

Detecção de *Leishmania infantum* em esfregaço de sangue periférico e linfonodo de um felino doméstico

Detection of *Leishmania infantum* in Peripheral Blood Smear and Lymph Node of a Domestic Feline

Tamires Ramborger Antunes¹, Renata Amarilha Valençola Peixoto², Bruna Brito Oliveira³, Simone Sorgatto³, Carlos Alberto do Nascimento Ramos⁴ & Alda Izabel de Souza⁴

ABSTRACT

Background: Cats can become infected and develop feline visceral leishmaniasis (LVF) and manifest variable clinical signs. The diagnosis of the disease in this species has been made more frequently by means of serological and molecular techniques. Different from what happens with dogs, the use of parasitological analysis of lymph node, in clinical practice, for agent detection in felines are infrequent. Therefore, the aim of this study was to disclose the diagnosis of visceral leishmaniasis in a domestic cat from the blood smear analysis and aspiration cytology of lymph node.

Case: An adult mixed breed queen, from the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul state, Brazil was referred for clinical care due to the presence of a nodule, with approximately 4 cm, near the inguinal breast. Other parameters, on physical examination, are within the normal range for the specie. For the investigation, additional tests were requested. Eosinophilia was found in a complete blood count (CBC). The association between macroscopic characteristics and cytological findings allowed the diagnosis of inguinal lymph node hyperplastic. Furthermore, amastigotes of *Leishmania* sp. were visualized both in the peripheral blood sample and in the analyzed material mass. The diagnosis of visceral leishmaniasis and identification of specie of *Leishmania* was performed by PCR technique (Polymerase Chain Reaction), from the detection of genetic material from *Leishmania infantum*. After diagnosis of the disease, the owner opted for the conduct of animal euthanasia in the Zoonosis Control Center (CCZ), making impossible the realization of *post-mortem* examination.

Discussion: Hematologic changes described for cats with feline visceral leishmaniasis may be absent or multiple and variable, such as for example, anemia, agglutination of erythrocytes, leukocytosis, leukopenia and thrombocytopenia, however, isolated eosinophilia, identified in this report, has not been observed by other authors. The viewing of the amastigote forms in blood smears is considered unusual. A study in which there were examined 1438 samples of dogs, the agent detection did not exceed 0.28%. In cats, there is only one report, of a pancytopenic feline, describing this finding and corroborates for the rarity of the observation of amastigote forms in peripheral blood feline of this report. The use of serologic and molecular methods for the diagnosis of disease in felids has been most frequently used, however, high titers of anti-*Leishmania* antibodies associated with protective humoral immune response and degenerated genetic material of the amastigotes can be detected by PCR techniques, not identifying active infection. The parasitological diagnosis by means of cytological evaluation of lymph nodes is fast, low cost, presents high specificity and is frequently used in research of canine visceral leishmaniasis, however, the use of this technique for the diagnosis of the disease in cats is still restricted to academic environment. The identification of amastigotes in peripheral blood and lymph nodes, detected in this study, indicates the possibility of using the blood test and, especially, the cytological examination of lymph node for parasitological research of feline visceral leishmaniasis and highlights the need of studies to determine the sensitivity of these tests in this species.

Keywords: cat, diagnosis, leishmaniasis, complete blood count, cytology.

Descritores: gato, diagnóstico, leishmaniose, hemograma, citologia.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma zoonose infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* sp. que acomete diversas espécies de mamíferos [26]. O parasito é transmitido vetorialmente por meio do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos, destacando-se, no Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* [22]. Os felídeos podem se infectar, desenvolver a leishmaniose visceral felina (LVF) [28] e manifestar sinais clínicos variáveis [3,17,20], porém, sua participação na epidemiologia das leishmanioses ainda não está definida [12,16,19].

A detecção da infecção tem se baseado principalmente em testes sorológicos e/ou moleculares [19,24] sendo rara a descrição da visualização de formas amastigotas de *Leishmania infantum* em esfregaço de sangue periférico [13] e poucos autores relataram a identificação do agente em linfonodo de gatos provenientes de atendimento clínico [9,18,20,28]. Portanto, objetivou-se com este trabalho divulgar o diagnóstico de leishmaniose visceral em um gato doméstico a partir da análise de esfregaço sanguíneo e citologia aspirativa de linfonodo.

CASO

Uma gata adulta não castrada e sem raça definida, de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, foi encaminhada para atendimento devido a presença de um nódulo, com aproximadamente 4 cm, próximo a mama inguinal. Durante o exame físico, os demais parâmetros avaliados apresentaram-se dentro da normalidade para a espécie. Exame hematológico e análise

citológica da massa foram solicitados para investigação clínico-laboratorial.

No hemograma observou-se eosinofilia e a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no citoplasma de neutrófilos (Figura 1A). Na avaliação citopatológica do nódulo verificou-se marcada celularidade heterogênea, com predomínio de linfócitos maduros e, em menor concentração, linfócitos jovens, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos, associados à corpúsculos linfoglandulares, dispostos ao fundo da lâmina, confirmando a presença de tecido linfoide. A associação entre localização, aspecto macroscópico e características microscópicas do nódulo permitiu confirmar hiperplasia do linfonodo inguinal. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. livres (Figura 1B) e intracitoplasmáticas também foram observadas.

Para identificação da espécie de *Leishmania*, amostra de material aspirado do linfonodo foi encaminhada para análise molecular. Por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se os primers e reações descritas por Cortes *et al.* [5], confirmou-se a presença de *Leishmania infantum* no material analisado (Figura 2).

Após o diagnóstico da doença, o proprietário optou pela eutanásia do animal no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), impossibilitando a realização de exame *post-mortem*.

DISCUSSÃO

Alterações hematológicas em gatos com LVF podem ser inexistentes [15] ou múltiplas e variáveis. Anemia normocítica normocrômica [7] e arregenerati-

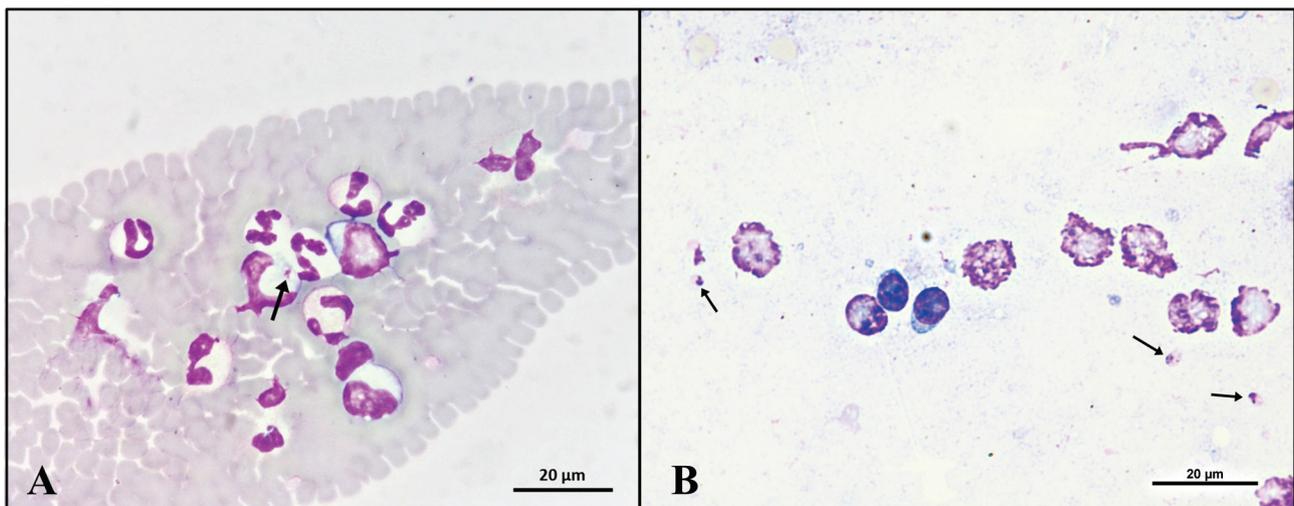


Figura 1. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. (setas) em esfregaço de sangue periférico (A) e linfonodo (B) [Panótico rápido, objetiva de 100x].

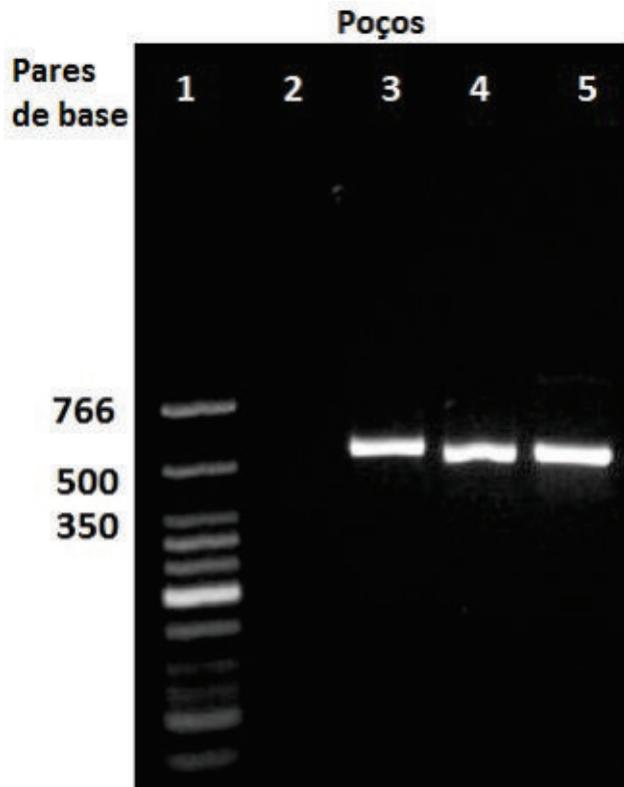


Figura 2. Resultado da amplificação por PCR convencional de amostra de aspirado de linfonodo de um gato doméstico demonstrando reação positiva para *Leishmania infantum*. Poço 1 - Marcador de pares de base “Low Molecular Weight DNA Ladder” (New England Biolabs); Poço 2 - Controle negativo; Poço 3 - Controle positivo (DNA de *Leishmania infantum*); Poço 4 - Amostra de DNA extraída de aspirado de linfonodo de cão positivo para *Leishmania* sp. no exame parasitológico. Poço 5 - Amostra de DNA obtida após aspiração de linfonodo do felino.

va [13,18], aglutinação de eritrócitos [13], leucocitose [16,17,20] associada ou não à neutrofilia [11,20], monocitose [11] ou eosinofilia [17], leucopenia [7,16,18] por neutropenia [13] ou linfopenia [7] e trombocitopenia [13,18] já foram descritos. Contudo, eosinofilia isolada, identificada neste relato, não foi constatada por outros autores e pode estar associada a reação do sistema imunológico ao parasita presente nos tecidos, induzido pelo fator estimulador de colônia - granulocítico macrófago (GM-CSF) liberado por macrófagos [27].

A visualização de formas amastigotas em extensões sanguíneas é considerada incomum [1] e não excedeu 0,28% (4/1438) em amostras de cães analisadas por Giudice & Passantino [8], independente da fase da doença. Em gatos com LVF, dentre os trabalhos que utilizaram o hemograma como exame complementar, apenas Marcos *et al.* [13] detectaram o agente em um animal pancitopênico e corrobora a raridade da observação de formas amastigotas no sangue periférico do felino do presente relato.

A utilização dos métodos sorológicos ou de biologia molecular tem sido mais frequentemente aplicados para detecção da infecção em felinos [19,24], entretanto, a presença de elevados títulos de anticorpos anti-*Leishmania* sp. ou a detecção de material genético do agente, em diferentes tipos de amostra, não necessariamente indicam a existência de infecção ativa, uma vez que altos níveis de anticorpos em gatos podem estar associados à resposta imune humoral protetora [14] e amastigotas inviáveis (degeneradas) podem ser detectadas pelas análises de PCR [21].

Já o diagnóstico parasitológico da leishmaniose visceral, por meio de avaliação citológica de linfonodos, é considerado rápido, de baixo custo [10] e apresenta especificidade de 100% [23]. Embora muito frequente na investigação da leishmaniose visceral canina, o uso desta técnica para o diagnóstico da LVF, na rotina clínica, é pouco utilizada [9,19,21,30] e ainda se restringe ao meio acadêmico [2-4,6,25].

No presente trabalho, a identificação de formas amastigotas em sangue periférico e linfonodo, confirmada posteriormente por PCR como *Leishmania infantum*, indica a possibilidade de confirmação de LVF por meio destas técnicas, mesmo sem manifestações clínicas evidentes da doença, e ressalta a necessidade de estudos que determinem a sensibilidade desse método de investigação nesta espécie.

Declaration of interest. The authors are responsible for the content of this article and declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Bonates A. 2003. Leishmaniose visceral (calazar). *Veterinary News*. 61(10): 4-5.
- 2 Bresciani K.D.S., Serrano A.C.M., Matos L.V.S., Savani E.S.M.M., D’Auria S.R.N., Perri S.H.V., Bonello F.L., Coelho W.M.D., Aoki A.G. & Costa A.J. 2010. Ocorrência de *Leishmania* spp. em felinos do município de Araçatuba, SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 19(2):127-129.
- 3 Chatzis M.K., Andreadou M., Leontides L., Kasabalas D., Mylonakis M., Koutinas A.F., Rallis T., Ikononopoulos J. & Saridomichelakis M.N. 2014. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of

- clinically normal and sick cats. *Veterinary Parasitology*. 202(3-4): 217-225.
- 4 Coelho W.M.D., de Lima V.M.F., do Amarante A.F.T., Langoni H., Pereira V.B.R., Abdelnour A. & Bresciani K.D.S. 2010.** Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 19(4): 256-258.
- 5 Cortes S., Rolão N., Ramada J. & Campino R. 2004.** PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 98(1): 12-17.
- 6 Costa T.A.C., Rossi C.N., Laurenti M.D., Gomes A.A.D., Vides J.P., Vicente Sobrinho L.S. & Marcondes M. 2010.** Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 47(3): 213-217.
- 7 Ennas F., Calderone S., Capri A. & Pennisi M.A. 2012.** Un caso di Leishmaniosi felina in Sardegna. *Veterinaria*. 26(2): 55-59.
- 8 Giudice E. & Passantino A. 2011.** Detection of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood from four dogs – short communication. *Acta Veterinaria Hungarica*. 59(2): 205-213.
- 9 Hervás J., de Lara F.C.-M., Sánchez-Isarria M.A., Pellicer S., Carrasco L., Castilho J.A. & Gómez-Villamandos J.C. 1999.** Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 1(2): 101-105.
- 10 Laurenti M.D. 2009.** Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. *Boletim Epidemiológico Paulista*. 6(67): 13-23.
- 11 Leiva M., Lloret A., Peña T. & Roura X. 2005.** Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Veterinary Ophthalmology*. 8(1): 71-75
- 12 Maia C. & Campino L. 2011.** Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*. 27(8): 341-344.
- 13 Marcos R., Santos M., Malhão F., Pereira R., Fernandes A.C., Montenegro L. & Roccabianca P. 2009.** Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*. 38(2): 201-205.
- 14 Martín-Sánchez J., Acedo C., Muñoz-Perez M., Pesson B., Marchal O. & Morillas-Márquez F. 2007.** Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*. 145(3-4): 267-273.
- 15 Migliazzo A., Vitale F., Calderono S., Puleio R., Binanti D. & Abramo F. 2014.** Feline leishmaniosis: a case with a high parasitic burden. *Veterinary Dermatology*. 26(1): 68-70.
- 16 Noé P., Domingos S.L., Oshiro E.T., Lima R.B., Pirmez C., Pedroso T.C. & Babo-Terra V.J. 2015.** Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. *Ciência Animal*. 25(4): 3-14
- 17 Ozon C., Marty P., Pratlong F., Breton C., Blein M., Lelièvre A. & Haas P. 1998.** Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in southern France. *Veterinary Parasitology*. 75(2-3): 273-277.
- 18 Pennisi M.G., Venza M., Reale S., Vitale F. & Giudice S.L. 2004.** Case report of leishmaniasis in four cats. *Veterinary Research Communications*. 28(1): 363-366.
- 19 Pennisi M.G., Cardoso S., Baneth G., Bourdeau P., Koutinas A., Miró G., Oliva G. & Solano-Gallego L. 2015.** LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 8: 302-320.
- 20 Poli A., Abramo F., Barsotti P., Leva S., Gramiccia M., Ludovisi, A. & Mancianti F. 2002.** Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*. 106(3): 181-191.
- 21 Prina E., Roux E., Mattei D. & Mion G. 2007.** *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes and Infection*. 9(11): 1307-1315.
- 22 Rangel E.F. & Vilela M.L. 2008.** *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Caderno de Saúde Pública*. 24(12): 2948-2952.
- 23 Saridomichelakis M.N., Mylonakis M.E., Leontides L.S., Koutinas A.F., Billinis C. & Kontos V.I. 2005.** Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 73(1): 82-86.
- 24 Soares C.S.A., Duarte S.C. & Sousa S.R. 2016.** What do we know about feline leishmaniosis? *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 18: 1-9.
- 25 Sobrinho L.S.V., Rossi C.N., Vides J.P., Braga E.T., Gomes A.A.D., Lima V.M.F., Perri S.H.V., Generoso D., Langoni H., Leutenegger C., Biondo A.W., Laurenti M.D. & Marcondes M. 2012.** Coinfection of *Leishmania chagasi* with

Toxoplasma gondii, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 187(1-2): 302-306.

26 Solano-Gallego L., Miró G., Koutinas A., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer Luis, Bourdeau P., Oliva G. & Baneth G. 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 4: 01-16.

27 Stockham, S.L. & Scott M.A. 2011. Leucócitos. In: *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.45-89.

28 Vides J.P., Schwardt T.F., Sobrinho L.S.V., Marinho M., Laurenti M.D., Biondo A.W., Leutenegger C. & Marccondes M. 2011. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 178(1-2): 22-28.