, ou por meio do estímulo da resposta imune do animal infectado para atuar contra o parasito pela utilização de imunógeno (vacina recombinante Leish-Tec®). Ou seja, o protocolo de Double Defense para a LVC consiste em utilizar duas ferramentas para proteção do animal: a proteção externa, contra o vetor, com produto tópico repelente e inseticida (como o Vectra 3D®), e a proteção interna, com a utilização de vacina que estimula a imunidade celular do cão infectado contra o parasito (Leish-Tec®, a única vacina aprovada no Brasil para esse fim).

Referências

- MARCONDES, M. Leishmaniose. In: LARSSON, C.E.; LUCAS, R. Tratado de Medicina Externa: Dermatologia Veterinária. 1. ed., pp. 313-344, 2016.
- MELÉNDEZ-LAZO, A.; ORDEIX, L.; PLANELLAS, M.; PASTOR, J.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Research in Veterinary Science*, v. 117, p. 18-27, 2018.
- PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 236, p. 1184-1191, 2010.
- PALTRINIERI, S.; GRADONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Laboratory tests for diagnosis and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 4, p. 552–578, 2016.
- SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 165, p. 1-18, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011.