



Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos

Evaluation of immunohistochemical technique for the diagnosis of *Leishmania* spp. in canine tissues samples

RIALA6/1686

Juliana Mariotti GUERRA^{1*}, Natália Coelho Couto de Azevedo FERNANDES¹, Lidia Midori KIMURA¹, Neuza Kasumi SHIRATA¹, Jéssica Abatzoglou MAGNO¹, Marília Ferreira ABRANTES¹, Karolina Rosa FERNANDES¹, Maiara Maria Romaneli SILVA¹, José Eduardo de Raeffray BARBOSA², Helena Hilomi TANIGUCHI³, Roberto Mitsuyoshi HIRAMOTO³, Suely NONOGAKI¹, José Eduardo TOLEZANO³

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2874. E-mail: julianamariotti@ial.sp.gov.br, jumariotti.vet@gmail.com

²Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

³Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 17.09.2015 - Aceito para publicação: 23.02.2016

RESUMO

No Brasil, as leishmanioses representam um importante problema de saúde pública pela sua elevada incidência, ampla distribuição geográfica e marcante aumento na transmissão associados à urbanização da doença. Cães são considerados os principais reservatórios da leishmaniose visceral (LV) no ambiente urbano, tornando-se fundamental o aprimoramento do diagnóstico da doença nessa espécie. Este estudo objetivou a avaliação da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de diferentes tecidos de cães recebidas no Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz (NPQ-IAL). Amostras de tecidos coletadas de 134 cães, provenientes de municípios do Estado de São Paulo, positivos para LV por teste rápido (TR DPP[®]-Bio-Manguinhos), ensaio imunoenzimático-EIE/Elisa (Bio-Manguinhos) e pela reação em cadeia de polimerase, foram submetidas a uma marcação IHQ específica, em duplicata. A reação de IHQ apresentou sensibilidade de 98,51 %, especificidade de 100,00 % e acurácia de 98,61 %. A maior positividade foi detectada nas amostras de baço. O índice *Kappa* foi de 0,84 entre os resultados da análise dos tecidos em duplicata. A técnica de IHQ pode ser utilizada como uma técnica rotineira para o diagnóstico das leishmanioses caninas, sendo padronizada e implantada no NPQ-IAL.

Palavras-chave. leishmaniose visceral, cães, imuno-histoquímica, patologia.

ABSTRACT

In Brazil, leishmaniasis represents a major public health problem due to its high incidence, wide distribution and remarkable increase in transmission associated with the disease urbanization. Dogs are considered as the main reservoirs of visceral leishmaniasis (VL) in the urban environment and diagnosis improvement was fundamental in this species. This study aimed at evaluating the immunohistochemical technique (IHC) for diagnosing *Leishmania* spp. in different tissues samples collected from dogs. This investigation was performed at the Quantitative Pathology Center of the Institute Adolfo Lutz (NPQ-IAL). Tissue samples collected from 134 dogs, derived from municipalities of São Paulo State, positive for VL by rapid testing (TR DPP[®] - Bio-Manguinhos), enzyme-linked immunosorbent assay (EIA/ELISA - Bio-Manguinhos), and polymerase chain reaction, were analyzed by specific IHC in duplicate. These dogs were previously diagnosed as VL. IHC showed sensitivity of 98.51 %, specificity of 100.00 %, positive predictive value of 100.00 %, negative predictive value of 83.33 % and accuracy of 98.61 %. The major positivity was detected in spleen samples. Kappa index between the tissues duplicate results was of 0.84. IHC technique, standardized and implemented at NPQ-IAL, showed to be suitable to be used as routine test for diagnosing canine leishmaniasis effectively.

Keywords. visceral leishmaniasis, dogs, immunohistochemistry, pathology.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença de curso crônico, de caráter antroponótico e de envolvimento sistêmico, que quando não tratada resulta em morte em 90,00 % dos pacientes. Na América, o agente etiológico da doença é a *Leishmania infantum chagasi*¹. A leishmaniose visceral americana é transmitida por um vetor pertencente à família *Psychodidae* e gênero *Lutzomyia*, e no Brasil o principal vetor é *Lu longipalpis*^{1,2}. Atualmente, essa doença atinge vários estados brasileiros, com média anual de 3.553 casos no período de 2004 a 2013 e incidência de 1,90 casos por 100.000 habitantes³.

Do ponto de vista epidemiológico, o cão é considerado o mais importante entre os animais identificados como reservatórios do parasita, até o presente momento^{4,5}. Este destaque baseia-se nos seguintes fatos: a leishmaniose é mais prevalente na população canina do que na humana, e a doença humana é normalmente precedida pela infecção canina. Além disso, a infecção dos vetores é favorecida pela maior quantidade de parasitas que os cães apresentam na pele, comparativamente aos humanos⁶⁻⁹. A prevalência da leishmaniose visceral em cães de áreas endêmicas pode atingir 20,00 a 40,00 % da população^{4,7}. Acredita-se que em áreas com alta infecção na espécie canina, a incidência na população humana varie de 1,00 a 2,00 %^{7,10}.

O primeiro caso de leishmaniose visceral canina (LVC) no Estado de São Paulo foi diagnosticado em 1998 no município de Araçatuba, região noroeste do estado. A partir de então, o número de casos na região tem aumentado consideravelmente. De acordo com os dados da Direção Regional de Saúde, 41 municípios já apresentaram casos confirmados da doença, que está se disseminando para outras regiões do Estado com casos autóctones identificados na região metropolitana da cidade de São Paulo a partir do ano de 2005^{11,12}.

Em virtude da variedade de sintomas da doença, o diagnóstico clínico da LVC é difícil, pois os achados clínicos são inespecíficos e sugestivos de outras enfermidades. Dessa forma, torna-se necessária a utilização de exames

laboratoriais para seu diagnóstico^{13,14}.

A histopatologia pode ser utilizada para o diagnóstico da leishmaniose visceral através da detecção microscópica do parasita e caracterização de lesões teciduais decorrentes da presença do patógeno. No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações, como a demora operacional e dificuldade de reconhecimento do parasita¹⁵. A técnica de imunohistoquímica (IHQ) baseia-se na detecção de antígenos in situ por meio da utilização de um anticorpo (policlonal ou monoclonal) primário, relativamente específico, e de um sistema de enzima e substrato cromógeno que se deposita no local da reação antígeno-anticorpo. O diagnóstico das leishmanioses depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e de tamanho compatíveis com amastigotas¹⁶⁻²⁰. Esta metodologia aumenta a possibilidade de detecção do parasita nos tecidos, principalmente quando a carga parasitária é baixa, e é plausível de ser implantada na rotina de diagnóstico laboratorial¹⁸⁻²⁰.

O material para análise pode ser obtido por meio de excisão do fragmento tecidual por biópsia incisiva ou excisional ou, ainda, durante a necropsia do animal. Os tecidos mais comumente utilizados para realizar o diagnóstico de LVC em cães por meio de técnica de IHQ são o linfonodo poplíteo e a pele pela facilidade de efetuar a coleta de amostra in vivo. A pesquisa dos demais órgãos é importante, porém tratando-se de diagnóstico na rotina veterinária a biópsia representa uma técnica invasiva para órgãos internos como baço e fígado²¹.

Contudo, esta técnica apresenta vantagens como a possibilidade de realizar estudos retrospectivos com a amostra incluída em blocos de parafina, e a facilidade de manipulação do material a ser submetido ao exame, visto que este ao ser colocado em fixador adequado, pode-se dispensar os cuidados especiais como refrigeração (que é necessária para efetuar o isolamento em cultura). A aplicação dessa técnica facilita a busca ativa de cães, mesmo em áreas remotas, em que as amostras podem demorar a chegar ao laboratório. No entanto, o resultado do exame IHQ também é influenciado por diversos fatores pré- e pós-analíticos, como

na etapa inicial pela qualidade de fixação do espécime, na fase intermediária pela escolha dos anticorpos e pelas reações propriamente ditas, e na etapa final na interpretação de leitura das lâminas²²⁻²⁷. A produção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. é uma etapa fundamental para realizar sua aplicação em técnicas imunológicas de diagnóstico. Outros autores já utilizaram soro hiperimune de coelho e de cão como anticorpo primário anti-*Leishmania* spp.¹⁴ que pode influenciar nos parâmetros de sensibilidade e especificidade do teste. A IHQ é considerada complementar à histopatologia, pois apresenta boa especificidade e sensibilidade, de cerca de 60 a 70 %^{14,21}.

Atualmente, o Ministério da Saúde inclui a IHQ como exame de referência para o diagnóstico de casos autóctones de LVC, sendo esta técnica parte do fluxograma de ações de controle e vigilância da enfermidade²⁸. Desta maneira, é fundamental que os profissionais veterinários estejam atentos para casos suspeitos, e os laboratórios tenham seus protocolos padronizados e controlados em todas as etapas a fim de minimizar erros de interpretação¹⁶.

Este estudo tem como objetivo avaliar os resultados obtidos pela reação de IHQ para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras coletadas de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados 134 cães oriundos dos municípios de Votuporanga, Fernandópolis, Santa Fé do Sul, Valentim Gentil, Araçatuba, Bauru, Marília e Espírito Santo do Pinhal, em diferentes regiões do Estado de São Paulo, Brasil. Todos os animais foram sorologicamente positivos para leishmaniose visceral canina (LVC) pelo teste rápido TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina e Ensaio Imunoenzimático (EIE/Elisa) (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), confirmados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e cultura para o diagnóstico de leishmaniose visceral conforme os protocolos padronizadas no Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz²⁹. Todos os animais foram classificados como sintomáticos

para LVC segundo os critérios estabelecidos por Mancianti et al, 1988³⁰.

Os cães foram eutanasiados conforme as recomendações do Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (CFMV, 2012), utilizando-se anestésico barbitúrico e, posteriormente, cloreto de potássio, ambos intravenosos em animais previamente sedados.

Os animais foram submetidos ao exame necroscópico no período de 2012 a 2015; e foram colhidos fragmentos de no máximo quatro cm³ (2 cm x 2 cm x 1 cm) representativos dos seguintes órgãos: linfonodo, pulmão, coração, fígado, baço, rim, estômago, intestino, pâncreas, adrenal e pele com e sem lesão e bexiga urinária, no total de 1.164 amostras.

Os fragmentos teciduais foram imediatamente fixados em formalina a 10,00 % em solução tamponada de fosfato e, então, submetidos ao processamento histológico, inclusão em parafina e microtomia, para obtenção de três seções histológicas com espessura de 3 µm. Um corte de cada tecido foi corado com hematoxilina e eosina (HE). Outros dois cortes por lâmina foram submetidos à reação de IHQ, sendo um para efetuar a imunomarcagem e outro para controle negativo, seguindo-se o protocolo do Núcleo de Patologia Quantitativa do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. Destas amostras, 351 foram também processadas e analisadas em duplicadas com dois blocos distintos por órgão; e além das amostras citadas anteriormente foram incluídos ovário, testículo, útero, medula óssea e pele de dobra ungueal, a fim de avaliar a concordância e a representatividade necessária de fragmentos para obtenção dos resultados.

Para executar a reação de IHQ, os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados e submetidos à recuperação antigênica por meio de calor úmido sob pressão em tampão citrato 10 mM, pH 6,0 por três minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 6,00 %. As lâminas foram incubadas, *overnight* a 4 °C, com anticorpo policlonal anti-*Leishmania* produzido em camundongo no Laboratório de Investigações Médicas (LIM-50/Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo), e então lavadas com tampão PBS pH 7,4. Para estabelecer o título adequado do anticorpo primário a ser empregado no teste, foi realizada a titulação deste reagente. As diluições 1:2000, 1:3000 e 1:4000 do anticorpo primário foram testadas utilizando-se duas amostras de linfonodos caninos incluídos no trabalho, com resultados previamente confirmados por meio de sorologia e PCR para *Leishmania* spp. A melhor diluição desse anticorpo para ser empregado no teste de IHQ foi de 1:3000. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com polímero de terceira geração marcada com imunoglobulinas e enzima peroxidase (SuperPicture, Life Technology®) durante 60 min a 37 °C. A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB) (Sigma®) em substrato cromogênico e contra-coloração com hematoxilina de Harris. Todas as lâminas foram analisadas por dois profissionais por meio de microscópio óptico Olympus CX22LED no aumento de 400x. A reação foi considerada positiva, quando se visualizou a imunomarcacão castanho-dourada de amastigotas teciduais, pela leitura feita em consenso pelos profissionais, ou negativa quando não foram observadas tais marcações (**Figura 1**). Como controle positivo foi empregada a mesma amostra da padronização do anticorpo. O controle negativo da reação foi realizado omitindo-se a adição de anticorpo primário em todas as amostras de linfonodo. Além disso, foram incluídos 10 amostras de linfonodos de cães com diagnóstico de linfoma, oriundas do município de São Paulo, e negativas para *Leishmania* spp. na sorologia e/ou PCR.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL nº 03/2014).

Este trabalho teve o suporte financeiro da FAPESP sob nº 12/51267-4 e Chamamento Público –nº 20/2013 SVS/MS.

Análise estatística

As análises estatísticas e a elaboração de gráficos foram realizadas no *software* R (www.rproject.org/) e *Excel* (Microsoft). As frequências absolutas e relativas foram calculadas e analisadas para todas as variáveis.

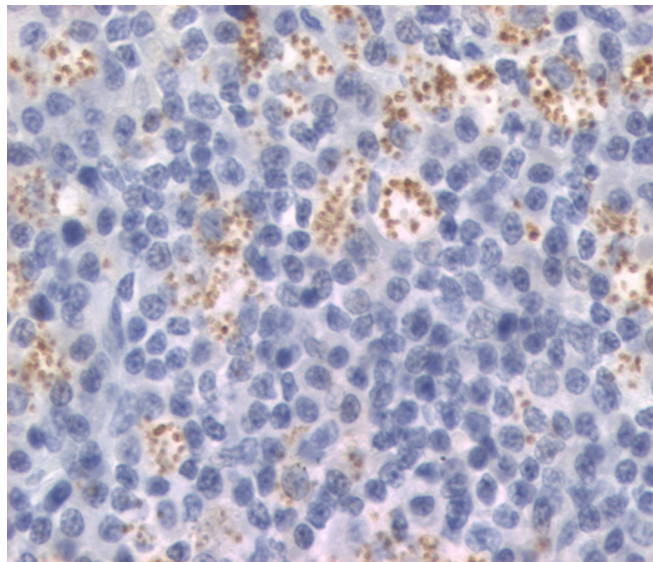


Figura 1. Fotomicrografia de linfonodo poplíteo de cão. Imunomarcacão para *Leishmania* spp. em tecido histológico, revelado com DAB e contra-corado com hematoxilina. Aumento de 400x

Foram realizados cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia, intervalo de confiança 95 %, efetuando-se análise comparativa entre o padrão de referência (testes sorológicos e PCR) e reação de IHQ. Para efetuar a comparação entre as frequências absolutas de positividade em cada tecido analisado entre os diferentes municípios foi utilizado o teste de Fisher com nível de significância de 5 %. Para avaliar a concordância entre as duplicatas de amostras, calculou-se o índice *Kappa* (κ). O grau de concordância é considerado baixo quando o valor do *Kappa* é de 0 a 0,2; razoável de 0,21 a 0,4; moderado de 0,41 a 0,6; bom de 0,61 a 0,8; e muito bom de 0,8 a 1.

RESULTADOS

Por meio de reação de IHQ, 132 (98,51 %) dos 134 cães foram positivos para *Leishmania* spp. em pelo menos um dos órgãos estudados. Das 1.164 amostras, 573 (49,23 %) foram positivas na reação de IHQ (**Figura 1**). Nenhum dos dez cães com diagnóstico de linfoma demonstrou imunomarcacão positiva para *Leishmania* spp. A sensibilidade do teste IHQ foi de 98,51 %

(IC 95 % = 94,72; 99,59), a especificidade de 100,00 % (IC95 % = 97,17; 100), o valor preditivo positivo de 100,00 % (IC95 % = 97,17; 100), o valor preditivo negativo de 83,33 % (IC95 % = 55,20; 95,30) e a acurácia de 98,61 % (**Tabela 1**).

Tabela 1. Análise comparativa dos resultados obtidos da associação dos testes sorológico e parasitológico (PCR + cultura) com a reação de IHQ para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em amostras oriundas de diferentes tecidos

IHQ	Sorológico+PCR+cultura		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	132	0	132
Negativo	2	10	12
Total	134	10	144

Em relação às amostras de órgãos analisadas, 78,79 % das amostras de tecido esplênico analisadas exibiram imunomarcagem positiva, e este órgão apresentou a maior frequência de positividade entre os tecidos testados. No entanto, em amostras provenientes de quatro dos oito municípios analisados, o linfonodo poplíteo foi o tecido com maior taxa de positividade, variando de 50,00 a 100,00 %, porém com positividade total de 76,99 % (**Tabela 2**).

O terceiro órgão com maior positividade foi o fígado, (73,64 %) considerando todos os municípios, porém nas amostras provenientes dos municípios de Fernandópolis, Santa Fé do Sul Valentim Gentil, Araçatuba e Espírito Santo do Pinhal, esse órgão seguiu o baço em relação a frequência de positividade. A pele lesionada, com positividade de 65,45 %, foi o quarto tecido com maior taxa de positividade.

A adrenal, apesar de ser um tecido raramente analisado em cães com LVC, apresentou positividade em 49 (51,58 %) das 95 amostras. A pele macroscopicamente sadia foi o sexto órgão com maior representatividade, sendo positiva em 26 (45,61 %) das 57 amostras analisadas. Rim, pulmão, pâncreas, intestino, coração, bexiga urinária e estômago foram os

tecidos que apresentaram menor reatividade de 32,14 %, 25,25 %, 22,67 %, 37,21 %, 21,21 %, 10,53 % e 3,44 %, respectivamente.

A frequência relativa de resultados positivos no intestino exibiu diferença estatística ($p=0,0045$) entre as amostras teciduais oriundas dos municípios estudados, com variação de resultados entre 10,00 % em Santa Fé do Sul e 51,14 % em Votuporanga. Nenhum outro tecido apresentou diferenças estatísticas quanto à positividade das amostras entre os diferentes municípios. Os achados no exame de IHQ estão apresentados na **Tabela 2**.

Em relação ao índice *Kappa* entre as duplicatas das amostras dos diferentes tecidos analisados, observou-se grau de concordância total muito bom; e as amostras de baço, fígado, pele em dobra ungueal e estômago apresentaram concordância de 1,000. Outros tecidos que apresentaram concordância muito boa foram o rim e o pâncreas. Linfonodo, pele, adrenal, pele sem lesão, pulmão e intestino revelaram índice *Kappa* menor do que 0,8, considerados bons. Apenas o coração exibiu índice *Kappa* de 0,402, e interpretado como moderado (**Tabela 3**).

Tabela 3. Valores de *Kappa* para avaliação da concordância entre os resultados detectados nas duplicatas de amostras na interpretação da reação de IHQ em diferentes amostras de tecidos coletadas de cães

Tecidos	Índice <i>Kappa</i> (IC95%)	Interpretação
Baço	1,000 (1,000-1,000)	Muito boa
Linfonodo	0,706 (0,315-1,000)	Boa
Fígado	1,000 (1,000-1,000)	Muito boa
Pele	0,667 (0,310-1,000)	Boa
Adrenal	0,723 (0,470-0,975)	Boa
Pele sem lesão	0,798 (0,532-1,000)	Boa
Rim	0,939 (0,820-1,000)	Muito boa
Pulmão	0,742 (0,463-1,000)	Boa
Pâncreas	0,901 (0,713-1,000)	Muito boa
Intestino	0,755 (0,502-1,000)	Boa
Coração	0,402 (0,072-0,797)	Moderada
Pele em dobra ungueal	1,000 (1,000-1,000)	Muito boa
Estômago	1,000 (1,000-1,000)	Muito boa
Total	0,840 (0,793-0,897)	Muito boa

Legenda: IC= intervalo de confiança

*Bexiga urinária, ovário, testículo, útero e medula óssea não foram calculados individualmente, devido à baixa representatividade amostral

Tabela 2. Distribuição da positividade na reação de IHQ para *Leishmania* spp. segundo a topografia tecidual em número absoluto (N), porcentagem (%) e valor de *p* nas amostras de tecidos de diferentes órgãos de cães provenientes de diferentes municípios do Estado de São Paulo

Tecidos	VOTU		FER		SF		VG		ATB		BRU		MAR		ESP		Total		Valor de <i>P</i>
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Baço	40/48	83,33	12/19	63,19	15/19	78,94	3/4	75,00	1/3	33,33	11/13	84,62	14/14	100,00	8/12	66,67	104/132	78,79	0,06048
Linfonodo	32/41	78,05	11/15	73,33	6/12	50,00	3/3	100,00	3/5	60,00	10/12	83,33	13/14	92,86	9/11	81,82	87/113	76,99	0,2771
Fígado	35/46	76,09	15/21	71,43	10/15	66,67	4/5	80,00	2/5	40,00	9/12	75,00	12/14	85,71	8/11	72,73	95/129	73,64	0,6238
Pele com lesão	33/48	68,75	13/20	65,00	6/15	40,00	2/5	40,00	2/5	40,00	4/5	80,00	10/12	71,43	8/9	88,89	78/119	65,45	0,1088
Adrenal	24/44	54,55	10/19	52,63	4/11	36,36	2/2	100,00	2/5	40,00	---	---	7/14	50,00	---	---	49/95	51,58	0,7414
Pele sem lesão	17/34	50,00	7/13	53,85	0/5	0,00	---	---	2/5	40,00	---	---	---	---	---	---	26/57	45,61	0,1624
Rim	15/47	31,91	7/19	36,84	1/13	7,69	0/3	0,00	1/5	20,00	---	---	7/14	50,00	5/11	45,45	36/112	32,14	0,2069
Pulmão	14/47	29,79	2/18	11,11	4/15	26,67	---	---	1/5	20,00	---	---	4/14	28,57	---	---	25/99	25,25	0,6259
Pâncreas	7/27	25,93	3/16	18,75	2/14	14,29	---	---	1/4	25,00	---	---	4/14	28,57	---	---	17/75	22,67	0,8964
Intestino	24/42	57,14	4/15	23,53	1/10	10,00	---	---	1/5	20,00	---	---	2/14	14,29	---	---	32/86	37,21	0,00455
Coração	11/47	23,40	7/19	36,84	1/14	7,14	---	---	1/5	20,00	---	---	1/14	7,14	---	---	21/99	21,21	0,1935
Bexiga urinária	2/13	15,38	0/3	0,00	---	---	---	---	0/3	0,00	---	---	---	---	---	---	2/19	10,53	1,000
Estômago	0/8	0,00	0/4	0,00	0/1	0,00	---	---	0/2	0,00	---	---	1/14	7,14	---	---	1/29	3,44	1,000

Legenda: VOTU: Votuporanga; FER: Fernandópolis; SF: Santa Fé do Sul; VG: Valentim Gentil; ATB: Araçatuba; BRU: Bauru; MAR: Marília; ESP: Espírito Santo do Pinhal

DISCUSSÃO

Neste estudo, a reação de IHQ apresentou boa sensibilidade (98,51 %), especificidade (100,00 %) e acurácia (98,61 %). Segundo Santos et al (2011)³¹, a IHQ mostra maior sensibilidade do que o exame histopatológico corado com HE e a citopatologia, provavelmente pela ocorrência de coloração amarronzada conferida pelo cromógeno empregado na técnica de IHQ. Esta característica possibilita a identificação da forma, localização e tamanho do parasita, e o alto grau de contraste que ocorre entre os parasitas e o tecido do hospedeiro torna o diagnóstico da LVC mais preciso¹⁷.

O baço exibiu a maior porcentagem de resultados positivos na IHQ, diferentemente dos dados descritos por outros autores na literatura que obtiveram taxas de 60,98 % e 69,57 %, respectivamente em cães com e sem sinais clínicos de LVC³², e de 75,00 % nos cães com LVC testados³³, sendo que estas porcentagens ficam aquém dos resultados obtidos em linfonodos regionais nesses estudos. No entanto, amostras provenientes de quatro dos oito municípios estudados revelaram maior positividade em linfonodo poplíteo do que no baço, variando-se de 50,00 a 100,00 %. Os linfonodos têm sido apontados como órgãos de eleição para o diagnóstico de LVC por meio de IHQ; e há estudos que relatam boa sensibilidade de 65,85 % a 85,00 % na análise de animais sorologicamente positivos³²⁻³⁴.

O fígado tem revelado considerável variabilidade no diagnóstico de LVC, visto que Giunchetti et al.¹⁵ obtiveram resultados de 25,00 a 65,00 % de positividade em cães sem e com manifestações clínicas, respectivamente. Moreira et al³², ao compararem os resultados da reação de IHQ na análise de amostras de fígado de cães com LVC, detectaram a positividade de somente 53,66 % em animais com sinais clínicos e de 56,52 % em aqueles sem sinais. Segundo Costardi³³, a positividade foi de 60,00 % em animais assintomáticos e 75,00 % em sintomáticos. No presente trabalho, o fígado foi o tecido com terceira maior porcentagem de resultados positivos (73,64 %).

Em relação à pele, a positividade de 65,45 % nos tecidos com lesão e de 45,61 % em sem lesão na reação de IHQ, foi compatível com o percentual de 70,00 % detectado por Solano-Gallego et al¹⁹. Os dados também corroboram o achado de Queiroz et al³⁵, que observaram reações positivas em 56,50 % de peles lesionadas e em 31,80 % de peles sadias.

Na glândula adrenal, 49 (51,58 %) dos 95 materiais analisados foram positivos para *Leishmania* spp. pela IHQ. A adrenal tem um papel essencial na resposta imune do organismo ao stress e a agentes infecciosos, uma vez que é praticamente a fonte exclusiva de corticosteróides³⁶. Momo et al³⁷ demonstraram 17,78 % de positividade nas amostras estudadas, valores estes inferiores aos encontrados no presente estudo.

Os tecidos de rim, pulmão, pâncreas, intestino, coração, bexiga urinária e estômago revelaram baixa sensibilidade de 32,14 %, 25,25 %, 22,67 %, 37,21 %, 21,21 %, 10,53 % e 3,44 %, respectivamente. É interessante observar que houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência relativa de positividade na IHQ nas amostras de intestino entre aquelas oriundas dos diferentes municípios estudados, sendo 10,00 % em Santa Fé do Sul e 51,14 % em Votuporanga. Estes achados ressaltam o amplo espectro de sinais e sintomas que a doença pode apresentar, e que implicam no seu diagnóstico.

Quanto ao índice *Kappa* para as duplicatas teciduais analisadas, notou-se o valor geral muito bom de 0,84. Os tecidos com maior índice de concordância foram de baço, fígado, rim e estômago; contudo, este último demonstrou baixa frequência de amostras positivas. O linfonodo e a pele revelaram grau de concordância bom, assim como adrenal, pulmão e intestino, apesar de alguns deles apresentarem baixa prevalência. Apenas o índice *Kappa* do coração foi interpretado como moderado, provavelmente pela baixa carga parasitária nos tecidos positivos, o que facilitaria a ocorrência de resultados falso-negativos na análise desse órgão. Estes valores indicam que apenas um fragmento representativo dos tecidos analisados seria suficiente para realizar o diagnóstico pela reação de IHQ, especialmente nos órgãos com elevada positividade, como baço e linfonodo.

CONCLUSÃO

A reação de IHQ para o diagnóstico de *Leishmania* spp. foi padronizada e implantada com sucesso no Núcleo de Patologia Quantitativa do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. O baço e os linfonodos foram considerados os órgãos de eleição para realizar o procedimento analítico, sendo necessário apenas um único fragmento tecidual representativo da amostra a ser examinada.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP) e ao Ministério da Saúde pelo suporte financeiro; aos colegas Carlos Roberto Elias, Edson Bueno dos Anjos, Élcio Sanches Esteves Júnior, Mileno Castro Tonissi, Fabiana Sisto Sandrin Giacometi, Vanessa Gusmon da Silva, Elaine Barbosa Oliveira pela colaboração.

REFERÊNCIAS

1. Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:117-8. [DOI:10.1590/S0074-02762006000100024].
2. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27:305-18. [DOI:10.1590/S0102-311X2008001200011].
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas, 1990 a 2011. 2012. [acesso 2015 Set. 15]. Disponível em: [http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf].
4. Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniosis. *In*: Greene CE, editor. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1990. p. 450- 8.
5. Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. *In*: Anais do I Congresso de Parasitologia Veterinária, Simpósio Latinoamericano de Rickettsioses. Ouro Preto, Minas Gerais; 2004.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). 2ª. ed. Brasília (DF): Fundação Nacional de Saúde; 1996.p.86.
7. Santa Rosa IC, Oliveira IC. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. *Clin Vet*. 1997;11:24-8.
8. Baneth G. Leishmaniasis. *In*: Greene CE, editor. *Infectious disease of dog and cat*. Georgia: Saunders Elsevier; 2006.p.685-98.
9. Scott WD, Miller WH, Griffin CE. Viral, rickettsial, and protozoal skin diseases. *In*: *Small Animal Dermatology*. Scott WD, Miller WH, Griffin CE, editors. WB Saunders, Philadelphia - PA: 2001. p. 522-4.
10. Campino LM. Canine reservoir and leishmaniasis: epidemiology and disease. *In*: Farrel JP. *Leishmania: world class parasites*. 2002, v.4, p.45-57.
11. Secretaria de Estado da Saúde (São Paulo – SP). Leishmaniose Visceral Americana: II Informe Técnico. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2003. 48p.
12. Reichman MLAB. Leishmaniose visceral canina: uma zoonose reemergente. *In*: 1º Fórum sobre Leishmaniose visceral canina, Jaboticabal, SP; 2006.
13. Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SH. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clin Vet*. 2000;5(28);36-44.
14. Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, Melo MN, Michalick MSM. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*. 2004;292:17-23. [DOI:10.1016/j.jim.2004.05.009].

15. Giunchetti RC, Mayrink, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol*. 2006;135:100-07. [DOI:10.1016/j.jcpa.2006.06.005].
16. Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen BW, Chelack B. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*. 2008;20:393-413. [DOI: 10.1177/104063870802000401].
17. Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci*. 1988; 44(2):194-6.
18. Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest*. 1997; 2(9):439-40.
19. Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol*. 2004;130(1):7-12. [DOI:10.1016/S0021-9975(03)00063-X].
20. Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res*. 2006; 2(17):1-7. [DOI:10.1186/1746-6148-2-17].
21. Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune response. *Vet Dermatol*. 2005;16(3):187-19. [DOI: 10.1111/j.1365-3164.2005.00454.x].
22. Alves VAF. Garantia de qualidade em imuno-histoquímica. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. Manual de imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p.1-9.
23. Jaffer S, Bleiweiss IJ. Beyond hematoxylin and eosin: the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Invest*. 2004;22(3):445-65. [DOI: 10.1081/CNV-200034896].
24. Leong ASY, Wright J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. *Histopathol*. 1987;11(12):1295-305. [DOI:10.1111/j.1365-2559.1987.tb01874.x].
25. Rosai J. Special techniques in surgical pathology. In: Ackerman's Surgical Pathology. 8° ed. Nova York: Mosby-Year Book, 1996. p. 29-62.
26. Taylor CR, Cote RJ. Immunocytochemistry: a diagnostic tool for the surgical pathologist. In: Taylor CR, Cote RJ, editors. Major problems in pathology. Vol 19. 2° ed. Philadelphia: WB Saunders; 1994. p. 421-3.
27. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):1016-9. [DOI:10.1097/00000478-200007000-00014].
28. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Algoritmo para confirmação de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral. Brasília, 2013.
29. Motoie G, Ferreira GE, Cupolillo E, Canavez F, Pereira-Chioccola VL. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. *Infect Genet Evol*. 2013;18:48-59. [DOI: 10.1016/j.meegid.2013.04.031].
30. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82(4):566-7. [DOI:10.1016/00359203(88)90510-X].
31. Santos IB, Quintella LP, Madeira MF, Miranda LH, Silva DD, Schubach EY et al. Utilização da imunohistoquímica com soro hiperimune de coelho anti-*Leishmania chagasi* e anti-*Leishmania Viannia braziliensis* no diagnóstico das leishmanioses caninas no Rio de Janeiro – Brasil. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; outubro de 2008; Gramado – RS. [acesso 2015 agosto 06]. Disponível: [http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/].

32. Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett C, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*. 2007;145(3-4): 245-52. [DOI:10.1016/j.vetpar.2006.12.012].
33. Costardi ML. Imunohistoquímica em cães positivos para leishmaniose visceral [dissertação de mestrado]. Campo Grande (MS): Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2009.
34. Ciaramella P, Oliva G, Luna R, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. 1997;141(21):539-43. [DOI:10.1136/vr.141.21.539].
35. Queiroz NM, Assis J, Oliveira TM, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti WA. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19(1):32-8. [DOI:10.4322/rbpv.01901006].
36. Davies E, Mackenzie SM. Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(7):437-45. [acesso 2015 agosto 06]. Disponível: [http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03867.x]. [DOI:10.1046/j.1440-1681.2003.03867.x].
37. Momo C, Rocha NA, Moreira PR, Munari DP, Bomfim SE, Rozza DB, et al. Morphological changes and parasite load of the adrenal from dogs with visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2014;23(1):30-5. [DOI:10.1590/S1984-29612014004].