

## IMUNO-HISTOQUÍMICA EM AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO PROCESSADAS POR CELL BLOCK COMPARADA A SOROLOGIA DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Leonardo Loures Garcia Bruno<sup>1\*</sup>, Barbara Cristina Liodoro de Souza<sup>2</sup>, Gabriela da Silva Prates<sup>3</sup>, Livia Paula Lopes Pires<sup>4</sup>,  
Mariah Gois Ceregatti<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Pós graduando no Curso de Medicina Veterinária – Universidade de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

<sup>2</sup>Médica Veterinária – Centro Universitário de Belo Horizonte – UniBH – Belo Horizonte/MG – Brasil

<sup>3</sup>Médica Veterinária – Centro Universitário de Belo Horizonte – UniBH – Belo Horizonte/MG – Brasil

<sup>4</sup>Estudante de Graduação do Curso de Medicina Veterinária – Universidade de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

<sup>5</sup>Pós graduanda no Curso de Medicina Veterinária – Universidade de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

### INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que pode afetar animais domésticos, silvestres e o ser humano<sup>1,2</sup>. A transmissão dessa doença ocorre através dos vetores flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia sp.*, que infectam o organismo através do repasto sanguíneo<sup>1</sup>. Vários métodos diagnósticos podem ser usados para a Leishmaniose Visceral Canina (LVC), relevando-se os métodos diretos, como citologia e histopatologia de tecidos de linfonodo e medula óssea, ou os métodos indiretos, através de ELISA e RIFI, que possuem alta especificidade e sensibilidade<sup>3</sup>. O exame da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é o mais indicado devido a sua maior sensibilidade e especificidade, porém apresenta um custo maior quando comparado com os outros métodos de diagnóstico, enquanto o teste imunocromatográfico apresenta uma maior sensibilidade é utilizado apenas como um teste de triagem necessitando a confirmação pelo PCR.<sup>3,4</sup> Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a Imuno-Histoquímica (IHQ) em amostras de *cell tube block* de sangue periférico total para o diagnóstico de cães com Leishmaniose, visando à descoberta de um teste diagnóstico rápido, mais fidedigno e com um menor custo para o tutor.

### METODOLOGIA

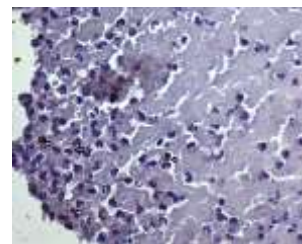
Foram utilizadas amostras de nove animais com diagnóstico confirmado e oito negativos para a doença. Através da técnica do *cell tube block*, foram feitos capilares da amostra, com maior interesse na capa leucocitária. Assim, as amostras de *cell tube block* emblocadas em parafina foram submetidas à microtomia para posterior produção de lâminas geletinizadas e colorações imuno-histoquímicas.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para validação da técnica, foi utilizada uma amostra positiva em exame parasitológico de *Leishmania sp.* e para controle negativo foi utilizada uma amostra de um animal negativo para *Leishmania sp.* pela PCR. Após o processamento das *cell tube block*, essas amostras foram encaminhadas para um laboratório externo, para a realização do IHQ no Laboratório de Leishmaniose do ICB da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Após dois dias foram obtidos os resultados, no qual em quatro animais dos nove positivos (44%) foi observada a presença de amastigotas no interior dos leucócitos.

É necessária cautela para coleta da capa leucocitária. Além disso, o tamanho do capilar pode interferir na qualidade de fixação, que deve ficar embebido em formalina. Assim, a técnica é considerada pouco complexa, mas exige habilidade. A confecção de vários capilares do mesmo animal ajuda a evitar a perda de amostra, caso o capilar seja quebrado fora da capa leucocitária. Por ser uma técnica que usa apenas materiais de rotina laboratorial, quase nenhum gasto adicional foi necessário para as etapas de centrifugação e fixação. O método direto para *Leishmania sp.*, a partir do esfregaço sanguíneo, apresenta 100% de especificidade, porém baixa sensibilidade, pois o sangue periférico pode não apresentar formas amastigotas. Os testes sorológicos ELISA e RIFI apresentam boa especificidade e sensibilidade, mas podem apresentar resultados falsos positivos, além do alto custo e demora operacional assim como a PCR. A acurácia diagnóstica pelo *cell tube block* se eleva pela facilidade de identificação do parasito. Os animais positivos na sorologia e negativos ao *cell tube block* podem não ter apresentado positividade pela IHQ da técnica por não apresentarem formas amastigotas no sangue periférico, o que não exclui a presença do parasito no organismo.

Na técnica do *cell tube block*, o uso da capa leucocitária e coloração por Imuno-Histoquímica ajudam na identificação de amastigotas fagocitadas e coradas com distinção das células sanguíneas. (Fig. 1).



**Figura 1:** Presença de estruturas compatíveis com *Leishmania sp.* no interior dos leucócitos (setas), em amostras de *Cell tube block* de animais positivos em lâminas submetidas a histoquímica e contracoradas em Hematoxilina, aumento de 40x. (Fonte Autoral).

**Tabela 1:** Resultados comparativos entre sorologia e Imuno-histoquímica de sangue total periférico processada com amostras obtidas pela técnica de *cell tube block* de animais sorologicamente positivos para Leishmaniose e animais negativos pela PCR. (Fonte Autoral).

Animal	Sorologia	IHQ <i>cell tube block</i>	Animal	PCR	IHQ <i>cell tube block</i>
1	Positivo	Negativo	10	Negativo	Negativo
2	Positivo	Negativo	11	Negativo	Negativo
3	Positivo	Positivo	12	Negativo	Negativo
4	Positivo	Positivo	13	negativo	Negativo
5	Positivo	Positivo	14	Negativo	Negativo
6	Positivo	Negativo	15	Negativo	Negativo
7	Positivo	Positivo	16	Negativo	Negativo
8	Positivo	Negativo	17	Negativo	Negativo
9	Positivo	Negativo			

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme sua demanda, a rotina de um laboratório precisa adotar processos para um diagnóstico mais rápido ao paciente e com um baixo custo. A partir dos resultados analisados foram observados que, entre os positivos, quatro havia presença de amastigota no sangue periférico, sendo assim, visualizado na IHQ. *Leishmania* possui tropismo por órgãos como medula óssea, baço e linfonodos, sendo indicados estudos prospectivos utilizando a técnica de *cell block* em punções ou aspirados desses órgãos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. B. F.; SOUSA, V. R.; BOA SORTE, E. C. et al. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* v. 11, n.12, p.1555-1560, 2011.
- AYELE A.; SEYOUM Z. Review on canine leishmaniasis, etiology, clinical sign, pathogenesis, treatment and control methods. *Global Veterinaria*, v. 7, n.4, p.343-352, 2016.
- COSTA, G. P.; SILVA, D. P. C.; ROCHA, D. O. A. C.; TEIXEIRA, P. H. G.. Métodos de diagnóstico da leishmaniose canina: uma revisão de literatura. *Saber científico*, v. 9, p. 95-104, 2020.
- CRAPANZANO, J. P.; HEYMANN, J. J.; MONACO, S. et al. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *Cytojournal*. v. 11, n. 1, p. 7, 2014.



## XII Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente

APOIO:

