

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

GEOVANIA MARIA DA SILVA BRAGA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E
IMUNOLÓGICOS DE CÃES (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758)
COM INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA
& CHAGAS, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE
IMPERATRIZ, REGIÃO SUDOESTE DO ESTADO DO
MARANHÃO, BRASIL**

RECIFE

2007
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

GEOVANIA MARIA DA SILVA BRAGA

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E
IMUNOLÓGICOS DE CÃES (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758)
COM INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA
& CHAGAS, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE
IMPERATRIZ, REGIÃO SUDOESTE DO ESTADO DO
MARANHÃO, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência
Veterinária do Departamento de
Medicina Veterinária da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos
requisitos à obtenção do título de
Doutora em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE

2007

GEOVANIA MARIA DA SILVA BRAGA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E
IMUNOLÓGICOS DE CÃES (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758)
COM INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA
& CHAGAS, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE
IMPERATRIZ, REGIÃO SUDOESTE DO ESTADO DO
MARANHÃO, BRASIL**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Ana Clara Gomes dos Santos – UEMA - BRASIL

Profa. Dra. Otamires Alves da Silva – CPqAM/FIOCRUZ - BRASIL

Profa. Dra. Maria Aparecida da Glória Faustino – UFRPE - BRASIL

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia – UFRPE – BRASIL

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva – UFRPE - BRASIL

Busquei ao Senhor e Ele me acolheu e de todos os meus temores me livrou. Salmo 34:4

O Temor a DEUS é o princípio de toda sabedoria. Provérbios 1:7

Esperarei confiadamente pelo Senhor, Ele se inclinou para mim e me ouviu quando eu clamei por socorro. Salmo 40:1

O Senhor é o meu Pastor e nada me faltará. Salmo 23:1

Entrega o teu caminho ao Senhor, confia Nele e o mais Ele fará. Salmo 37:5

Mas, os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam. Isaías 40:31

Crê no SENHOR JESUS CRISTO e serás salvo, tu e tua casa. Atos 16:31

Não temas, porque Eu sou o teu DEUS, Eu te fortaleço, Eu te ajudo e Eu te sustento com a minha destra fiel. Isaías 41:10

O Anjo do Senhor acampa-se ao redor dos que o temem e os livra. Salmo 34:7

O Senhor é a fortaleza da minha vida... Salmo 27:1

O que encobre os seus erros, jamais prosperará, mas aquele que os confessa e deixa, alcançará misericórdia. Provérbios 28:13

Em paz eu me deito e logo pego no sono, porque Senhor, só Tu me fazes repousar em segurança. Salmo 4:8

JESUS disse: tenham cuidado e guardem-se de toda e qualquer avariza. Porque a vida de um homem não depende da quantidade dos bens que ele possui. Lucas 12:15

DEUS é grande e maravilhoso, por mim Ele fará Justiça, disso eu tenho certeza!

Ofereço:

Ao meu Pai, Jorge, in memoriam, a

quem tanto

transmitia

VIDA.

admirava pelas experiências que me

e por ter orientado o caminho da minha

Dedico:

vida:

Aos meus amores, flores do jardim da minha

*Minha Mãe, Rosa, incansável mulher, força e
verdade; Meus filhos, Bergson, Wanessa e
Sybelle, que por aceitarem os meus
ensinamentos, hoje são pessoas honestas,
sinceras, verdadeiras, dedicadas, com garra e
profissionalismo, vivendo completamente a
VIDA.*

Tudo é do Pai, toda a Honra e toda a Glória

É Dele a Vitória alcançada em minha vida

Tudo é do Pai, se sou fraco e pecador

Bem mais Forte é o meu Senhor

Que me cura por Amor...!

(Frederico Cruz)

AGRADECIMENTOS

Ao meu **DEUS**, meu escudo e minha fortaleza ao qual devo a minha vida, a minha força, a minha saúde, a minha energia, o meu trabalho, a minha pesquisa, a minha **TESE**.

Ao meu querido Orientador, de todos os momentos, de todos os instantes, de todas as horas, de todas as alegrias, de todas as tristezas, de todas as formas, realmente o meu Orientador Professor Leucio Câmara Alves, que acreditou nos meus trabalhos de pesquisa, dando-me um crédito de confiança, mesmo sendo pesquisadora do interior do Estado do Maranhão.

Aos meus Co-Orientadores do Brasil, Professora Maria Aparecida Faustino e Professor Frederico Maia, minha gratidão, pois muito me auxiliaram nos momentos de incertezas e insegurança, mas em nenhum momento duvidaram do meu profissionalismo científico.

À minha Co-Orientadora Estrangeira Professora Gabriela Santos-Gomes do IHMT, o meu agradecimento particular, os meus mais sinceros votos de respeito e admiração pela sua pessoa, pelo aprendizado em forma científica, profissional, pelo seu equilíbrio, pelas palavras de conforto e apoio no momento certo, pela sua inteligência incomparável e também por acreditar no meu trabalho de investigação no interior do Estado do Maranhão, Brasil.

Ao Professor Fernando Freire e a Professora Sherlânia, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, meus sinceros agradecimentos, pela confiança e por acreditar que eu chegaria lá, me concedendo a oportunidade de conhecer a investigação no Exterior através do PDEE.

À Mariza, Marcelo, Altamira e todos da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, por terem me apoiado quando eu mais precisava: é nesta hora que se conhece quem são os amigos!

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE pelo apoio acadêmico e de todas as formas; aos Professores, o meu muito obrigada, por passarem mais conhecimento científico, que sempre servirão ao meu aperfeiçoamento profissional.

À Edna, secretária do Programa de Pós-Graduação, meu agradecimento pelo apoio administrativo, pela sua tolerância nas horas de agitação e pressa em alguns documentos.

À CAPES, pela grande oportunidade que me proporcionou, através do PDEE, em realizar um estágio no Exterior, no melhor momento da minha vida e do meu Doutorado.

Ao Professor Francisco, o Emerson e o Pedro da Pró-Reitoria de Administração da UFRPE, que sempre me aconselhavam para eu ter calma, porque tudo daria certo e deu mesmo!

Aos meus colegas de laboratório e da sala de estudo, meu reconhecimento por todos os nossos momentos, porque quando se fala em relacionamento, mesmo em meio científico, sempre haverá sentimentos, como carinho, afeto, amor, dedicação, vibração, colaboração, raiva, ódio, emoções fortes, como o sucesso na pesquisa, na certeza que chegaremos lá, com resultados, com conclusões, na perfeição, no topo, no ápice, na **TESE**. Já estou com SAUDADE!

À Guiomar, pelo apoio em todos os momentos e a todos os que me auxiliaram na rotina diária, meus sinceros agradecimentos, meu fervoroso e abrasivo **MUITO OBRIGADA!**

Ao Secretário de Saúde do Município de Imperatriz – MA, Magno Dantas, que acreditou em mim e nesta pesquisa, visando um controle desta enfermidade no nosso Município.

À minha magnífica Universidade – UEMA, por ter me dado esta magnífica oportunidade de crescimento profissional, juntamente com o meu Magnífico Reitor José Augusto, que muito me incentivou a realizar o meu Doutorado e ao meu Pró-

Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação, Anselmo Raposo, pela liberação imediata para o meu estágio no Exterior.

À FAPEMA, pela bolsa de estudo e pela confiança em três anos de estudos e pesquisas do meu Curso de Doutorado, sabendo que o meu retorno é certo e o meu compromisso é maior.

À UFPI, através da Professora Ivete Lopes Mendonça e sua equipe, que me acolheu com o meu material de pesquisa e me deu pleno apoio acadêmico, profissional e social.

À querida Professora Otamires Alves, o meu fiel agradecimento, por ter me acolhido como estagiária no CPqAM, fazendo com que eu me engrandecesse com os seus ensinamentos e com o seu convívio em pesquisas, como também por acreditar nos meus conhecimentos profissionais me incorporando ao seu grupo de pesquisa internacional de Leishmaniose.

Aos Professores amigos do CPqAM: Regina Bressan, Cristina Peixoto, Luiz Alves e Fábio Brayner, pelos ensinamentos “celulares” e “moleculares”, que muito contribuíram para a minha pesquisa técnico científica e a todos do laboratório de Parasitologia do CPqAM.

A todos que estavam sempre presente nas horas fáceis e difíceis, torcendo por mim, principalmente quando realizei a minha viagem ao Exterior, como também o meu reconhecimento pelo profissionalismo de todos que muito me auxiliaram, em todos os momentos, na colheita do material da minha Tese.

Aos meus alunos que estão a minha espera e aos que já se formaram, mas sempre confiaram em mim e sempre me apoiaram nesta minha batalha profissional; àqueles alunos que sempre me ajudaram e aos que me ajudam na luta contra a Leishmaniose Visceral Canina (LVC).

Ao *Canis familiaris* que cedeu o seu sangue, a sua medula e a sua pele para este estudo...

RESUMO

No Brasil, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* tem sido relatada em todo o país, particularmente na região do nordeste, onde a pobreza e as circunstâncias sociais exercem uma importante influência na saúde e na doença. De qualquer modo, existem poucos relatos sobre

prevalência da leishmaniose visceral do cão doméstico de área endêmica para a doença em humanos. O objetivo desta pesquisa foi verificar a prevalência da LVC no município de Imperatriz, Estado de Maranhão, Brasil, verificando os níveis de produção de anticorpo anti-*Leishmania* IgG1 e IgG2, como também avaliar os sinais clínicos nestes cães. Foram coletadas 420 amostras de soros de cães domiciliados, as quais foram analisadas pelo teste imunoenzimático (ELISA) para verificar a prevalência e os níveis da produção dos anticorpos anti-*Leishmania* IgG1 e IgG2. A fim de avaliar os sinais clínicos, todos os cães sororreagentes para *Leishmania chagasi* pelo teste de ELISA foram examinados. Os resultados mostraram que 46,66% (196/420) eram positivos ao teste sorológico. Encontrou-se associação significativa ($p < 0,05$) entre a positividade e a idade do cão, porém não foi observado associação com relação ao sexo dos animais. Os níveis elevados de anti-*Leishmania* IgG2 foram observados em 29,76% (125/420) e os níveis IgG1 e IgG2 aumentaram significativamente entre animais oligossintomáticos e polissintomáticos. Entretanto, o nível IgG1 foi detectável em apenas alguns animais. A alopecia e a onicogribose (100,00%) foram os sinais clínicos principais observados nos cães infectados, seguidos pela caquexia (93,13%), apatia (88,89%) e lesões oculares (77,78%). A percentagem pequena dos cães (5,70%) naturalmente infectados que mostrou produção de IgG1 e os sinais clínicos, são importantes para confirmar o diagnóstico. Por outro lado, insetos foram coletados com armadilha CDC em diversos locais do município estudado e transportados ao laboratório para colonização. Porém, foi verificado, neste estudo, por ocasião do monitoramento das colônias de *Lutzomyia longipalpis*, contaminação fúngica e bacteriana. Foram encontrados *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. e *Aspergillus* sp. nas colônias de *Lutzomyia longipalpis*. Conclui-se que, medidas preventivas devem ser adotadas para o controle da Leishmaniose Visceral Canina nesta área.

Palavras Chave: Leishmaniose Visceral Canina; Aspectos Clínicos; Prevalência; Anticorpos anti-*Leishmania*; Colonização de *Lutzomyia longipalpis*; Contaminação Fúngica e Bacteriana.

ABSTRACT

In Brazil, Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) caused by *Leishmania (Leishmania) chagasi* has been reported all over the country particularly in northeast region, where the poverty and social conditions exert an important influence on health and disease. However there are few reports on the prevalence of visceral leishmaniasis among domestic dog in endemic area for human disease. The goal of this research was to verify the prevalence of the CVL in Imperatriz County, Maranhão State, Brazil, and also verify the levels of IgG1 and IgG2 anti-*Leishmania* antibody production and evaluate the clinical signs in these dogs. A total of 420 sera samples from domiciliated dogs were collected and analyzed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to verify the prevalence and the levels of IgG1 and IgG2 anti-*Leishmania* antibody production. In order to evaluate the clinical signs all dogs positive for *L. chagasi* antibodies by ELISA test were examined. The results showed 46.66% (196/420) were positive to serological test. It have found differences statistically ($p < 0.05$) between the positivity and age of the dog, but it have not observed association with relation the sex of the animals. High levels of anti-*Leishmania* IgG2 were observed in 29.76% (125/420) and IgG1 and IgG2 levels increased significantly between oligosymptomatic and polysymptomatic animals. However IgG1 level was detectable in a few animals. Alopecia and onicogryphosis (100.00%) were the major clinical sign observed in infected dogs following by cachexia (93.13%), apathy (88.89%) and ocular lesions (77.78%). The small percentage of dogs (5,70%) naturally infected showed the IgG1 production and the clinical signs are important to confirm the diagnosis. On the other hand, sandflies were collected by CDC trap in locality several of studied county and transported to laboratory to colonization. However, it was examined in this study, on the occasion of the observation in the *Lutzomyia longipalpis* colony, the fungal and bacterial contamination was reported. It was observed, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. and *Aspergillus* sp. on the *Lutzomyia longipalpis* colony. In conclusion preventive measures should be adopted to control the Canine Visceral Leishmaniasis in this area.

Key-Words: Canine Visceral Leishmaniasis; Clinical Aspects; Distribution; Anti-*Leishmania* Antibody; *Lutzomyia longipalpis* Colonization; Fungal and Bacterial Contamination.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

3 PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ, REGIÃO SUDOESTE DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL

TABELA 1 Frequência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães do Município de Imperatriz na região Sudoeste do Estado do Maranhão, Brasil, 2005

59

TABELA 2 Prevalência de cães sororreagentes para *Leishmania (L.) chagasi* segundo faixa etária no Município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005

61

CAPITULO II

4 SPECIFIC IgG1 AND IgG2 SUBCLASS IN DOGS NATURALLY INFECTED BY *Leishmania chagasi* FROM IMPERATRIZ CITY, MARANHÃO STATE, BRAZIL

TABLE 1 Clinical classification and IgG1 and IgG2 antileishmanial antibodies detected by ELIISA of dogs asymptomatic and oligo/polisymptomatic of Imperatriz county of Maranhão State, Brazil, 2006

74

TABLE 2 Clinical classification parasitological examinations of bone marrow (BM) and healthy skin (HS) and IgG1 and IgG2 antileishmanial antibodies detected by ELISA of symptomatic dogs of Imperatriz county of the Maranhão State, Brazil, 2006

75

CAPITULO III

5 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC) NO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ, ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL

TABELA 1 Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos em cães sororreagentes para LVC do Município de Imperatriz, Região Sudoeste do Estado do Maranhão, Brasil, 2006 89

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

3 PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ, REGIÃO SUDOESTE DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL

FIGURA 1 Mapa do Brasil, destacando o Estado do Maranhão, mostrando a localização de Imperatriz na Amazônia Maranhense (Fonte: Rêbello, 1999) 57

CAPÍTULO II

4 SPECIFIC IgG1 AND IgG2 SUBCLASS IN DOGS NATURALLY INFECTED BY *Leishmania chagasi* FROM IMPERATRIZ CITY, MARANHÃO STATE, BRAZIL

FIGURE 1 Map of Brazil, detaching Maranhão State, showing to the localization of Imperatriz city in the Amazônia Maranhense 72

FIGURE 2 Antileishmanial antibodies IgG1 (A) and IgG2 (B) levels presented by asymptomatic (asym), oligosymptomatic (oligo) and polysymptomatic (poly) dogs
75

FIGURE 3 Antileishmanial antibodies IgG1 and IgG2 levels presented by symptomatic dogs with positive and negative parasitological examinations of healthy skin (A) and bone marrow (B)
76

CAPÍTULO IV

6 AGENTES FÚNGICOS E BACTERIANOS EM UMA COLÔNIA A NÍVEL LABORATORIAL DE *Lutzomyia longipalpis* POPULAÇÃO IMPERATRIZ

FIGURA 1 Armadilhas luminosas CDC colocadas no ambiente rural para captura do inseto *Lutzomyia* sp. no município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005
100

FIGURA 2 Armadilhas luminosas CDC colocadas no ambiente peridomiciliar para captura do inseto *Lutzomyia* sp. no município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005
100

FIGURA 3 Materiais utilizados no processo de colonização do inseto *Lutzomyia longipalpis* no Laboratório de Endemias da Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2005
101

FIGURA 4 Acondicionamento dos exemplares machos e fêmeas do inseto *Lutzomyia longipalpis* nas gaiolas em câmara climatizada com temperatura de 27°C e Umidade Relativa de 80% no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005
102

FIGURA 5 Aspecto do recipiente utilizado para oviposição, larvas e pupas de *Lutzomyia longipalpis* colonizados no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005

FIGURA 6 Aspecto da colonização do inseto *Lutzomyia longipalpis* em recipiente com tela de tecido sintético fino, com abertura central, vedada com tampão de algodão, no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005

FIGURA 7 Aspecto da colonização do inseto *Lutzomyia longipalpis* em estágio de larva com contaminação fúngica e bacteriana no recipiente no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005

FIGURA 8 Substrato do recipiente da colônia de *Lutzomyia longipalpis* com contaminação fúngica e bacteriana no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL

19

1.1 – Leishmaniose Visceral Canina

21

1.2 – Agente etiológico da LVC

22

1.3 – O Vetor

23

1.4 – Distribuição Geográfica da LVC

25

1.5 – Sinais Clínicos	
26	
1.6 – Diagnóstico da LVC	
28	
1.7 – Epidemiologia da LVC	
30	
1.8 – Imunologia da LVC	
31	
1.9 – Medidas de prevenção da LVC	
33	

REFERÊNCIAS

34

2 OBJETIVOS

51

2.1 – Geral

51

2.2 – Específicos

51

CAPÍTULO I

3 PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) COM INFECÇÃO NATURAL POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ, REGIÃO SUDOESTE DO MARANHÃO, BRASIL

Resumo

53

Abstract

54

3.1 – INTRODUÇÃO

55

3.2 – MATERIAL E MÉTODOS

57

3.2.1 Área estudada

57

3.2.2 Animais	58
3.2.3 Identificação e avaliação dos animais	58
3.2.4 Obtenção do plasma para exame sorológico	58
3.2.5 Teste sorológico – ELISA	59
3.2.6 Análise estatística	59

3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

59

3.4 – CONCLUSÃO

61

REFERÊNCIAS

62

CAPÍTULO II

4 SPECIFIC IgG1 AND IgG2 SUBCLASS IN DOGS NATURALLY INFECTED BY *Leishmania chagasi* FROM IMPERATRIZ CITY, STATE OF MARANHÃO, BRAZIL

Abstract

69

Resumo

70

4.1 – INTRODUCTION

71

4.2 – MATERIAL AND METHODS

72

4.2.1 Area of research

72

4.2.2 Studied population

73

4.2.3 Clinical examination

73	4.2.4 Parasitological examinations
73	4.2.5 Serum samples
73	4.2.6 Serological examinations
73	4.2.7 Statistical analysis

74

4.3 – RESULTS

74

4.4 – DISCUSSION

76

4.5 – CONCLUSION

78

REFERENCES

79

CAPÍTULO III

5 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

NO

MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ, ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL

Resumo

85

Abstract

86

5.1 – INTRODUÇÃO

87

5.2 – MATERIAL E MÉTODOS

88

5.2.1 Área estudada

88

5.2.2 População estudada

88

5.2.3 Exame dos animais

89

5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

89

5.4 – CONCLUSÃO

91

REFERÊNCIAS

92

CAPÍTULO IV

6 AGENTES FÚNGICOS E BACTERIANOS EM UMA COLÔNIA A NÍVEL LABORATORIAL DE *Lutzomyia longipalpis* POPULAÇÃO IMPERATRIZ

Resumo

97

Abstract

98

6.1 – INTRODUÇÃO

99

6.2 – MATERIAL E MÉTODOS

99

6.2.1 Coleta dos flebotómos

99

6.2.2 Colonização

101

6.2.2.1 Alimentação das fêmeas

101

6.2.2.2 Alimentação dos machos

102

6.2.2.3 Preparo do substrato utilizado para oviposição, larvas e pupas

102

6.2.2.4 Transporte do material

104

6.2.2.5 Alimentação das larvas

104

6.2.2.6 Monitoramento da colônia

104

6.2.2.7 Coleta de material das colônias

105

6.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

105

6.4 – CONCLUSÃO

106

REFERÊNCIAS

106

7 CONCLUSÕES GERAIS

108

APÊNDICE

109

APÊNDICE A - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO ANIMAL

110

ANEXOS

111

ANEXO A - DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DO PROPRIETÁRIO

112

ANEXO B – MAPA DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ

113

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E
IMUNOLÓGICOS DE CÃES (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758)**

COM INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937) PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ, REGIÃO SUDOESTE DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL

1 INTRODUÇÃO GERAL

As Leishmanioses são complexos de doenças parasitárias de caráter zoonótico e constituem um grupo de enfermidades causadas por diferentes espécies de protozoários tripanosomatídeos, com distribuição mundial, estando unicamente ausente na Antártida (GÁLLEGO, 2004).

Atualmente, 88 países das regiões tropicais e subtropicais já registram a infecção, com aproximadamente 90% dos casos concentrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil, onde aproximadamente 12 milhões de pessoas estão infectadas, estimando-se que aproximadamente 360 milhões de habitantes estejam expostos ao risco de contrair esta enfermidade no globo terrestre (DAVIDSON, 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; GÁLLEGO, 2004; ALVES e FAUSTINO, 2005).

A Leishmaniose Visceral (LV) é causada pela *Leishmania donovani* na Índia (DAVIDSON, 1999), pela *Leishmania infantum* no Mediterrâneo (DEPLAZES et al., 1995; DEREURE et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; BLAVIER et al., 2001) e *Leishmania chagasi* na América Latina (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; TAFURI et al., 2001), sendo que a espécie *Leishmania chagasi* tem sido considerada sinônimo de *Leishmania infantum* com base em estudos dos perfis isoenzimáticos (MAURÍCIO et al., 2000).

Nas Américas, Central e do Sul, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é transmitida ao homem e aos animais através da picada das fêmeas hematófagas dos insetos vetores dípteros psicodídeos do gênero *Lutzomyia* (MARZOCHI et al., 1985; DAVIDSON, 1999; TAFURI et al., 2001; GALATI, 2003) onde é observado com frequência nas áreas peri e intradomiciliares (REBÊLO et al., 1999; LAINSON e RANGEL, 2005).

Os cães domésticos representam o principal reservatório para a infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo o principal responsável pela manutenção da Leishmaniose Visceral, podendo ser ainda a principal fonte de infecção (DEANE e

DEANE, 1955; ALENCAR, 1961; DEANE e DEANE, 1962; IVERSON et al., 1983; MARZOCHI et al., 1985; TESH, 1995; NASCIMENTO et al., 1996; PARANHOS-SILVA et al., 1996; BADARÓ et al., 1996; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; ALVES et al., 1998; TAFURI et al., 2001).

No Brasil, a Leishmaniose Visceral (LV) encontra-se registrada em quase todos os estados da federação, particularmente na região Nordeste com diferentes perfis epidemiológicos, ora sendo uma doença rural, ora uma doença urbana (ALENCAR et al., 1956; DEANE, 1956; EVANS et al., 1992; NASCIMENTO et al., 1996; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; ALVES et al. 1998; IKEDA, 2003).

A presença da doença em cães em seu maior número de casos tem sido observada no nordeste (ALVES e FAUSTINO, 2005), região que registra os maiores índices de incidência desde a década de 90 (CAMARGO-NEVES, 2006).

Alencar, desde 1959, já alertava que o calazar canino é infinitamente mais freqüente que o calazar humano, sendo o cão incriminado como reservatório da infecção na cadeia epidemiológica da LV. Também, os estudos de Deane e Deane (1955) e Deane e Deane (1962) têm mostrado que a leishmaniose visceral canina é uma importante doença zoonótica e endêmica. Contudo, Donatien e Lestoquard (1935) relatam que não existe relação entre a taxa de infecção parasitária e os sinais clínicos evidentes no cão, como também a ausência ou não destes sinais não possui grande significado na confirmação da doença.

Moreno et al. (2005) identificaram os determinantes da infecção numa área urbana, onde foi realizado um estudo seccional de base populacional utilizando-se métodos moleculares e sorológicos para identificar a infecção. Os fatores de risco identificados foram associados às condições de habitação, presença de animais e probabilidade de contato com flebotomíneos (ARIAS et al., 1996; GÁLLEGO, 2004).

Cabrera et al. (2003) verificaram que a distância da residência a borda da floresta, sua altitude e presença do gambá (*Didelphis marsupialis*) em quintal de casas, eram considerados fatores preditores da infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* em cães de Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro.

Santos-Gomes et al. (2002) citam que o cão (*Canis familiaris*) é o reservatório doméstico e peridoméstico mais importante de *Leishmania infantum* na bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente, Ásia e Norte de África (GUARGA et al., 2000). Baneth e Jaffe (1999), nas cidades do norte e central de Israel verificaram LV em chacal (*Canis aureus*) e em raposa (*Vulpes vulpes*).

No Brasil, outras espécies de animais silvestres foram encontradas infectadas por *Leishmania* sp. Deane e Deane, em 1954 e 1955 e Deane em 1956, já realizavam estudo sobre a infecção em raposas, *Lycalopex ventulus*, espécie encontrada nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro Oeste e *Cerdocyon thous*, espécie encontrada na região Amazônica (LAINSON et al., 1969; SILVEIRA et al., 1982). O Lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus*, que habita as regiões de cerrado do Brasil, também tem sido considerado reservatório e os marsupiais, *Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris*, foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (ALVES et al., 1998; BRASIL, 2004).

1.1 - Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

A descoberta e a caracterização do gênero *Leishmania*, no início do século, possibilitando o diagnóstico etiológico das leishmanioses, trouxeram como consequência o reconhecimento da existência dessas parasitoses em vastas áreas de quatro continentes (DEANE, 1956), com exceção da Antártida e da Austrália (ASHFORD et al., 1992).

No ano de 1908, o pesquisador Nicolle, partindo da hipótese de que uma moléstia que se caracteriza por casos isolados, deveria ter como reservatório um animal doméstico. Após examinar uma cadela com sinais clínicos suspeitos, demonstrou a sua teoria através do encontro do parasita num cão com sinais clínicos de LV, ficando dessa forma, conhecido o primeiro foco de calazar canino no mundo, em Túnis, na África, sendo o cão apontado como possível reservatório primário ou secundário da doença (ALENCAR, 1959).

Ainda, Nicolle em 1908 estabeleceu a grande receptividade do cão doméstico ao parasita do calazar mediterrâneo, comprovando com experiências a possibilidade de transmissão por insetos (DEANE, 1956). Atualmente, a proporção de cães soropositivos esta entre 14% a 42% na região do Mediterrâneo (VERCAMMEN et al., 1997).

Muitos estudos epidemiológicos foram realizados considerando o cão reservatório doméstico da LV, especialmente na Itália, onde a prevalência foi de 23,9% (POZIO et al., 1981); na França a prevalência citada foi de 17,1% (JAMBOU et al., 1986); na Espanha em dez anos de estudos (1985/1994) a prevalência encontrada foi em torno de 10,2% (FISA et al., 1999) e em Portugal de 20,2%

(ABRANCHES et al., 1993; CARDOSO et al., 2004).

Deane (1956) descreveu os principais aspectos epidemiológicos desta zoonose no Brasil, ao estudar o papel do homem, do cão e da raposa como reservatórios na manutenção da endemia da LVC. Brener, em 1957, concluiu que o cão representa um elemento dos mais importantes, quer pela frequência com que se encontra parasitado, quer pelo seu contato estreito com o homem. Lainson e Shaw (1974) relatam que até a pouco eram relativamente escassos os conhecimentos a cerca dos hospedeiros, vetores e epidemiologia das diversas *Leishmanias*, tendo sido escassas as oportunidades de estabelecer um sistema eficaz de classificação. No Brasil, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) foi descrita pela primeira vez em cães, na década de trinta, com o achado de Evandro Chagas de vários casos no Estado do Pará e por Castro e Ferreira, em cães parasitados no Ceará, e também em Pernambuco por Pondé, Mangabeira Filho e Jansen que encontraram um caso de calazar canino (ALENCAR, 1959). Em 1937 e 1938, a prevalência da doença no País foi descrita por Chagas et al., em muitas regiões, especialmente no Nordeste, através de relatórios dos trabalhos de uma comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana no Brasil (CHAGAS et al., 1937, 1938).

Nos estudos de Deane e Deane em 1954, realizados no Ceará, os autores observaram a prevalência de infecção nos cães examinando (809) e encontrando 32 (3,96%), com calazar. Novos estudos sobre a distribuição da doença foram realizados por Alencar e colaboradores de 1954 a 1958, que adentraram no Estado do Piauí realizando estudos em nove municípios, ficando evidenciada a existência da doença em seis deles. Seguiram-se pesquisas no Estado da Bahia, realizadas por Figueiredo, comprovando a existência desta enfermidade e em Minas Gerais, por Brener em 1957 (ALENCAR, 1959).

As Regiões Norte e Nordeste apresentam maiores focos de LVC, ficando a mesma em expansão como epidemia urbana e rural em Estados considerados isentos, não descartando a possibilidade de infecção. Contudo, a ausência de uma política voltada à saúde pública, a ocorrência da doença no homem, assim como a densidade de insetos vetores e a presença do reservatório canino infectado (BADARÓ et al., 1996; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997) geram condições fundamentais para novos focos da LVC.

No Maranhão, de acordo com pesquisas realizadas, a propagação da LVC merece uma atenção especial por parte das autoridades governamentais. Até 1981,

não houve relatos de alguma ocorrência de LVC no Estado, entretanto, SILVA et al. (1997) diagnosticaram a doença em quatro casos no município de São Luis, descrevendo um total de 39 casos autóctones em um inquérito canino (NASCIMENTO, 1996).

1.2 - Agente etiológico da LVC

As espécies do gênero *Leishmania* são protozoários intracelulares obrigatórios de células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM) (DE LUNA et al., 1999) apresentando durante o seu ciclo de vida duas formas morfológicas distintas, sendo uma forma intracelular obrigatória, parasita de vertebrados denominada amastigota (THOMÉ, 1999; SUNDAR e RAI, 2002) e a forma extracelular designada promastigota, presente no aparelho digestivo de insetos dípteros do gênero *Lutzomyia* (NOLI, 1999). O ciclo de vida deste parasita no vetor díptero é um processo complexo envolvendo alterações comportamentais, morfológicas e bioquímicas, sendo idêntico para todas as espécies de *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK, 1990).

De acordo com Levine et al., (1980), o agente etiológico da LVC possui uma seguinte posição taxonômica:

Reino: Protista Haeckel, 1866;

Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1817;

Filo: Sarcomastigophora Honigberg & Balamuth, 1963;

Subfilo: Mastigophora Deising, 1866;

Classe: Zoomastigophorea Calkins, 1909;

Ordem: Kinetoplastida Honigberg, 1963 *emend.* Vickerman, 1976;

Subordem: Trypanosomatina Rent, 1880;

Família: Trypanosomatidae Doflin, 1901, *emend* Grobden 1905;

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903;

Subgênero: *Leishmania* (Saf'yanova, 1982);

Espécie: *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937)

considerada atualmente sinonímia *Leishmania (Leishmania) infantum* (MAURÍCIO, 2000).

O estudo molecular relata que, o tamanho do genoma da *Leishmania* sp. varia de 10^7 a 10^8 pares de bases e a organização cromossômica é polimórfica em tamanho

(270 a 2600 kilobases) e em número (24 a 36) (WINCKER et al, 1996; BRITO et al, 1998). O genoma da *Leishmania (Leishmania) chagasi* tem 36 cromossomos com grupos de ligação altamente conservados em diferentes linhagens (ALEXANDRINO, 2001).

1.3 - O Vetor

São conhecidas, aproximadamente, em todo o mundo, 800 espécies de flebotomíneos, sendo 60% encontradas na Região Neotropical. No Brasil, tem-se conhecimento, até o momento de 229 espécies, representando 28,60% do total, sendo que o Nordeste aparece com 96 espécies, das quais, quatro são envolvidas em ciclos endêmicos (AGUIAR e MEDEIROS, 2003; SHERLOCK, 2003).

Dentro da Zoologia Sistemática, o referido artrópode é descrito na Classe Insecta, na Ordem Diptera, pertencente à Família Psychodidae, Sub-família Phlebotominae e Gênero *Phlebotomus* no continente europeu, africano e asiático e *Lutzomyia* no continente americano.

Na América Latina, *Lutzomyia longipalpis* está presente em todos os países, exceto no Chile (GALATI, 2003; MELO, 2004).

No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença, as espécies: *Lutzomyia longipalpis* (DAVIDSON, 1999; THOMÉ, 1999; SOARES e TURCO, 2003; RANGEL e LAINSON, 2003; FRANÇA-SILVA et al., 2005) e *Lutzomyia cruzi* (GALATI et al., 1997; SANTOS et al., 1998) sendo a primeira considerada a principal espécie transmissora e recentemente, a segunda foi incriminada como vetora no Estado do Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2004; FRANÇA-SILVA et al., 2005).

São facilmente reconhecidos, porque quando estão parados suas asas permanecem sempre levantadas e nunca se cruzam sobre o corpo, o tórax estende-se anteriormente sobre a cabeça dando um aspecto de corcunda (BRAZIL e BRAZIL, 2003; SHERLOCK, 2003).

Insetos de pequeno porte medindo de 2 a 3 mm, apresentando em seu corpo intensa pilosidade, possuem a chamada peça bucal bem desenvolvida em forma de trompa, necessária para o ato de sugar, sendo que ambos os sexos necessitam de carboidratos, que são extraídos da seiva de plantas como fonte energética, além disso, as fêmeas precisam ingerir sangue para o desenvolvimento dos ovos (SHERLOCK e

SHERLOCK, 1959; BRAZIL e BRAZIL, 2003).

Geralmente, este inseto realiza um repasto sanguíneo, no período que ocorre entre 18 e 22 horas, para que se complete seu ciclo de vida, que se compõe da seguinte forma: fase embrionária, de sete a 10 dias; fase larvária, que compreende quatro estádios, de 15 a 60 dias; fase de pupa, de sete a 14 dias e adulto, cuja longevidade é de 20 dias (THOMÉ, 1999; RANGEL e LAINSON, 2003).

Os flebótomos para seu desenvolvimento requerem temperaturas entre 20 e 30°C e umidade superior a 60%. As temperaturas inferiores afetam o crescimento larvário e a atividade do inseto adulto se torna diminuída, aumentando, portanto, o tempo de desenvolvimento do ovo ao adulto (BRAZIL e BRAZIL, 2003).

O estudo da transmissão natural de infecção causada pela *Leishmania* sp. em *Lutzomyia longipalpis* é um dos pontos básicos para se entender a epidemiologia da Leishmaniose Visceral tanto humana como canina (THOMÉ, 1999; BRAZIL e BRAZIL, 2003; FRANÇA-SILVA et al., 2005).

Alguns pesquisadores acreditam que, na ausência dos insetos vetores incriminados de transmissores da LVC, existem possibilidades de outros ectoparasitas do cão, como o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e a pulga *Ctenocephalides canis* e *Ctenocephalides felis*, sejam também possíveis transmissores desta enfermidade (LIMA et al., 1996; COSTA, et al., 1999; SHERLOCK e DIAS-LIMA, 2004; COUTINHO et al., 2005; SILVA et al., 2006).

1.4 – Distribuição Geográfica da LVC

A prevalência de leishmaniose canina, em uma área onde a LVC é endêmica, sempre é maior do que se é suposta (SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

No Brasil, segundo Rosário et al. (2005), a prevalência de LVC varia de 1,9 a 35%, e está atualmente registrada em 19 dos 27 estados brasileiros com diferentes perfis epidemiológicos (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; ALVES e BEVILACQUA, 2004).

De todas as regiões brasileiras que já relataram a presença desta enfermidade, o maior número de casos tem sido observado no Nordeste (ALVES e FAUSTINO, 2005), com 89% de notificações, seguida do Sudeste (6%), Norte (4%) e Centro Oeste (1%) (MONTEIRO et al. 1994). Desde a década de 90, a região Nordeste é a que registra os maiores coeficientes de incidência da LVC (CAMARGO-NEVES, 2005).

Na região Norte, no Estado de Roraima, num inquérito realizado por Guerra et al. (2004), no período de 1989 a 1993, 10,4% dos cães apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* sp. através do teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Em se tratando da região Centro Oeste, no Estado do Mato Grosso a prevalência da infecção canina foi de 23,7% no município de Bonito e 23,6% no Planalto da Bodoquena (NUNES et al. 2001). Em Poxoréo (MT), a prevalência da infecção foi de 7,8% (AZEVEDO et al., 2004). Cortada et al. (2004) registraram a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* em 75,3% dos cães procedentes do município de Anastácio, Estado de Mato Grosso do Sul.

Na região Sudeste do Brasil, no Estado de São Paulo, Iverson et al. (1983) encontraram uma prevalência na população canina de 2,5%. No Estado do Rio de Janeiro, Coutinho et al. (1985) detectaram a prevalência de 4,3% da infecção canina, utilizando a RIFI e Cabrera et al. (2003) observaram que a soroprevalência da infecção canina em Barra de Guaratiba, área periurbana, situada no litoral da cidade do Rio de Janeiro foi de 25,0%. Em Minas Gerais, no município de Montes Claros, a prevalência verificada por França-Silva et al. (2003) foi de 5%.

Na região Sul do país, no Estado do Rio Grande do Sul, município de Santa Maria, Pocai et al. (1998) registraram a frequência de 2,46% em cães domiciliados.

No Nordeste, a maioria (66%) dos casos de LVA notificados ocorre nos Estados do Maranhão, Ceará, Bahia e Piauí (BRASIL, 2004). No Ceará, estudos revelam que a LVC, foi registrada em 1961 por Alencar et al. que observaram 8,2% dos cães infectados e Evans et al., em 1992 detectaram 39% dos cães do município de Itapipoca.

No Estado de Pernambuco, apesar de poucos relatos da frequência do calazar canino na Região Metropolitana da Cidade do Recife (RMR), até 2001, somente existiam estudos soropidemiológicos (LIMA JR et al. 2000) sem descrição de casos autóctones da doença em cães provenientes da Cidade do Recife. Todavia, no município de São Vicente Ferrer, localizado no Agreste, Microrregião do Médio Capibaribe do Estado, a prevalência da infecção canina variou de 4,8% a 33,3%, utilizando-se métodos sorológicos e moleculares respectivamente (CARVALHO et al. 2005).

No Estado de Alagoas, segundo Lima et al. (2003), a distribuição da LVC na cidade de Maceió não está restrita apenas às áreas litorâneas, encontrando-se atualmente em estudo o processo de urbanização. No Estado do Sergipe, a infecção

canina tem sido assinalada por Melo et al. (2004), na cidade de Aracaju, onde as taxas variaram entre 25% a 15,29% pelo ensaio imunoenzimático e RIFI, respectivamente. Segundo Tavares e Tavares (1999), a prevalência na década de 90 foi de 7,6%, constituindo-se uma grande expansão da doença, sem, contudo haver deslocamento dos focos anteriores da década de 70 (1,96%) e da década de 80 (3,37%). Na Bahia, em Jequié a frequência da infecção em cães por meio do ensaio imunoenzimático foi de 23,5% (PARANHOS-SILVA et al. 1996).

No Estado do Maranhão, incluído pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) como área prioritária para o controle da LVA, a infecção canina foi registrada nos municípios de São José de Ribamar (GUIMARÃES et al., 2005) e de Imperatriz (BRAGA et al., 2005) onde a prevalência encontrada foi de 23% e de 46,66% respectivamente.

Observando as pesquisas científicas atuais, pode-se afirmar que a prevalência da LVC no Brasil varia de 2,5 % a 46,6%, contudo as taxas de infecção podem variar de acordo com o perfil epidemiológico rural ou urbano, como também com o perfil de transmissão da doença e as condições socioeconômicas de cada região do País.

1.5 – Sinais Clínicos

A LVC é uma doença sistêmica severa causada pelo parasita do gênero *Leishmania* (BLAVIER et al., 2001) em alguns casos fatal, sendo considerada como doença imunomediada, devido às alterações na atividade das células T e B, o que provoca uma grande formação de imunocomplexos circulantes, que se depositam nas paredes dos vasos sanguíneos causando sinais clínicos como vasculite, uveíte, glomerulonefrite e artrite (GARCIA e ALONSO et al. 1996; NOLI, 1999). Segundo Marzochi et al. (1985), apenas uma parcela dos cães infectados desenvolve doença clínica, na dependência da competência imunológica (MORENO et al. 1999) desses animais.

Após a infecção, muitos cães apresentam doença crônica progressiva com exibição de inúmeros sinais clínicos, como alopecia, úlceras na pele, linfadenopatia, caquexia, (CIARAMELLA et al., 1997; TAFURI et al., 2001). Porém, pode ser extremamente frequente não apresentarem nenhum sinal clínico, considerado por pesquisadores, o período de infecção silenciosa (DONATIEN e LESTOQUARD, 1938).

Uma resposta imune celular protetora controla a infecção em alguns cães e em outros desenvolve uma doença lenta e progressiva (FERRER, 1999). Estes dois processos distintos dependem de fatores inerentes do parasito como a cepa e aqueles referentes ao hospedeiro vertebrado como a constituição genética, estado nutricional e imunitário (EZQUERRA, 2001).

De acordo com os sinais clínicos, os animais podem ser classificados em assintomáticos, oligossintomáticos ou sintomáticos (ABRANCHES et al., 1991; BRASIL, 2004), sendo que os assintomáticos representam importante papel como reservatório da doença (POZIO et al., 1981).

Entre as alterações dermatológicas mais comuns têm-se a alopecia local ou generalizada, lesões como dermatite esfoliativa e ulcerações crostosas em geral no focinho, orelhas e nas extremidades, descamação furfurácea (HOMMEL, 1987; ALVES e FAUSTINO, 2005) hiperqueratose (BRASIL, 2004; BONATES, 2003), ceratite intersticial, despigmentação cutânea e pelame seco (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997).

Deane e Deane (1955) e Deane (1956) em estudos da infecção canina, encontrou *Leishmania* na pele de 77,6% cães naturalmente infectados, mostrando que a presença do parasita na pele favorece a infecção do inseto vetor e, conseqüentemente a transmissão ao homem (DEANE, 1956; BRENER, 1957; BRENER e PELLEGRINO, 1958; ALENCAR, 1959; DEANE E DEANE, 1962; IVERSON et al., 1983; MARZOCHI et al., 1985). Os sinais cutâneos podem ser manifestações clínicas da infecção parasitária (CAMINOPETROS, 1934; DONATIEN e LESTOQUARD, 1935).

Os animais com LVC apresentam hepatoesplenomegalia, lesões da borda da orelha e focinho, acinesia e onicogribose (FEITOSA et al., 2000; BLAVIER et al., 2001). Segundo Hommel (1987) a perda de pelos tem sido explicada pela ação direta da *Leishmania* sobre o folículo piloso ou por um distúrbio de ácido pantotênico, decorrentes de graves lesões hepáticas ou ainda por deposição de imunocomplexos na membrana basal da pele, induzindo a uma reação auto-imune que desencadeia alopecia.

De acordo com Lestoquard e Donatien (1938), o alongamento anormal das unhas tem sido explicado pelo estímulo da matriz ungueal pelo próprio parasita. Porém, Marzochi et al. (1985) admite que a apatia do cão seja grandemente responsável pelo não desgaste natural das mesmas.

Dentre os sinais clínicos da LVC, as oftalmopatias vêm ocupando importante papel, onde o animal pode apresentar lesão uni ou bilateral (BRITO, 2004), ceratoconjuntivite (BRASIL, 2004), ceratoconjuntivite seca, ceratite ulcerativa e corioretinite (BRITO, 2004), blefarite, conjuntivite, ceratite, uveíte anterior e glaucoma secundário (FERRER, 1999).

Os pesquisadores da década de 20 e 30 se preocupassem com as lesões oculares, relatando que um sinal freqüente observado em cães era a ceratoqueratite intersticial simples ou dupla e a conjuntivite (DONATIEN e LESTOQUARD, 1929; FALCHETTI, 1932). Exame histopatológico do globo ocular demonstrou queratite com ulceração simples, com presença de leishmanias na esclerótica e córnea (FALCHETTI, 1932).

Nas fases mais adiantadas da doença observa-se com grande freqüência apatia, atrofia muscular particularmente da cabeça, coriza, linfadenopatia, onicogrifose, edema de patas (BRASIL, 2004), edema do focinho, problemas articulares como a poliartrite autoimune, polimiosite e lesões ósseas (DENEROLLE, 1996).

Outros sinais como linfadenomegalia, epistaxe, caquexia (FERRER et al., 1995), cardiopatias, disfunções respiratórias e digestivas, também têm sido assinaladas em animais com LVC, sendo a insuficiência renal, a principal causa de óbito (FERRER et al. 1995; RIBEIRO, 2005; BARROIUN-MELO et al, 2005). A existência de parasitismo pulmonar por *Leishmania* em cães naturalmente infectados foi evidenciado por Donatien e Lestoquard (1937), que relatam em alguns casos o parasitismo discreto ou muito elevado, dependendo do tempo da infecção.

1.6 – Diagnóstico da LVC

Uma ampla variedade de sinais sugestivos torna o diagnóstico clínico da LVC difícil e complexo, devido às suas características clínicas serem semelhante à de várias outras doenças (POZIO et al., 1981; MANCIANTI et al., 1995; GÁLLEGO, 2004), podendo os sinais clínicos ser inconstantes e equivocados (BALOZET, 1932).

O diagnóstico pode ser ainda mais difícil em área não endêmica ou onde a LVC é rara (BLAVIER et al., 2001). Segundo Ferrer (2002), mais de 50% dos animais se mostram assintomáticos ao exame clínico. Sendo assim, faz-se necessário o auxílio de outros métodos de diagnósticos, quer sejam parasitológicos, para detecção do parasita, quer sejam sorológicos, para a detecção de anticorpos anti-

Leishmania ou moleculares, para a amplificação do DNA do parasita, garantindo segura realização do diagnóstico (FERRER, 1999; MATHIS e DEPLAZES, 1995).

Sendo uma infecção generalizada das células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) da medula óssea, linfonodos, fígado, baço, pulmões, intestino e pele (DE LUNA et al., 1999) utilizam-se técnicas como sorodiagnósticos de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), fixação de complemento (FC) e aglutinação direta (DAT), para a detecção de anticorpos circulantes anti-*Leishmania*, principalmente IgG (NUSSENZWEIG et al., 1957; BRENER e PELLEGRINO, 1958; PARANHOS-SILVA et al., 1996; VERCAMMEN et al., 1997; BONATES, 2003; ROSÁRIO et al., 2005; ALMEIDA et al., 2005) e atualmente a citometria de fluxo (CF) para diagnóstico da LVC (CARVALHO NETA et al., 2006).

Alguns métodos são de fácil execução, enquanto outros requerem laboratórios bem equipados, como exemplo a realização do isolamento do agente em meio de cultura (ABRANCHES et al, 1991; GONTIJO e MELO, 2004; CARVALHO et al., 2005) mediante diluição do material aspirado de medula óssea, baço e fígado em solução salina e inoculação no meio Novy, Mc Neal e Nicolle (NNN) e Liver Infusion Triptofane (LIT) ou a inoculação intraperitoneal em animais de laboratório (SANTA-ROSA e OLIVEIRA, 1997; SANTOS-GOMES et al., 2000; BARROUIN-MELO et al., 2005).

Inoculações do parasita foram estudadas, desde de 1909 em diversos mamíferos, para que se pudesse conhecer, através das experiências, qual o vertebrado susceptível à doença (LAVERAN e PETIT, 1909), como também, as formas clínicas, histológicas e parasitológicas da doença (LAVERAN e HAVET, 1917) e a patologia, imunidade e tratamento (DONATIEN e LESTOQUARD, 1929).

O método parasitológico baseia-se na demonstração do parasita, a partir de material coletado proveniente de biópsia de medula óssea, raspados de pele, ou aspirados de baço e fígado (LIGNOS, 1916; BALOZET, 1932; CARVALHO-NETA, 2004; BARROUIN-MELO et al., 2005). Apesar de a presença de uma única forma amastigota ser confirmatória para o diagnóstico da LVC, esse método além de ser pouco sensível, é invasivo e traumático, requerendo técnico treinado para a realização do isolamento e leitura microscópica (SUNDAR e RAI, 2002).

Embora a grande variedade de testes já desenvolvidos, a RIFI, com sensibilidade de 90 a 100% e especificidade de 80%, ainda é o teste de eleição para

ser utilizado em inquéritos epidemiológicos por reunir uma série de vantagens como ser de fácil execução, rápido, barato e apresentar adequadas sensibilidade e especificidade, quando comparado com outras técnicas (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

Os métodos moleculares mais modernos possuem maior sensibilidade e especificidade, do que a RIFI e o ELISA (ROSYPAL et al, 2005), porém, não estão disponíveis para rotina clínica veterinária sendo apenas aplicados na pesquisa científica (IKONOMOPOLUS, 2003).

Dentre estes, o método que tem mostrado grande especificidade é o PCR, reação em cadeia de polimerase, na detecção do DNA da *Leishmania*, porém esta técnica é reservada para laboratórios especializados (MATHIS e DEPLAZES, 1995; ASHFORD et al., 1995; ROZE, 1995; LACHAUD et al., 2002; IKONOMOPOULOS et al., 2003).

1.7 – Epidemiologia da LVC

Epidemiologicamente destacam-se como reservatório da leishmaniose visceral canina, o chacal (*Canis aureus*), na Ásia Central (BANETH e JAFFE, 1999), nas cidades de norte e central de Israel e a raposa (*Vulpes vulpes*). O esquilo da terra na África, a raposa (*Lycalopex vetulus*), o lobo e o cão doméstico (*Canis familiaris*) na América do Sul (ALENCAR, 1959; PARANHOS-SILVA et al, 1996; MORENO e ALVAR, 2002), dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida (MILES, 1999).

No Brasil, Deane e Deane, em 1954 e 1955, já realizavam estudo sobre a infecção na espécie de raposa *Lycalopex vetulus* que foram encontradas infectadas por *L. chagasi* nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro Oeste e na região da Amazônia a espécie *Cerdocyon thous* (LAINSON et al., 1969; SILVEIRA et al., 1982; SILVA et al., 1999).

O Lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus*, chamado de Lobo Vermelho, que habita as regiões de cerrado do Brasil é considerado também reservatório. Os marsupiais *Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris* têm importância como reservatórios silvestres (TESH, 1995; TRAVI et al., 1998) e foram encontrados infectados pela *L. chagasi* no Brasil e na Colômbia (CABRERA et al., 2003; BRASIL, 2004).

Do ponto de vista epidemiológico, a enzootia canina tem precedido a

ocorrência de casos humanos e a infecção em cães, *Canis familiaris*, têm sido mais prevalentes do que no homem (BRENER, 1957; BRENER e PELLEGRINO, 1958; MOURA et al., 1999). Sendo assim, a espécie canina é a que apresenta maior importância epidemiológica, por ser considerada reservatório fora do ambiente silvestre (PARANHOS-SILVA et al., 1996; BRASIL, 2004) e por apresentar grande contingente de animais infectados com parasitismo cutâneo, sintomático ou assintomático (CABRAL et al., 1998) que serve como fonte de infecção para os insetos vetores (CUNHA, 1938; BRENER e PELLEGRINO, 1958).

Isto é de grande importância na manutenção do ciclo, em virtude de esses animais apresentarem uma maior quantidade de parasitas na pele, gerando dificuldades no controle da doença (CIARAMELLA et al., 1997; SANTA ROSA et al., 1997; BONATES, 2003).

Lemaire (1911) já relatava à necessidade de se observar a região onde ocorre um foco da doença, em relação aos animais susceptíveis, devido o cão manifestar sintomas mórbidos evidentes semelhantes a outras doenças.

No contexto da Saúde Pública, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem aumentado sua importância na última década, devido sua expansão geográfica, invadindo áreas antes livres da doença, de sua urbanização e reemergência em focos endêmicos antigos (GONTIJO e MELO, 2004).

Após duas décadas de tentativas de controle da Leishmaniose Visceral no Brasil, o número de casos tem aumentado nitidamente no país, tendo ocorrido inclusive, uma tendência de aumento das áreas de risco em praticamente todo o país, estando citadas entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (FUNASA, 2002).

Madeira et al. (2006), relatam que, epidemiologicamente, existe a necessidade de se realizar um diagnóstico diferencial nas lesões com identificação das espécies de *Leishmania*, principalmente, quando a região alberga as duas formas da doença, Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV), visto que a eutanásia em cães, indicada como controle pelo Ministério da Saúde, só é sugerida para LV.

1.8 – Imunologia da LVC

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) tem sido considerada como uma doença imunomediada, onde a presença da resposta humoral está associada à doença

clínica, enquanto que a resposta celular tem sido observada em animais assintomáticos (MORENO et al., 1999). Apesar da reconhecida importância em saúde pública, relativamente pouco se sabe sobre a resposta imunitária desenvolvida por cães infectados por *L. infantum/chagasi*. Os estudos efetuados em modelo experimental dão conta da ocorrência de hipergamaglobulinemia (ABRANCHES et al., 1991; SANTOS-GOMES et al., 2000, 2002), com presença de anticorpos específicos a partir de um mês e meio a três meses após infecção (DUBREUIL et al., 1990).

Segundo Marzochi et al. (1985), apenas uma parcela dos cães infectados desenvolve a doença clinicamente, na dependência da competência imunológica (MORENO et al. 1999) desses animais e em alguns cães uma resposta imune celular protetora controla a infecção, em outros uma doença lenta e progressiva se desenvolve (FERRER, 1999; LEANDRO et al, 2002). Estes dois processos distintos dependem de fatores inerentes ao parasita, como cepa e os fatores referentes aos hospedeiros vertebrados, como constituição genética, estado nutricional e imunitário (FERRER, 2002).

Desta forma a presença da resposta humoral estando associada à doença clínica e a resposta celular sendo observada em animais assintomáticos (MORENO et al. 1999; GUARGA et al., 2000) a resposta das células T pelo hospedeiro é decisiva para evolução da infecção (BIAZZONO, 2003).

Sendo assim, as células T auxiliar 1 (Th1) iniciam a imunidade celular e as células T auxiliar 2 (Th2) mediam a imunidade humoral onde uma resposta imune efetiva à infecção é regulada pelos efeitos dos linfócitos Th1 (PINELLI et al., 1994; BIAZZONO, 2003).

Estudos têm tentado descrever os níveis de IgG1 e IgG2 *Leishmania* específicos muitas vezes com resultados contraditórios. Deplazes et al. (1995) observaram que animais doentes apresentam níveis elevados de IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania*.

Leandro et al. (2002) verificaram que animais naturalmente infectados apresentavam níveis elevados de IgG2 e valores de IgG1 semelhantes aos animais saudáveis. De forma idêntica Solano-Gallego et al. (2001) obtiveram níveis elevados de IgG2 em cães sintomáticos, natural e experimentalmente infectados, enquanto que os níveis de IgG1 obtidos apresentaram elevada variabilidade.

A associação entre os níveis de IgG1 e IgG2 e a resposta imunitária tipo Th1 e

Th2 deve ser feita de forma cuidadosa, uma vez que a polarização da resposta imunitária (Th1, Th2) em cães ainda não é clara (BIAZZONO, 2003). Cães infectados assintomáticos apresentam uma resposta proliferativa específica, produção de IL-2, TNF e IFN- γ (CABRAL et al., 1998; PINELLI et al., 1994) e baixos títulos de anticorpos anti-*Leishmania*.

Animais com sintomatologia clínica apresentam uma diminuição da função dos linfócitos T, com expressão de IFN- γ e IL-2 reduzida e elevados títulos de anticorpos (SANTOS-GOMES et al., 2002).

1.9 - Medidas de prevenção da LVC

O Ministério da Saúde preconiza como medida de controle da LVA, três ações básicas: o diagnóstico e tratamento dos casos humanos; a detecção e eliminação dos cães infectados e reservatórios e controle de vetores pela redução de flebotomíneos (ALENCAR, 1961; WHO, 1990; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; SIDERIS et al., 1999; BRASIL, 2004; SILVA et al., 2005). A partir de 2003, as normas do Ministério da Saúde colocam as atividades de educação em saúde como uma das ações prioritárias no controle da LVC no País (BRASIL, 2004).

A eliminação dos animais quando soropositivos para *Leishmania chagasi*, tem apresentado resultados controversos, demonstrando que muitos aspectos relacionados ao papel do cão na epidemiologia da LVA ainda são desconhecidas (VERCAMMEN et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2005; SILVA et al., 2005).

Costa e Vieira (2001) propuseram mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil e relatam que o programa de eliminação de cães domésticos apresenta o menor suporte técnico-científico entre as três estratégias do programa de controle e identificaram vários pontos de fragilidade em relação à população canina.

Oliveira et al. (2005) recomendam a periódica validação do IFI, comparando-o com testes mais sensíveis ou a adoção do teste de ELISA na rotina diagnóstica da leishmaniose canina, vista à otimização das ações de controle e monitoramento da LVC em áreas de ocorrência endêmica.

Não existe tratamento comprovado que possibilite a cura dos animais e os que são utilizados têm ludibriado e reduzido os sinais clínicos, com um aumento de sobrevivência do animal, por isto buscam-se novas ferramentas para a proteção dos cães (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997). Vale a pena advertir que, a possibilidade de tratamentos sem caráter científico, administrados a estes cães pode selecionar cepas

resistentes (SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; ASHFORD, 1998) acarretando séria limitação de controle da doença, como o desenvolvimento de resistências às drogas (SIDERIS et al., 1999).

Uma alternativa de controle estratégico pode ser baseada na prevenção da doença em cães, possibilitando a redução do contato com os insetos vetores, através de colares inseticidas (KILLICK-KENDRICK et al., 1997) ou mesmo, o desenvolvimento de uma vacina eficiente e eficaz (TESH, 1995; MORENO e ALVAR, 2002; SANCHEZ et al., 2004).

Atualmente, está sendo testada uma vacina contra LVC, única no mundo, industrializada e utilizada em escala comercial, estando devidamente liberada e aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo demonstrado em trabalhos científicos um nível de proteção de 92 a 95% para cães vacinados (MENDES et al., 2003; GONTIJO e MELO, 2004).

Contudo, o Ministério da Saúde não autoriza a utilização desta vacina como medida de controle, nem recomenda o uso em campanhas de saúde pública, por entender que existem perguntas não respondidas sobre os efeitos do uso para controle da doença humana, tais como sua influência sobre a infectividade dos cães vacinados (MENDES, 2003).

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 13, p. 537-550, 1991.

ABRANCHES, P. et al. Calazar in Portugal. Epidemiological survey in Alijo (endemic region of Alto-Douro). **Revista Review Parasitology**, Oxford, v. 52, p. 121-124, 1993.

AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**: Rio de Janeiro, Fiocruz, 2003, p. 207–255.

ALENCAR, J.E.; CANTÍDIO, W.M.; CAVALCANTE, D.N. Calazar em Fortaleza. XIII. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENE, 13., 1956, Fortaleza. **Anais...**

Fortaleza: 1956.

ALENCAR, J. E. **Calazar canino: contribuição para o estudo da epidemiologia no Brasil**. Tese: Universidade Federal do Ceará. Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil. 1959. 342 p.

ALENCAR, J.E. Profilaxia do Calazar no Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 3, n. 4, p. 175-180, 1961.

ALEXANDRINO, A.C. **Diagnóstico e Controle da Leishmaniose Visceral - considerações sobre Pernambuco**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

ALMEIDA, M.A.O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, p. 227-232, 2005.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. **Leishmaniose visceral canina** Manual da Schering-Plough, São Paulo, 2005. 14 p.

ALVES, A. L. et al. Epidemiological survey of visceral leishmaniasis in errant dogs of Fortaleza city, Ceará. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.8, n.2, p. 63-67, 1998.

ARIAS, J. R.; MONTEIRO P. S.; ZICKER, F. The Reemergence of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 2, n. 2, p. 145-146, 1996.

ASHFORD, D.A. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 53, p. 251-255, 1995.

ASHFORD, D.A. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 53-57, 1998.

ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; RAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 8, p. 104-105, 1992.

AZEVEDO, M.A.A., DIAS, A.K.K., PAULA, H.B. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral canina em Poxóreo, MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 1., Ouro Preto. **Anais...** Revista Brasileira de Parasitologia, v. 13, p. 234, 2004. Suplemento 1.

BADARO, R.; BENSON, D.; EULALIO, M.C. A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v.173, p.758-761, 1996.

BALOZET, L. Les prélèvements pour la recherche des leishmanies: technique de la ponction de la rate chez le chien. **Archives de L'Institut Pasteur de Tunis**, Tunísia, v. 21, n. 2, p. 341, 346, 1932.

BANETH, G.; JAFFE, C. Canine visceral leishmaniasis in Israel: an overview of an emerging disease with reference to wild canids and human infection. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, **Proceedings...** Hoechst Roussel Veterinary, 1999, p. 40-44.

BARROUIN-MELO, S. M. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal**, London, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2005.

BIAZZONO, L. **Avaliação da reação de hipersensibilidade tardia à *Leishmania* e das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 em cães de região endêmica para Leishmaniose Visceral.** 2003. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) Universidade de São Paulo, São Paulo. 102 p.

BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 162, p. 108-120, 2001.

BONATES, A. Leishmaniosis visceral (calazar) **Veterinary News**, London/New York, ano 10, n. 61, p. 4-5, 2003.

BRAGA, G. M. S. et al. Frequência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães do município de Imperatriz, região Sudoeste do Maranhão, Brasil. In: SIMPÓSIO DE PÓS - GRADUAÇÃO, 4., 2005, Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília, DF, 2004, 120 p.

BRAZIL, R. C.; BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro, Fiocruz, 2003. p. 257-274.

BRENER, Z. **Calazar canino em Minas Gerais.** Belo Horizonte: Universidade de Minas Gerais, Tese (Faculdade de Medicina), 1957. Belo Horizonte. 90 p.

BRENER, Z.; PELLEGRINO, J. Reações imunológicas cruzadas em cães com Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Belo Horizonte, p. 45-49, 1958.

BRITO C. et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Genes**, Amsterdam, v. 22, p. 107-117. 1998.

BRITO, F. L. C. **Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (*Canis familiaris* Linnaes, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania chagasi*** (Cunha

& Chagas, 1937). 2004. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CABRAL, M. et al. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, New York, v. 76, p.173-189, 1998.

CABRERA, M. A. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of some risk factors. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. Leishmaniose Visceral Americana: doença emergente no estado de São Paulo. 2005. Disponível em: <<http://www.comciencia.br>>. Acesso em: 17 maio 2006.

CAMINOPETROS, J. Lésions cutanées du chien... **Bulletin de la Société de Pathologie exotique**, Paris, v. 27, n. 5, p. 527-534, 1934.

CARDOSO L. et al. Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal) **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 121, p. 21-32, 2004.

CARVALHO, M.R. et al. Isolamento e identificação de *Leishmania (L.) chagasi* em cães endêmica para Leishmaniose visceral na zona da mata norte de Pernambuco, Brasil. In: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇAS DE CHAGAS E LEISHMANIOSES, 21., 2005, Uberaba. **Anais...** Uberaba, 2005.

CARVALHO-NETA, A.V.C. **Estabelecimento de uma nova metodologia aplicada ao diagnóstico da LVC baseada na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania (L.) chagasi* por citometria de fluxo.** 2004. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

CARVALHO NETA, A. V. et al. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo

Horizonte, v. 58, n. 4, p. 480-488, 2006.

CHAGAS, E. Leishmaniose Visceral Americana (nova entidade mórbida do homem na América do Sul). Nota Prévia (A). **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 145–147, 1937.

CHAGAS, E. et al. Leishmaniose Visceral Americana. Relatório dos trabalhos da comissão encarregada dos estudos da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 321-385, 1937.

CHAGAS, E. et al. Leishmaniose Visceral Americana. Relatório dos trabalhos da comissão encarregada dos estudos da leishmaniose visceral Americana em 1937. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 89-229, 1938.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, London, v. 141, n. 21, p.539-543, 1997.

CORTADA, V. M. C. L. et al. Canine visceral leishmaniosis in Anastasio, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 28, p. 364-374, 2004.

COSTA, C. H. N. et al. Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis? **Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, n. 93, p. 469, 1999.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n.2, 2001.

COUTINHO, S. G. et al. A survey for cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro where the human disease occurs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, p.17-22, 1985.

COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, p. 149-155, 2005.

CUNHA, A. M. Infecção da pelle na leishmaniose visceral experimental do cão. **Brasil-Médico: Revista Semanal Medicina e Cirurgia**, Rio de Janeiro, n. 48, p. 1071-1072, 1938.

DAVIDSON, R.N. Canine leishmaniasis: an update. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, Hoechst Roussel Veterinary, 1999. p. 72-77.

DEANE, L. M. **Leishmaniose Visceral no Brasil**: estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: SNES, 1956. 162 p.

DEANE, M. P.; DEANE, L. M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 46, p. 651-653, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 46, p. 61-76, 1955.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 75-87, 1955.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brasil. Geographical distribution **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 4, p. 149-212, 1962.

DE LUNA, R. et al. Early suppression of lymphoproliferative response in dog with natural infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 70, p. 95-103, 1999.

DENEROLLE, P.H. Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). **Pratique Médicale Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, Paris, v. 31, p. 137-145, 1996.

DEPLAZES, P. et al., Specific IgG1 and IgG2 antibody response of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology**, Amsterdam, v. 17, p. 451-458. 1995.

DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P. Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. In: CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p.18-25.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. La leishmaniose viscerale du Chien. **Revue Vétérinaire et Journal de Médecine Vétérinaire**, Paris, n. 81, p. 117-135, 1929.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Notes sur la leishmaniose viscerale canine. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, n. 28, p. 426-431, 1935.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Le parasitisme du poumon dans la leishmaniose générale du chien. **Bulletin de Société de Pathologie Exotique**, Paris, n. 30, p. 28-31, 1937.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Remarques sur l'évolution de la leishmaniose générale du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, n. 31, p. 214-217, 1938.

DUBREUIL, N., et al., Experimental canine leishmaniasis : A clinical and immunological study. **Bulletin de la Société Française de Parasitology**, Paris, v. 8, p. 522, 1990. Suplemento 1.

EVANS, T. G. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.166, p.1124-32, 1992.

EZQUERRA, J. A. **Las Leishmaniasis: de la biología al control**. 2 ed. Madrid: Laboratorio Sutervet S/A, p.236, 2001.

FALCHETTI, E. Observations sur la localisation cutanée des Leishmania chez les chiens dans le Midi de la France. **Bulletin de la Société Française de Parasitology**, Paris, v. 25, p. 1036-1039, 1932.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A; LUVIZOTTO, M. C. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 28, p. 36-42, 2000.

FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, London, v. 136, n. 20, p.514-516, 1995.

FERRER, L. Clinical aspects of canine Leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 6-10.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, **Proceedings...** Sevilla, 2002. p. 07-14.

FISA, R. et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 83, p. 87-97, 1999.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2/3, p. 161-173, 2003.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al., Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, p. 213-220, 2005.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE – FUNASA. Guia brasileiro de vigilância epidemiológica, 2002. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/>> Acesso: 13 jan. 2006.

GALATI, E. A. B. et al. Estudo de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, p. 378-390, 1997.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro, Fiocruz, 2003. p. 23-52.

GÁLLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: lãs leishmaniosis. **Revista Science Technique Office Int Epizootia**, v. 23, n. 2, p. 661-676, 2004.

GARCÍA-ALONSO, et al Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, New York, v. 18, p. 617-623, 1996.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n. 3 p. 338-349, 2004.

GUARGA, J. L. et al. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Research in Veterinary Science**, London, v. 69, p. 249-253, 2000.

GUERRA, J.A.O. et al. Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Roraima, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1989 to 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p. 305-311, 2004.

GUIMARÃES, K. S. et al..Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, p. 305-309, 2005.

HOMMEL, M. The genus *Leishmania*: Biology of the parasites and clinical aspects. **Bulletin Institut Pasteur**, Paris, p. 61-66, 1987.

IKEDA, F. A. et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: Um estudo retrospectivo de 191 casos. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 8, n. 47, p. 42-8, 2003.

IKONOMOPOLUS, J. et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.113, p. 99-113, 2003.

IVERSON L. B. et al. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana do município de São Paulo, Brasil (1979-1982). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 310-317, 1983.

JAMBOU, D. et al. Preliminary serologic study on canine leishmaniasis in the Alpes-maritimes. Department, France. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, n. 80, p. 583-587, 1986.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, Paris, v. 9, p. 37-42. 1990. Suplemento 1.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical Veterinary Entomology**, v. 11, n. 2, p. 105-111, 1997.

LACHAUD, L. et al. value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, United Kingdom, v. 125, p. 197-207, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, Z. C. Leishmaniasis in Brazil: The fox *Cerdocyon thous* (L.) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para state, Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, n. 63,

p. 741-745, 1969.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Las leishmanias y la leishmaniasis del Nuevo mundo, con particular referencia al Brasil. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 76, n. 2, p. 93-114, 1974.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, p. 811-827, 2005.

LAVERAN, A.; PETIT, A. Infections expérimentales légères ou latentes du singe et du chien par le kala-azar tunisien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 2, n. 10, p. 584-587, 1909.

LAVERAN, A.; PETIT, A. Contribution à l'étude de la leishmaniose viscérale naturelle du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 10, n. 5, p. 386-392, 1917.

LEANDRO, C. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 79, p. 273-284, 2002.

LEMAIRE, G. Premiers cas de Leishmaniose algérienne. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 4, n. 11, p. 554-563, 1911.

LESTOQUARD, F.; DONATIEN, A. Parasitisme de la matrice ungueale dans la leishmaniose générale du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 31, p. 483-487, 1938.

LEVINE, N.D. et al. A newly revised classification of the PROTOZOA. **Journal of Protozoology**, México, v. 27, p. 37-58, 1980.

LIMA, J. W. O.; FIUZA, I. R.; BRANCO, J. F. D. Correlação entre prevalência do calazar no cão e incidência no homem, em áreas endêmicas no estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1,

p. 146-7, 1996.

LIMA, F.S. et al. Estudo da Distribuição da Leishmaniose Visceral Canina nos Distritos Sanitários de Maceió. JORNADA CIENTÍFICA 1., Universidade Federal de Alagoas. **Annais...** Maceio, 2003.

LIMA-JUNIOR, A. D. et al. A survey of canine leishmaniasis in the city of Recife, Northeastern Brazil. In: AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY PARASITOLOGISTS, 45., 2000, Salt Lake City. **Proceedings...** Salt Lake City, 2000. p. 32.

LIGNOS, A. L'infection par *Leishmania* des chiens de l'île d'Hydra. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 6, n. 2, p. 117, 1916.

MADEIRA, M. F. et al. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brasil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 138, p. 366-370, 2006.

MANCIANTI, F. et al. Comparison between an ELISA using a detergent soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 59, p. 13-21, 1995.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 349-357, 1985.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, US, v. 33, n. 5, p. 1145-1149, 1995.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MELO, C.B. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães em Aracaju,

Sergipe. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13., SIMPÓSIO LATINO DE RICKETTSIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004.

MELO, M. N., Leishmaniose Visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, p. 41-45, 2004. Suplemento I.

MENDES, C. O. et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. **Vaccine**, v. 21, p. 2589-2597, 2003.

MILES, M.A. et al. Canine leishmaniasis in Latin América: control strategies for visceral leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: p. 46-53, 1999.

MONTEIRO, P.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J. R. Controle da Leishmaniose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 27, p.67-72, 1994.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v.71, n.3/4, p.181-195, 1999.

MORENO, E. C. et al. Risk factors for *Leishmania chagasi* infection in an urban area of Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 6, p. 456-463. 2005.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.

MOURA, S. T. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis in the urban área of the District of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 2, 1999.

NASCIMENTO, M.D.S.B. et al. The epidemiological determinant aspects in the maintenance of visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 3, p. 233-240, 1996.

NOLI, C. La leishmaniosis del cane. **Waltham Focus**, London, v. 9, n. 2, p.16-24, 1999.

NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral nos arredores de Fortaleza, Estado do Ceará. Observações sobre o diagnóstico e epidemiologia da doença. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 52, p. 47-69, 1957.

NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; NUNES, D.B. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, 2001.

OLIVEIRA, L. S. et al. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 41-47, 2005.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 1, p. 39 – 44, 1996.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, US, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

POCAI, E. A. et al. Visceral Leishmaniasis (kala-azar). Five cases in dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul, South Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.

POZIO, E. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Tropical**, Basel, v. 38, p. 383-393, 1981.

RANGEL, E. ; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro:Fiocruz, 2003. 368 p.

REBÊLO, J. M. M.; LEONARDO, F. S.; COSTA, J. M. L. Sandflies (Diptera, Psychodidae) from an endemic leishmaniasis area in the cerrado region of the State of Maranhão, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.15, n.3, p.623-630, 1999.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose Visceral Canina: Nossos cães devem morrer? **Cães & Gatos**, São Paulo, p. 66-70, 2005.

ROZE, M. Polymerase chain reaction: a revolution in diagnosis of ocular leishmaniosis? **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 17, p. 47-48, 1995.

ROSYPAL, A.C. et al. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania (infantum) infantum*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, US, v. 43, n. 11, p. 5515-9, 2005.

ROSARIO, E. Y. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

SANCHEZ, M. A. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: análise of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, n. 6, p. 618-624, 2004.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 2, n. 11, p. 24-28,

1997.

SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, p. 315-317, 1998.

SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 2, p. 193-198, 2000.

SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 88, p. 21-30, 2002.

SHERLOCK, I. A.; SHERLOCK, V.A. Criação e biologia em laboratório, do “*Phlebotomus longipalpis*” Lutz & Neiva, 1912 (Diptera Psychodidae). **Revista Brasileira Biologia**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 229-250, 1959.

SHERLOCK, I. A. A importância dos flebotomíneos. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro, Fiocruz, 2003. p. 15 – 21.

SHERLOCK, I. A.; DIAS-LIMA, A. A importância dos ectoparasitas do cão para o controle da Leishmaniose Visceral Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 205, 2004. Suplemento I.

SIDERIS, V. et al. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens, Greece. **European Journal of Epidemiology**, v. 15, p. 271-276, 1999.

SILVA, A.R. et al. Leishmaniose visceral na ilha de São Luís–MA, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 359-368, 1997.

SILVA, et al. *Cerdocyon thous* (Carnívora: Canidae) naturally infected with *Leishmania (leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in the state of Minas Gerais, southeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.

32 p. 125-126, 1999. Suplemento

SILVA, A. V. M. et al. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

SILVA, O. A. et al. La leishmaniose viscérale canine dans le Nord-est du Brésil: aspects épidémiologiques. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, n. 2924, 2006.

SILVEIRA, F. T. et al. Leishmaniasis in Brazil: Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of Amazonian Visceral Leishmaniasis. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, n. 76, p. 830-832, 1982.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Díptera:Psychodidae: Phlebotominae). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 75, n. 3, p.301–330, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, US, v. 39, n. 2, p. 560–563, 2001.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. Washington, US, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAVARES, L. M. S. A.; TAVARES, E. D. Incidência, distribuição geográfica e aspectos ambientais das áreas endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. **Informe Epidemiológico do SUS**, 1999. p. 47-52.

TAFURI, W. L. et al. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 96, p.203-212, 2001.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 52, p. 287-292, 1995.

THOMÉ, S. M. G. Cuidado com as leishmanioses: zoonoses em expansão que requerem atenção dos médicos veterinários... **Cães e Gatos**, São Paulo, n. 85, p. 46-50, 1999.

TRAVI, B. L. et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected opossum (*Didelphis marsupialis*), reservoir of New World of visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 88, p. 73-75, 1998.

VERCAMMEN, F. et al. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. **The Veterinary Record**, p. 328-330, 1997.

WINCKER, P. et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 24, p.1688-1694, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 77, n. 44, p 365-372, 2002.

2. OBJETIVOS

2.1 – GERAL

Estudar aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos de cães (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) com infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi*

(CUNHA & CHAGAS, 1937) provenientes do Município de Imperatriz, Região Sudoeste do Maranhão, Brasil.

2.2 – ESPECÍFICOS

Verificar a prevalência da infecção natural nos cães provenientes do município de Imperatriz, região Sudoeste do Estado de Maranhão, Brasil.

Avaliar os níveis de produção de anticorpos anti-*Leishmania* IgG1 e IgG2 em população de cães de uma área endêmica do Estado do Maranhão, Brasil;

Relatar os sinais clínicos de cães com diagnóstico sorológico positivo para LVC, no município de Imperatriz, região Sudoeste do Estado do Maranhão, Brasil.

Identificar os agentes fúngicos e bacterianos em uma colônia a nível laboratorial de *Lutzomyia longipalpis* população Imperatriz.

CAPÍTULO I

**PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES
(*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) COM INFECÇÃO NATURAL
POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)
PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ, REGIÃO
SUDOESTE DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

**PREVALÊNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES
(*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) COM INFECÇÃO NATURAL
POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937)
PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ, REGIÃO
SUDOESTE DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença zoonótica global que pode infectar o homem e uma larga escala de animais domésticos e selvagens. Geralmente, o cão doméstico é o reservatório principal para a transmissão deste patógeno aos seres humanos, especialmente em áreas urbanas. Entretanto, poucos estudos foram realizados nos cães em áreas endêmicas. O objetivo desta pesquisa foi verificar a prevalência da infecção natural nos cães provenientes do município de Imperatriz, região Sudoeste do Estado de Maranhão, Brasil, através da frequência de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*. Os resultados mostraram que 46,66% (196/420) eram positivos ao teste sorológico. Não se encontraram associações estatísticas ($p > 0,05$) na análise dos resultados positivos no teste sorológico com relação ao sexo dos animais. Entretanto, associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi observada entre a positividade do cão e a idade. O município de Imperatriz, região Sudoeste do Estado de Maranhão, Brasil apresenta alta prevalência de cães sororreagentes, principalmente na faixa etária compreendida entre dois a quatro anos.

Palavras Chave: Diagnóstico Sorológico; Infecção Natural; Prevalência.

PREVALENCE OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN DOGS (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758) WITH NATURAL INFECTION FOR *Leishmania (Leishmania) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937) PROCEEDING FROM THE IMPERATRIZ COUNTY

SOUTHWESTERN REGION OF THE MARANHÃO STATE, BRAZIL

ABSTRACT

Leishmaniasis is a worldwide zoonotic disease which can infect man and a wide range of domestic and wild animals. Usually the domestic dog is the reservoir required for the transmission of this pathogen to humans, especially in urban areas. However few studies in dogs were conducted in endemic areas. The goal of this research was to verify the prevalence of the natural infection in dogs proceeding from Imperatriz County, Soutwestern region of the Maranhao State, Brazil, through of the anti-*Leishmania chagasi* antibody frequence. A total of 420 sera samples from domiciliated dogs were collected and analyzed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed 46.66% (196/420) were positive to serological test. It have not found differences stastically ($p>0.05$) on the analysis of positive results at serological test in relation to sex of animals. However stastically significant difference ($p<0.05$) between the dog positivity and age were observed. The Imperatriz county, Soutwestern region of the Maranhão State, Brazil present prevalence loud of dogs with serum reagents, principally in age group among two the four years.

Key-Words: Serological Test; Natural Infection; Prevalence.

3.1 – INTRODUÇÃO

No Brasil, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) ou calazar canino é uma

enfermidade parasitária causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* (FRANÇA-SILVA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2005; ROSÁRIO et al., 2005) que na dependência da resposta imunológica (ABRANCHES et al., 1991; PINELLI et al., 1994; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; NOLI, 1999; SANTOS-GOMES et al., 2002) pode apresentar-se sob a forma aguda ou crônica, podendo levar os animais ao óbito (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER et al., 1999; DE LUNA et al., 1999; BRASIL, 2004; ALMEIDA et al., 2005).

A transmissão da LVC encontra-se associada à ocorrência dos insetos vetores da família Phlebotominae, do gênero *Lutzomyia* (GALATI et al, 1997, 2003; SANTOS et al., 1998) que se distribui de maneira não uniforme em todo território nacional (BRAZIL, 2003; MELO, 2004).

Até o momento, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença nas áreas endêmicas, *Lutzomyia longipalpis* (THOMÉ, 1999) e *Lutzomyia cruzi* (GALATI, 2003; SANTOS et al., 1998) sendo a primeira considerada a espécie vetora e a segunda vem sendo responsável pela transmissão da doença no Estado do Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2004; FRANÇA-SILVA et al., 2003).

A frequência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em cães tem sido investigada através de estudos sorológicos em vários estados da federação (ALVES e BEVILACQUA, 2004; ALVES e FAUSTINO, 2005),

No Estado do Rio Grande do Sul, município de Santa Maria, Pocai et al. (1998) registraram a frequência de 2,46% em cães domiciliados.

Na região Centro Oeste do país, o calazar canino tem sido reportado na região do Patanal, desde o início da década de 80, nos municípios de Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul (NUNES et al., 1988). Recentemente, Nunes et al. (2001) observaram a frequência de 23,6% de cães sororreagentes, no Planalto da Bodoquena e Cortada et al. (2004) registraram a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* em 75,3% dos cães procedentes do município de Anastácio, Estado de Mato Grosso do Sul. Em Poxoréo (MT), a prevalência da infecção variou de 7,8% (AZEVEDO et al., 2004) a 23,7% no município de Bonito (NUNES et al., 2001).

Vários são os relatos envolvendo a LVC na região sudeste do Brasil. Savani Mouriz et al. (2003) monitorando área não endêmica para a LVC, no Estado de São Paulo detectaram 0,57% de cães reagentes à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em diversos municípios do referido estado. No Estado do Rio de Janeiro, Cabrera et al. (2003) observaram a prevalência de 29% a 25% pela técnica de RIFI

para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania chagasi*, em cães procedentes da Barra de Guaratiba, utilizando como ponto de corte (*cut off*) da reação 1/40 e 1/80 respectivamente.

Na Região Metropolitana de Belo Horizonte, Silva et al. (2001) relataram a frequência de 64% dos animais positivos à RIFI destacando que a maioria dos animais não apresentava sinais clínicos sugestivos da doença. Por outro lado, França-Silva et al. (2003) reportaram a prevalência de 9,7% no município de Montes Claros, região nordeste do Estado de Minas Gerais.

No Nordeste brasileiro a evolução da endemia canina vem sendo estudada desde a década de 50 (DEANE e DEANE, 1955; ALENCAR et al., 1956; DEANE, 1956; ALENCAR, 1959; ALENCAR et al., 1961). No Estado da Bahia, a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* na população de cães provenientes do município de Jequié, através do ensaio imunoenzimático foi de 23,5% (PARANHOS-SILVA et al., 1996).

No Estado de Pernambuco, até 2001, somente existiam estudos soroepidemiológicos (LIMA JR et al., 2000) sem descrição de casos autóctones da doença em cães provenientes da Região Metropolitana da Cidade do Recife (RMR), contudo, Albuquerque (2006) descreveu que 88,23% dos animais atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE, com suspeita clínica para LVC possuíam anticorpos anti-*Leishmania*. Ainda, no município de São Vicente Ferrer, localizado na Mesorregião do Agreste de Pernambuco, a prevalência da infecção canina variou de 4,8% a 33,3%, utilizando-se métodos sorológicos e moleculares respectivamente (CARVALHO et al., 2005).

No Estado do Ceará, estudos sobre a distribuição da LVC revelaram a evolução da endemia, quando a frequência da infecção canina reportada por Alencar et al., em 1961, ressaltaram 8,2% dos cães infectados e Evans et al., em 1992, detectaram 39% de cães nos municípios de Fortaleza e Itapipoca respectivamente. Todavia, Alves et al., em 1998 examinaram através do RIFI, 881 cães errantes na cidade de Fortaleza, onde apenas 14 animais (1,59%) apresentavam sorologia positiva.

No Estado do Maranhão, a infecção canina foi registrada no município de São José de Ribamar (GUIMARÃES et al., 2005) onde foi encontrada a prevalência de 21% de cães sororreagentes.

Na região Sudoeste do Maranhão o número de casos caninos vem

aumentando progressivamente desde 1997 (SOUSA, 1998) e a análise epidemiológica da região tem evidenciado que o desmatamento contribuiu muito para o avanço da LVC.

Apesar de o município de Imperatriz estar inserido nas ações prioritárias do controle da Leishmaniose Visceral Americana (BRASIL, 2004), existem poucos dados sobre esta enfermidade na população canina do referido município. Objetivou-se através da frequência de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* verificar a prevalência da infecção natural dos cães provenientes do município de Imperatriz, região Sudoeste do Estado de Maranhão, Brasil.

3.2 – MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Área estudada

O Município de Imperatriz (Latitude 5° 31' 35'' Sul e longitude 47° 29' 30'' Oeste) encontra-se a 640 quilômetros da capital do Estado do Maranhão, São Luís e se localiza à margem de uma das principais rodovias do País, a BR 010, e do outro lado, à margem de uma das mais importantes vias fluviais do Centro Oeste Meio Norte, o Rio Tocantins. Sua população rural é de 11.895 habitantes e sua população urbana é de 218.555 habitantes. A área total da região é de 27.157,30 km² e a área do município é de 1.538,1 km² (IBGE, 2005).

Figura 1 Mapa do Brasil, destacando o Estado do Maranhão, mostrando a localização de Imperatriz na Amazônia Maranhense (Fonte: Rebêlo, 1999)

Localizada em uma região conhecida como Portal da Amazônia, possui um clima tropical quente e úmido, com uma umidade em torno de 82%, temperatura anual média de 32°C e 1.660 mm anuais de média pluviométrica. Atualmente apresenta sua cobertura vegetal, consideravelmente modificada devido a diversas ações antrópicas. Grande parte dessa vegetação, principalmente ao que se refere à periferia da cidade, se encontra devastada (SEMAM, 2005).

3.2.2 Animais

Atualmente a população canina do município, segundo o CCZ é de aproximadamente 15.700 cães. Foram utilizados para este estudo, cerca de 420 cães de ambos os sexos, raças e idades variadas, residentes no Município de Imperatriz, região Sudoeste do Estado do Maranhão, Brasil. O cálculo da amostra foi realizado de acordo com o Centro Panamericano de Zoonosis (1973).

3.2.3 Identificação e avaliação dos animais

Para cada animal, foi confeccionada uma ficha de identificação individual, com dados referentes ao estado geral, raça, sexo, idade, porte e condição clínica do mesmo, a sua procedência e algumas informações acerca do proprietário do animal (Apêndice).

Uma declaração de autorização elaborada pelo Centro de Controle de Zoonoses do município (CCZ) foi utilizada, para que os proprietários dos cães, deste estudo, consentissem o acesso ao animal e recolhimento do mesmo, caso fosse necessário (Anexo A).

O exame físico constou principalmente da inspeção da pele e fâneros, além da palpação abdominal e dos gânglios linfáticos, em que se observou a existência ou não de sinais sugestivos de Leishmaniose Visceral Canina, de acordo com Ferrer et al. (1999).

3.2.4 Obtenção do plasma para exame sorológico

De todos os animais utilizados foram colhidos aproximadamente 10 mililitros (ml) de sangue, através da venopunção da cefálica, com seringa e agulha, sendo transferido imediatamente para tubos de ensaio estéreis, contendo EDTA a 10% para obtenção do plasma, o qual foi centrifugado no Centro de Controle de Zoonoses municipal e transportado para o Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3.2.5 Teste sorológico - ELISA

O teste de ELISA (ensaio imunoenzimático) foi realizado no Laboratório de

Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do CPqAm/FIOCRUZ.

Utilizou-se o Kit EIE-Leishmaniose Canina, que emprega um peptídeo recombinante e o protocolo efetivado foi de acordo com as instruções do fabricante, efetuando-se a leitura em espectrofotômetro a 490 nanômetros. O ponto de corte (*cut off*) foi determinado por placa utilizada, através da média aritmética das densidades ópticas (D.Os) de pelo menos cinco testes não reagentes, somada a dois desvios padrões.

3.2.6 Análise estatística

Realizou-se análise estatística descritiva por meio de distribuições absolutas e relativas, utilizando-se o teste Qui-quadrado de independência. Considerou-se para a decisão dos testes estatísticos, o nível de significância de 5%. O programa utilizado para a obtenção da análise estatística foi o EpiInfo versão 6.02 (DEAN et al., 1990).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 observa-se que 46,66% dos animais estudados foram reagentes ao teste de ELISA, no município de Imperatriz, região Sudoeste do Maranhão, Brasil.

Tabela 1 Frequência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães do Município de Imperatriz na região Sudoeste do Estado do Maranhão, Brasil, 2005

RESULTADO	FREQUENCIA ABSOLUTA	FREQUENCIA RELATIVA (%)
POSITIVO	196	46,66
NEGATIVO	224	53,34
TOTAL	420	100,00

Esses resultados são superiores àqueles encontrados por Pocai et al. (1998), que detectaram 2,46% na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. Também, por Nunes et al. (1998), numa região do Mato Grosso, Planalto da Bodoquena que registraram 23,6%; Azevedo et al. (2004) no município de Poxoréo encontraram 7,8% e Nunes et al. (2001) que encontraram 23,7% no município de

Bonito. No Estado de São Paulo, Savani Mouriz et al. (2003) encontraram 0,57% de cães reagentes e Iverson et al. (1983) descreveram 2,5%, sendo resultado inferior também observado por Cabrera et al. (2003), com prevalência variando de 25% a 29% em cães da Barra de Guaratiba (RJ); França-Silva et al. (2003) que determinaram 9,7% no município de Montes Claros (MG) e Paranhos-Silva et al. (1996) em cães provenientes do município de Jequié, na Bahia, encontrando 23,5% de sororreagentes.

Alves et al. (1998), através de uma primeira investigação sorológica em cães errantes, na cidade de Fortaleza no Estado do Ceará registraram 1,59% de infecção canina e no Estado do Maranhão, Guimarães et al. (2005), no município de São José de Ribamar, registraram em cães uma prevalência de 21%.

Por outro lado, os resultados aqui encontrados foram inferiores aos observados por Cortada et al. (2004) em Mato Grosso que registraram 75,3% no município de Anastácio; Moura et al. (1999) que detectaram uma frequência de 64,5% na cidade de Cuiabá (MT); Albuquerque (2005) que constatou a presença de anticorpos circulantes em 88,23% dos animais atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE com suspeita clínica para LVC, na cidade do Recife, Pernambuco.

Embora o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) seja o teste sorológico mais amplamente utilizado na rotina laboratorial para LVC, reações cruzadas com outras parasitoses, tornam-no limitado (MANCIANTI et al., 1995), enquanto que o ensaio imunoenzimático (ELISA) se mostra, pelo menos tão sensível e específico quanto o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e de fácil execução (GONTIJO e MELO, 2004) sendo adequado tanto para inquéritos sorológicos quanto ao diagnóstico da LVC (ASHFORD, 1993; MANCIANTI et al., 1995).

A diferença nas frequências observadas pode ser explicada devido à endemicidade do local de estudo, da cepa de *Leishmania* sp, da resposta imune do hospedeiro vertebrado, além da natureza dos antígenos utilizados e do teste diagnóstico utilizado.

Com relação à frequência de animais sororreagentes e o sexo, não foi observada associação estatisticamente significativa, a qual, no entanto foi observada quando se avaliou a variável positividade ao teste ELISA com relação à faixa etária ($p < 0,05$), sendo mais elevada entre dois a quatro anos (Tabela 2).

Tabela 2 Prevalência de cães sororreagentes para *Leishmania (L.) chagasi* segundo faixa etária no Município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005

<i>Leishmania (L.) chagasi</i>								
	Positi	vo Negati			vo Tot		F.A.	F.R
		F.A.	F.R	.(%)	F.A.	F.R		
<i>L.) chagas</i>	Br	asil,	200	5	<i>L</i>	<i>eishma</i>		
al	<i>i</i>	ntes	P	ositi	vo N	egativ		
	age		par	a <i>Lei</i>	<i>shma</i>	<i>nia (L</i>		

chagasi segundo faixa etária no Município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005 *Leishm*

a

nia (L.) chagasi **Positivo Negativo Total**

hmania (L.) chagasi segundo faixa etária no Município de Imperatriz, Maranhão, Bra

sil, 2005 *Leishmania (L.) chagasi* **Positivo Negativo Total**

ntes para *Leishmania (L.) chagasi* segundo faixa

etária no Município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005 *Leishmania*

(L.) chagasi **Positivo Negativo Total**

L.) chagasi segundo faixa etária no Município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005

Leishmania (L.) chagasi **Positivo Negativo Total**

ishmania (L.) chagas

i segundo faixa etária no Município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005

Leishmania (L.) chagasi **Positivo Negativo Total**

mania (L.) chagasi segund

o faixa etária no Município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005 *Leishm*

ania (L.) chagasi **Positivo Negativo Total**

mania (L.) chagasi segundo faixa etária no Município de Imperatriz, Maranhão,

Brasil, 2005 *Leishmania (L.) chagasi* **Positivo Negati**

vo Total

no Município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005 *Leishmania (L.) chagasi*

Positivo Negativo Total

faixa etária no Município de

Imperatriz, Mara

n

hã, Brasil, 2005 *Leishmania (L.) chagasi* **Positivo Negativo**

Total

io de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 200

5

Leishm

ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 13, p. 537-550, 1991.

ALBUQUERQUE, A. R. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico em cães (*Canis familiares*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937)**, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

ALENCAR, J.E.; CANTÍDIO, W.M.; CAVALCANTE, D.N. Calazar em Fortaleza. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENE, 13., 1956, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: 1956.

ALENCAR, J. E. **Calazar canino: contribuição para o estudo da epidemiologia no Brasil**. Tese: Universidade Federal do Ceará. Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil. 1959. 342 p.

ALENCAR, J.E. Profilaxia do Calazar no Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 3, n. 4, p. 175-180, 1961.

ALMEIDA, M.A.O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, p. 227-232, 2005.

ALVES, A. L. et al. Epidemiological survey of visceral leishmaniasis in errant dogs of Fortaleza city, Ceará. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.8, n.2, p. 63-67, 1998.

ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. **Leishmaniose visceral canina** Manual da Schering-Plough, São Paulo, 2005. 14 p.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ASHFORD, D.A. et al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: Validation of the Falcon assay screening test- enzyme-linked- assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, p. 1-8, 1993.

AZEVEDO, M.A.A., DIAS, A.K.K., PAULA, H.B. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral canina em Poxóreo, MT. 2004. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13., Ouro Preto. **Anais...** Revista Brasileira de Parasitologia, v. 13, p. 234.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2004, 120 p.

BRAZIL, R. C. Biologia de flebotomíneos. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro, Fiocruz, 2003. p. 368.

CABRERA, M. A. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of some risk factors. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 2, p.79-83, 2003.

CARVALHO, M.R. et al. Isolamento e identificação de *Leishmania (L.) chagasi* em cães endêmica para Leishmaniose visceral na zona da mata norte de Pernambuco, Brasil. In: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇAS DE CHAGAS E LEISHMANIOSES, 21., 2005, Uberaba. **Anais...** Uberaba, 2005.

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. Procedimentos para estudios de prevalência de enfermidades crônicas en al ganado. Buenos Aires, 1973. 33 p. (**Note technical, n. 18**).

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, London, v. 141, n. 21, p.539-543, 1997.

CORTADA, V. M. C. L. et al. Canine visceral leishmaniosis in Anastasio, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 28, p. 364-374, 2004.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 46, p. 61-76, 1955.

DEANE, L. M. **Leishamiose Visceral no Brasil**: estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: SNES, 1956. 162 p.

DEAN, A. G. et al. **Word processing, data base and statistics program for epidemiology in microcomputers**. Version 6.2. Centers of Disease Control, 1990.

DE LUNA, R. et al. Early suppression of lymphoproliferative response in dog with natural infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 70, p. 95-103, 1999.

EVANS, T. G. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.166, p.1124-32, 1992.

FERRER, L. Clinical aspects of canine Leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 6-10.

FISA, R. et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 83, p. 87-97, 1999.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2/3, p. 161-173, 2003.

GALATI, E. A. B. et al. Estudo de flebotomíneos (Díptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, p. 378-390, 1997.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro, Fiocruz, 2003. p. 23-52.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n. 3 p. 338-349, 2004.

GUIMARÃES, K. S. et al. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, p. 305-309, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 28 set. 2005.

IVERSON L. B. et al. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana do município de São Paulo, Brasil (1979-1982). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 310-317, 1983.

LIMA-JUNIOR, A. D. et al. A survey of canine leishmaniasis in the city of Recife, Northeastern Brazil. In: AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY PARASITOLOGISTS, 45., 2000, Salt Lake City. **Proceedings...** Salt Lake City, 2000. p. 32.

MANCIANTI, F. et al. Comparison between an enzyme linked immunosorbent assay using a detergent soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 59, p. 13-21, 1995.

MELO, M. N., Leishmaniose Visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, p. 41-45, 2004. Suplemento I.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.

MOURA, S. T. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis in the urban área of the District of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 2, 1999.

NOLI, C. La leishmaniosis del cane. **Waltham Focus**, London, v. 9, n. 2, p.16-24, 1999.

NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; NUNES, D.B. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, 2001.

NUNES, V. L. B. et al. Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose visceral em cães de Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1/2, p. 17-21, 1988.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 1, p. 39 – 44, 1996.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, US, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

POCAI, E. A. et al. Visceral Leishmaniasis (kala-azar). Five cases in dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul, South Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.

ROSARIO, E. Y. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral

leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 2, p. 197-203, 2005.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, p. 315-317, 1998.

SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 88, p. 21-30, 2002.

SAVANI MOURIZ, E. S. M. et al. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 260-262, 2003.

SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE MUNICIPAL–SEMAM. Região Tocantina Imperatriz, MA. Disponível em:<<http://www.imperatriz.ma.gov.br>> Acesso: 20 jan. 2005.

SHERLOCK, I. a.; ALMEIDA, S. P. Observações sobre Calazar em Jacobina, Bahia. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 230-242, 1970.

SIDERIS, V. et al. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens, Greece. **European Journal of Epidemiology**, v. 15, p. 271-276, 1999.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.

SILVA, A. V. M. et al. Leishmaniasis in domestic dogs: epidemiological aspects. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

SOUSA, E. R. C. **Ocorrência da Leishmaniose Canina na Região Sudoeste do Maranhão**. 1998. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Maranhão, [Imperatriz].

THOMÉ, S. M. G. Cuidado com as leishmanioses: zoonoses em expansão que requerem atenção dos médico veterinários... **Cães e Gatos**, São Paulo, n. 85, p. 46-50, 1999.

ZIVICNJAK, T. et al. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, p. 35-43, 2005.

CAPÍTULO II

**SPECIFIC IgG1 AND IgG2 SUBCLASS IN DOGS NATURALLY
INFECTED BY *Leishmania chagasi* FROM IMPERATRIZ CITY,**

MARANHÃO STATE, BRAZIL

SPECIFIC IgG1 AND IgG2 SUBCLASS IN DOGS NATURALLY INFECTED BY *Leishmania chagasi* FROM IMPERATRIZ CITY, MARANHÃO STATE, BRAZIL

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a major public health problem particularly in poverty countries. In Brasil, CVL is present all over the country with high prevalence ranges, particularly in northeast region. This disease is characterised by hypergamaglobulinemy, particularly IgG antibodies. The aim of this study was to evaluate the levels of IgG1 and IgG2 anti-*Leishmania* antibody production in a population of dogs from the endemic Imperatriz City, Maranhão State, Brazil. A total of 420 sera samples from both sex and different breeds and ages were analyzed by ELISA test. The results showed that 29.76% (125/420) presented high levels of anti-*Leishmania* IgG2. The levels of IgG1 and IgG2 increased significantly between oligosymptomatic and polysymptomatic animals. However just a few animals 5.70% (24/420) showed positive detectable levels of IgG1, this suggests that the IgG1

production is specific only to small percentage of dogs. It was positive for both antibodies 3.34% (14/420) the animals. Of the 86 dogs with compatible symptoms for Canine Visceral Leishmaniasis 70.93% (61/86) are presences of forms of *Leishmania* in the parasitological examination of bone marrow and 60.47% (52/86) of skin. Destes, 58.14% (50/86) apresentaram níveis positivos de IgG2 e 10.47% (9/86) para IgG1 e 8.14% (7/86) dos cães tinham simultaneamente produção de níveis altos de IgG1 e IgG2. IgG1 and IgG2 increased significantly between oligosymptomatic and polysymptomatic animals, as well is presented by symptomatic dogs with positive parasitological examinations of bone marrow and skin for Canine Visceral Leishmaniasis.

Key-Words: Canine Visceral Leishmaniasis; Antibodies IgG1 and IgG2 Production; Anti-*Leishmania*.

SUBCLASSES ESPECÍFICAS DE IgG1 E IgG2 NOS CÃES NATURALMENTE INFECTADOS PELA *Leishmania chagasi* NA CIDADE DE IMPERATRIZ, ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é um grande problema de saúde pública, particularmente em países pobres. No Brasil, a LVC está presente em quase todo o país com alta taxa de prevalência, particularmente na região do nordeste. Esta doença é caracterizada por hipergamaglobulinemia, particularmente anticorpos IgG. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis da produção dos anticorpos de anti-*Leishmania* IgG1 e IgG2 em uma população de cães de uma área endêmica de cidade de Imperatriz, Estado de Maranhão, Brasil. Um total de 420 amostras de soro de cães de ambos os sexos e de diferentes raças e idades foi analisado pelo teste de ELISA. Os resultados mostraram que 29,76% (125/420) apresentaram níveis elevados do anti-*Leishmania* IgG2. Os níveis de IgG1 e de IgG2 aumentaram significativamente entre

animais oligossintomáticos e polissintomáticos. Apenas alguns animais 5,70% (24/420) mostraram níveis detectáveis positivos de IgG1, sugerindo que a produção IgG1 é específica somente para pequena porcentagem de cães. Foram positivos para ambos os anticorpos 3,34% (14/420) dos animais. Dos 86 cães com sintomatologia compatíveis à Leishmaniose Visceral Canina, 70,93% (61/86) tinham presenças de formas de *Leishmania* no exame parasitológico de medula e 60,47% (52/86) na pele. Destes, 58,14% (50/86) apresentaram níveis altos de IgG2 e 10,47% (9/86) para IgG1 e 8,14% (7/86) dos cães tinham alta produção simultânea dos níveis de IgG1 e IgG2. IgG1 e IgG2 aumentam significativamente entre animais oligossintomáticos e polisintomáticos, como também estão presente em cães sintomáticos com exame parasitológicos de medula e pele positivos para Leishmaniose Visceral Canina.

Palavras Chave: Leishmaniose Visceral Canina; Produção Anticorpos IgG1 e IgG2; Anti-*Leishmania*.

4.1- INTRODUCTION

In Brasil, visceral leishmaniasis is present throughout the country, in urban and rural areas, with CanL prevalences that ranges from 1.6 in northeastern (Alves et al., 1998) to 75.3% in central region (Cortada et al., 2004).

In the state of Maranhão, there has been a marked increase in the number of cases reported over the past years (Sousa, 1998). The epidemiological analysis of the region revealed that deforestation greatly contributed to the advances of the disease in new settlements leading to its dissemination to susceptible animals and man, where the local vector, *Lutzomyia longipalpis*, has been found in peri and intra domiciliary environment (Camiá et al, 1999).

CanL is a progressive fatal infection with a long asymptomatic period followed by a patent clinical period, which leads to animal death (Abranches et al., 1991; Ashford et al., 1993). The disease is characterised by a high production of anti-*Leishmania* sp antibodies, as a result of polyclonal B cell activation, accompanied by hypergammaglobulinemia and an ineffective *Leishmania*-specific cell-mediated immune response.

High levels *Leishmania*-specific IgG is a hallmark of CanL. Several researchers have attempted to study the pattern of IgG1 and IgG2 anti-*Leishmania*, some times with contradictory results. Deplazes et al. (1995) had observed that sick dogs presented high levels of IgG1 while IgG2 was associated to asymptomatic *L. infantum*-infected dogs. On the other hand, Leandro et al. (2002) observed the presence of high levels of IgG2 and basal levels of IgG1 in symptomatic animals. Solano-Gallego et al. (2001) also found high IgG2 reactivity in symptomatic dogs, natural and experimentally infected, whereas the levels of IgG1 presented high variability.

In spite of CanL, Reis et al. (2001) also established an association between IgG2 and symptomatic dogs and IgG1 and asymptomatic infections.

The goal of this research was to evaluate the IgG1 and IgG2 anti-*Leishmania* antibody production in a population of dogs from the endemic area of the State of Maranhão, Brazil.

4.2 - MATERIAL AND METHODS

4.2.1 Area of research

This cross-sectional study was carried out in Imperatriz county, endemic region of visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil, located at latitude 5° 31'35'' South e longitude 47° 29'30'' West. This state is situated closed at the Amazon region, where farming represents the main economical activity. This area under study has a hot tropical climate, with an average annual temperature of 32°C and about 82% of humidity, and the vegetation was considerably modified by human interventions, being mostly formed by grazing areas.

Figure 1 Map of Brazil, detaching Maranhão State, showing to the localization of Imperatriz city in the Amazônia Maranhense (Source: Rêbello, 1999)

4.2.2 Studied population

A total of 420 dogs of known ownership were studied and complete records of breed, sex and age were obtained. The minimum sample size required ($n = 420$) was calculated using the methodology of Zoonosis Panamerican Center (1973).

4.2.3 Clinical examination

Each dog was submitted to a clinical examination to evaluate health conditions. Prior to inclusion of animals in this study, consent from the dog owners was obtained after they had been informed about the objectives of the study and the nature of the interventions. Dog anamnesis, sex, age and breed were reported.

4.2.4 Parasitological examinations

Biopsies of apparently healthy skin were obtained from the ears or muzzle and bone marrow aspirates were collected from dogs with clinical signs compatible with CanL and used for direct parasitological examination under optical microscopy. Parasite detection was performed by optical microscopic observation.

4.2.5 Serum samples

A sample of 10 ml of peripheral blood was taken from each dog and used for the detection of IgG1 and IgG2 antileishmanial antibodies.

4.2.6 Serological examinations

ELISA for parasite specific IgG1 and IgG2 antibodies was performed as described by Leandro et al. (2002). Antigen was prepared from a strain of *Leishmania infantum* (MHOM/PT/88/IMT151). As negative controls, eight sera of healthy Beagles dogs were used. For each serum Positive / Negative (P/N) ratio was calculated, being N the average value of absorbance of control dogs. All sera with a P/N > 2 were considered positive.

The anti-serum used to serology was dog IgG1 antibody HRP conjugated and dog IgG2 antibody HRP conjugated.

4.2.7 Statistical analysis

Data analysis was performed using the SPSS 10.0 statistical program (SPSS Inc., USA). The *t* Student test with a 5 % level of significance was used to compare IgG1 and IgG2 levels between different clinical signs (asymptomatic, oligosymptomatic and polysymptomatic) and parasitological examination in skin and bone marrow.

4.3 - RESULTS

From the studied dogs, 79.53% did not presented clinical signals, 11.67% were polysymptomatic, and 8.81% were oligosymptomatic. Positive IgG1 antileishmanial antibodies were detected in 5.70% (24/420) of dogs, while IgG2 antibodies were found in 29.76% animals (125/420) of animals (Table 1).

Among the animals 3.34% (14/420) were positive for both IgG1 and IgG2.

Table 1 Clinical classification and IgG1 and IgG2 antileishmanial antibodies detected by ELISA of dogs asymptomatic and oligo/polysymptomatic of Imperatriz county of Maranhão State, Brazil, 2006

	polysymptomatic		of I		mpera	
county of Mar	anhão	State, Bra	zi	l,	2	00
poli	symptomati		c o	f Im	pera	triz
nt	y of M	aranhão	Sta	te, B	razil,	2006

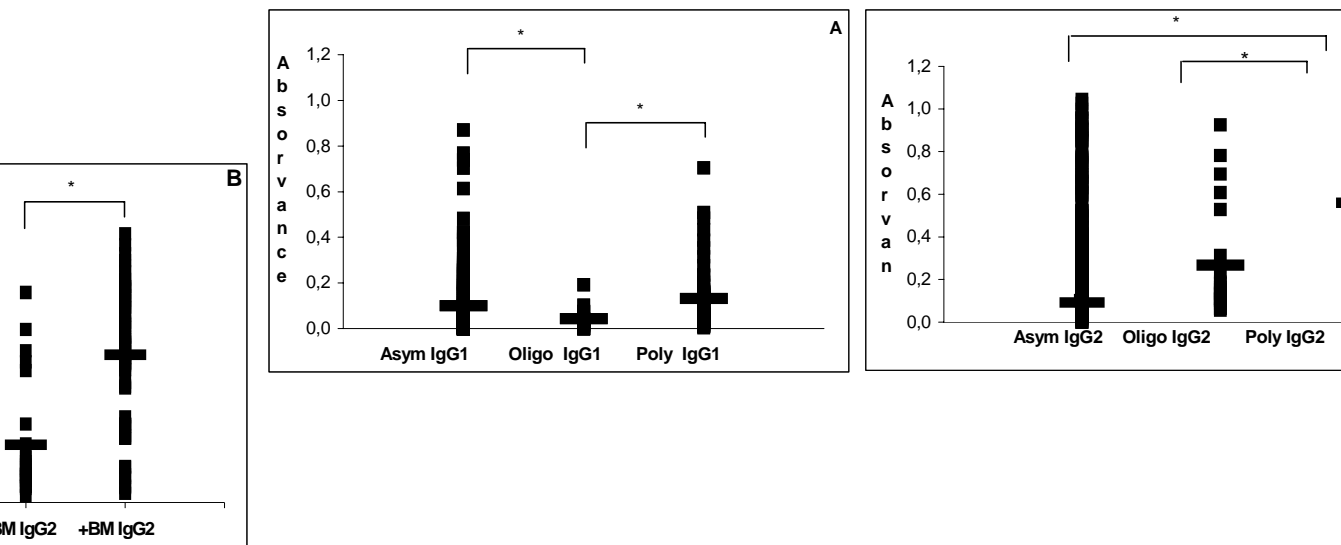
(+) – Positivo; (-) - Negativo

Of the 86 dogs presenting symptoms compatible with leishmaniasis 70.93% (61/86) of dogs had positive parasitological examinations in the bone marrow and 60.47% (52/86) of dogs in the skin (Table 2). All the animals with amastigotes in skin also presented parasites in the bone marrow. From the symptomatic group of animals, 58.14 (50/86) animals revealed positive IgG2 levels and 10.47% (9/86) were positive for IgG1 antileishmanial antibodies (Table 2).

Table 2 Clinical classification parasitological examinations of bone marrow (BM) and healthy skin (HS) and IgG1 and IgG2 antileishmanial antibodies detected by ELISA of symptomatic dogs of Imperatriz county of the Maranhão State, Brazil, 2006

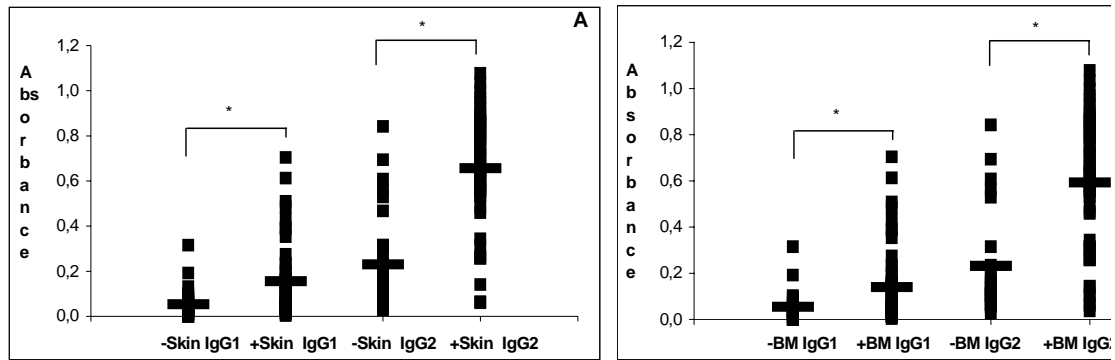
A of symptomatic dogs of Imperatriz county of the Maranhão State, Brazil, 2006		c dog s of Imperatriz	
ty of the M	aranhão St	at e,	B razi l, 2 00
A o f s ymptomati c dog s o f I mpe	y of t he Mar anhão State, Brazi l, 200 6	A of s yptom	

the Maranhão State, Brazil, 2006
 county of the Maranhão State, Brazil, 2006
 county of the Maranhão State, Brazil, 2006
 mperatriz county of the Maranhão State, Brazil, 2006
 ic dogs of Imperatriz county of the Maranhão State, Brazil, 2006
 matic dogs of Imperatriz county of the Maranhão State, Brazil, 2006
 matic dogs of Imperatriz county of the Maranhão State, Brazil, 2006
 tic dogs of Imperatriz county of the Maranhão State, Brazil, 2006
 atic dogs of Impera
 t
 riz county of the Maranhão State, Brazil, 2006
 peratriz county of the Maranhão State, Brazil, 2006
 Impera



The IgG2 absorbance of asymptomatic and polysymptomatic and of oligosymptomatic and polysymptomatic dogs presented highly significant differences ($P = 0.000\dots$) (Fig 2B). The IgG2 values between animals with parasitological negative and positive examinations of bone marrow and skin also revealed highly significant differences ($P = 0.000\dots$).

Figure 3 Antileishmanial antibodies IgG1 and IgG2 levels presented by symptomatic dogs with positive and negative parasitological examinations of healthy skin (A) and bone marrow (B) * $P < 0.05$



4.4 - DISCUSSION

This study demonstrates that a considerable amount of domestic dogs from the State of Maranhão, Brazil, presented anti-*Leishmania* IgG2 antibodies subclass pointing to a CanL prevalence of 30.00 %. In a previous study carried out in different counties of Maranhão state it was found that CanL prevalence's ranged between 23.00% (Guimarães et al, 2005) and 46.66% (Braga et al. 2005).

In other endemic areas of Brasil, the canine seroprevalences of 1.60% in Ceará (Alves et al., 1998), 2.46% in Rio Grande do Sul (Pocai et al., 1998; Marcondes et al., 2003), 9.70% in Minas Gerais (França-Silva et al., 2003), 10.30% in the state of Roraima (Guerra et al., 2004), 25.00% in Rio de Janeiro (Cabrera et al., 2003), in Pernambuco 4.80% a 33.3% (Carvalho et al., 2005) and 23.70% and 75.30% in the state of Mato Grosso do Sul (Nunes et al. 2001; Cortada et al., 2004), in São Paulo of 2.50% (Iverson et al., 1983), in Rio Grande do Norte (Souza et al., 1998) 12.00% and in Bahia 23,50% (Paranhos-Silva et al. 1996) were detected.

These values show great differences between the number of CanL cases found in the different states of Brazil which points out to some important foci of canine infection.

The high number of symptomatic dogs with parasites in the skin, indicating the possibility of a considerable risk of transmission and the emergence of new cases of infection in the state of Maranhão, Brazil.

Previous studies (Molina et al., 1994, Guarca et al., 2000) have reported that the asymptomatic animals are also capable of being infective to sand flies and it is estimated that more than half of the serological positive dogs identified in field surveys are asymptomatic (Gradoni et al., 1980; Dubreuil et al., 1990; Abranches et al., 1991).

In the present study, 19.20% (64 dogs) of the asymptomatic dogs were positive for IgG2 could also be able to transmit the parasite to other hosts.

Despite the variability of clinical signs presented in the dogs of this study most of the animals presented cutaneous symptoms and weakness while lymphadenopathy was found in a low number of animals. In effect, dermatological lesions, lymphadenopathy and weight loss are the most common signs found in CanL (Noli, 1999; Ferrer, 1999; Amusategui et al., 2003; Cortada et al., 2004; João et al., 2006).

In the present study, 50.00% of the symptomatic dogs showed skin lesions and 60.50% animals had parasites in the skin. These results point to the need of further studies regarding the specific identification of *Leishmania* parasites found in dogs' tissues to determine the presence of either visceral or cutaneous *Leishmania* strains or both strains in CanL.

According to some authors (Pozio et al., 1981) there is a direct correlation between the antileishmanial antibodies titres and the severity of the clinical signs exhibited by dogs.

In the present study, it was also observed that levels of IgG1 and IgG2 increased significantly between oligosymptomatic and polysymptomatic animals, thus confirming previous results.

In canine experimental infection it was verified that production of antileishmanial antibodies starts early, 1.5–3 months after *L. infantum* inoculation (Abranches et al., 1991).

However the studies of antileishmanial production of IgG1 in dogs have given heterogeneous results (Santos-Gomes et al., 2002).

Several authors consider that high levels of IgG1 subclass is indicative of the establishment of canine leishmaniasis clinical signs (Deplazes et al., 1995, Cabral et al., 1998, Nieto et al., 1999) while no such relation can be established between the clinical status and IgG1 levels by other researchers.

In the present study just few animals reveal positive levels of IgG1 (5.70 %), even in the animals that exhibited clinical symptoms or presented parasites in the

tissues, suggesting that the production of IgG1 antileishmanial antibodies are specific of only some dogs.

In fact, significantly low IgG1 values were detected in oligosymptomatic dogs when compared with asymptomatic animal suggesting that a considerable number of asymptomatic animals are indeed infected.

Furthermore, significantly higher levels of antileishmanial IgG1 antibodies in polisymptomatic in comparison to oligosymptomatic animals, indicates an increase in IgG1 production during infection development in some dogs this is study.

IgG2 has been associated by the majority of authors with symptomatic naturally-infected dogs (Leandro et al., 2001, Cordeiro-da-Silva et al., 2003). Also in the present study, most of the symptomatic animals had positive levels of IgG2.

In point of fact, the IgG2 values do not distinguish between asymptomatic and oligosymptomatic dogs, but are significantly different between oligosymptomatic and polisymptomatic.

This could suggest late production of this subclass of antibodies. Furthermore 39 (11.70%) asymptomatic animals also revealed high levels of IgG2, it is described that *L. infantum/chagasi* infection in the dog causes a prolonged incubation period without external signs of disease and that this is synonymous of infection.

Additionally, all the symptomatic dogs with detectable parasites in the skin and bone marrow, except for two dogs, also had high levels of IgG2.

In this study, 17 symptomatic animals with detectable parasites showed low levels of antileishmanial IgG1 and IgG2. This low production of parasite antibodies, in the proven infected animals, could be due to immunosuppression, eventually caused by malnutrition or related to age.

4.5 – CONCLUSION

IgG1 and IgG2 increased significantly between oligosymptomatic and polisymptomatic animals, as well is presented by symptomatic dogs with positive parasitological examinations of bone marrow and skin for Canine Visceral Leishmaniasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank J.M. Cristóvão and J. Ramada for technical assistance. Funding for this work was provided by the project research POCTI/CVT/44884/2002 by the Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal, and partially supported by the European Union Fund (FEDER). Also thank the CMDT (PT) and CAPES (BR).

REFERENCES

ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 13, p. 537-550, 1991.

ALVES, A. L. et al. Epidemiological survey of visceral leishmaniasis in errant dogs of Fortaleza city, Ceará. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.8, n.2, p. 63-67, 1998.

AMUSATEGUI, I. et al. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **Europeun Journal Epidemiology**, v. 18, n. 2, p.147-156, 2003.

ASHFORD, D.A. et al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: Validation of the Falcon assay screening test- enzyme-linked- assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, p. 1-8, 1993.

BRAGA, G. M. S. et al. Frequência de anticorpos anti-*Leishmania* em cães do município de Imperatriz, região Sudoeste do Maranhão, Brasil. In: SIMPÓSIO DE PÓS - GRADUAÇÃO, 4., JORNADA DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO, 5., 2005, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.

CABRAL, M. et al. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 76, p.173-189, 1998.

CABRERA, M. A. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of some risk factors. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CAMIÁ, R. P. et al. Foco de Leishmaniose Visceral em Mato Grosso. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 15., REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM LEISHMANIOSES, 3. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 2, p. 127-128, 1999. Suplemento II

CARVALHO, M.R. et al. Isolamento e identificação de *Leishmania (L.) chagasi* em cães endêmica para Leishmaniose visceral na zona da mata norte de Pernambuco, Brasil. In: REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇAS DE CHAGAS E LEISHMANIOSES, 21., 2005, Uberaba. **Anais...** Uberaba, 2005.

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. Procedimentos para estudios de prevalência de enfermidades crônicas en al ganado. Buenos Aires: Ramos Mejia, 1973. 33 p. (**Nota técnica, n. 18**).

CORDEIRO-DA-SILVA, A. et al. Identification of antibodies to *Leishmania* silent information regulatory 2 (SIR2) protein homologue during canine natural infections: pathological implications. **Immunology Letters**, v. 86, n. 2, p.155-62, 2003.

CORTADA, V. M. C. L.; DOVAL, M.E.C. et al. Canine visceral leishmaniosis in Anastasio, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 28, p. 364-374, 2004.

DEPLAZES, P. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody response of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 17, p. 451-458, 1995.

DUBREUIL, N. et al. Experimental canine leishmaniasis : A clinical and immunological study. **Bulletin de la Société Française de Parasitology**, Paris, v. 8, n. 1, p. 522, 1990.

FERRER, L. Clinical aspects of canine Leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 6-10.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 111, n. 2/3, p. 161-173, 2003.

GRADONI, L. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto province. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 80, p. 666-667, 1980.

GUARGA, J. L. et al. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Tropica**, Basel, v. 77, p. 203-207, 2000.

GUERRA, J.A.O. et al. Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Roraima, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1989 to 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p. 305-311, 2004.

GUIMARÃES, K. S. et al. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 131, p. 305-309, 2005.

IVERSON L. B. et al. Inquérito sorológico para pesquisa de leishmaniose visceral em população canina urbana do município de São Paulo, Brasil (1979-1982). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 310-317, 1983.

JOÃO, A. et al. Canine leishmaniasis chemotherapy: dog's clinical condition and risk of *Leishmania* transmission. **Journal Veterinary Medical Physiology Pathology Clinical Medical**, v. 53, n. 10, p.540-545, 2006.

LEANDRO, C. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody

response in natural and experimental canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 79, p. 273-284, 2002.

MARCONDES, C. B. et al. Levantamento de Leishmaniose Visceral em cães de Santa Maria e municípios próximos, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4. 2003.

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 88, n. 4, p. 491-493, 1994.

NIETO, C. G. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 67, p. 117–130, 1999.

NOLI, C. La leishmaniosis del cane. **Waltham Focus**, London, v. 9, n. 2, p.16-24, 1999.

NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; NUNES, D.B. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, 2001.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 1, p. 39 – 44, 1996.

POCAI, E. A. et al. Visceral Leishmaniasis (kala-azar). Five cases in dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul, South Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.

POZIO, E. et al. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Tropical**, Basel, v. 38, p. 383-393, 1981.

REIS, A.B. **Avaliação de Parâmetros Laboratoriais e Imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção.** 2001. 168 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 88, p. 21-30, 2002.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, US, v. 39, n. 2, p. 560–563, 2001.

SOUSA, E. R. C. **Ocorrência da Leishmaniose Canina na Região Sudoeste do Maranhão.** 1998. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Maranhão, [Imperatriz].

CAPÍTULO III

**ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA (LVC) NO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ,
ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

**ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA (LVC) NO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ,
ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

RESUMO

A Leishmaniose Canina é uma doença progressiva que pode passar anos para começar a se tornar clinicamente aparente. Entretanto, os aspectos clínicos não são específicos e alguns cães infectados podem não mostrar nenhum dos sinais característicos, podendo confundir o clínico no diagnóstico da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar os sinais clínicos nos cães infectados naturalmente pelo *Leishmania* sp. Investigaram-se 189 cães domiciliados na cidade de Imperatriz, Estado de Maranhão, quanto aos sinais clínicos relacionados à Leishmaniose Visceral Canina. Todos os cães examinados eram positivos para *Leishmania chagasi* pelo teste sorológico de ELISA. Pelo exame clínico, os cães foram separados em três grupos, sendo que 26% a 37% apresentaram dois sinais, de 37 a 70% três sinais e 70 a 100% dos cães mostraram acima de três sinais clínicos. Alopecia e onicogribose (100,00) foram os sinais clínicos mais observados em cães com infecção, depois a caquexia (93,13%), seguido pela apatia (88,89%) e lesão ocular (77,78). Nas áreas endêmicas, a avaliação dos sinais clínicos é importante para confirmação do diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.

Palavras Chave: Aspectos Clínicos; Sinais Clínicos; Diagnóstico Clínico.

**CLINICAL ASPECTS OF THE CANINE VISCERAL
LEISHMANIOSE (LVC) IN THE IMPERATRIZ CITY, STATE OF
THE MARANHÃO, BRAZIL**

ABSTRACT

Canine Leishmaniasis is a progressive disease that can take years to become clinically apparent. However, the clinical aspects are non-specific and some heavily infected dogs don't show any signs which may confuse the diagnosis of the disease. The objective of this paper is evaluating the clinical signs in dogs naturally infected by *Leishmania* sp. A total of 189 domiciliated dogs from Imperatriz County, Maranhão State, was investigated for clinical signs related to Canine Visceral Leishmaniasis. All dogs examined were positive for *Leishmania chagasi* antibodies by ELISA test. After the clinical examination, dogs were separated into three groups, as following, 26-37% presented two signs, 38 -70% three signs and 71- 100% of dogs showed up three clinical signs. Alopecia and onicogryphosis (100.00%) were the major clinical

signs observed in infected dogs following by cachexia (93.13%), apathy (88.89%) and ocular lesions (77.78%). In endemic areas, the evaluating the clinical signs are important to confirm the diagnosis of the Canine Visceral Leishmaniasis.

Key-Words: Clinical Aspects; Clinical Signs; Clinical Diagnostic.

5.1 – INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença sistêmica grave, de curso lento e crônico, difícil diagnóstico e cura parasitológica improvável (MELO, 2004; RIBEIRO, 2005), acomete canídeos domésticos e silvestres, tendo como agente causal no Brasil a *Leishmania (Leishmania) chagasi/infantum* (MILES, 1999; MAURÍCIO et al., 2000).

Atualmente, com base nos estudos dos perfis isoenzimáticos, a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* tem sido considerada idêntica à *Leishmania (Leishmania) infantum* (MAURÍCIO et al., 1999, 2000).

O cão tem sido implicado como principal hospedeiro e importante reservatório na cadeia epidemiológica da infecção em ambiente doméstico, cuja transmissão é dependente da população de *Lutzomyia longipalpis* (PARANHOS-SILVA et al., 1996; ALMEIDA et al., 2005). Porém, em áreas silvestres e sinantrópicas, outros vertebrados como roedores, marsupiais, primatas e canídeos silvestres, podem estar envolvidos no ciclo de transmissão da doença (DEANE e DEANE, 1955; DEANE, 1956; KEENAN, 1984; SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 2000).

Segundo Marzochi et al. (1985), apenas uma parcela dos cães infectados desenvolve a doença clínica, que pode variar de aparente estado sadio ao severo estágio final e a sua gravidade depende da imunocompetência destes animais

(MORENO et al., 1999; FEITOSA et al., 2000).

Sendo assim, em função dos sinais clínicos apresentados os animais podem ser classificados em três categorias, a saber: assintomáticos, oligossintomáticos ou polissintomáticos (BRASIL, 2004; SANTA ROSA e OLIVEIRA, 1997; ABRANCHES et al., 1991).

Classicamente, os sinais clínicos nos animais com LVC, se iniciam de forma inespecífica como alterações dermatológicas caracterizada por alopecia, descamação furfurácea (PAIVA CAVALCANTI et al., 2005; ALVES e FAUSTINO, 2005), ulcerações (BRASIL, 2004; BONATES, 2003), alopecia local, lesões de borda de orelha e focinho, onicogribose, epistaxe, caquexia (FERRER et al., 1999), além de hepatoesplenomegalia, hemorragia intestinal, diarreia (CIARAMELLA et al., 1977; MELO, 1998; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000; BRASIL, 2004;) problemas articulares (DENEROLLE, 1996) e oftalmopatias (FERRER, 1999; ROZE, 2002; BRASIL, 2004; BRITO, 2004).

A ampla variedade de sinais clínicos torna o diagnóstico clínico difícil, sendo necessário o auxílio de outros métodos diagnósticos, quer seja parasitológicos, sorológicos ou moleculares, para a segura realização do diagnóstico (FERRER, 1999, 2002).

Apesar de LVC ser endêmica em várias regiões do Brasil, poucos são os relatos mostrando os aspectos clínicos da enfermidade canina nos municípios classificadas pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), como prioritários para o controle da Leishmaniose Visceral (LV).

Este trabalho teve como objetivo relatar os sinais clínicos de cães com diagnóstico sorológico positivo para LVC, no município de Imperatriz, região Sudoeste do Estado do Maranhão, Brasil.

5.2 – MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Área estudada

A área estudada é o município de Imperatriz (Latitude de 5° 31'35'' Sul e Longitude de 47° 29'30'' Oeste), região Sudoeste do Estado do Maranhão, Brasil, que se encontra a 640 quilômetros da capital do Estado, São Luís.

Possui um clima tropical quente e úmido, com temperatura anual média de

32°C, estando localizada numa região conhecida como Portal da Amazônia, sendo uma área de transição entre cerrado e floresta Amazônica, onde atualmente apresenta cobertura vegetal, consideravelmente modificada, devido a diversas ações antrópicas.

5.2.2 - População estudada

Foram realizados exames clínicos em 189 cães domiciliares, sororreagentes ao teste ELISA, realizado durante o período de abril a maio de 2005, na população canina do referido município. O número de animais que constituíram a amostragem foi por conveniência não probabilística (COSTA NETO, 1977).

5.2.3 Exame dos animais

Inicialmente foi realizada anamnese, com obtenção de dados referentes ao estado geral, raça, sexo, idade, porte dos animais e evolução de sinais clínicos, bem como dados referentes ao proprietário do animal. O exame físico constou principalmente da inspeção da pele e fâneros, além da palpação abdominal e dos gânglios linfáticos, onde se observa a existência ou não de sinais sugestivos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC).

5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos sinais clínicos dos animais estudados encontram-se na Tabela 1, sendo que 26 a 37% apresentaram dois sinais clínicos; 37 a 70% três sinais clínicos, enquanto que 70 a 100% apresentaram mais que três sinais clínicos.

Tabela 1 Frequência absoluta e relativa dos sinais clínicos em cães sororreagentes para LVC do Município de Imperatriz, Região Sudoeste do Estado do Maranhão, Brasil, 2006

Sinal clínico	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Alopecia	189	100,00
Ulceras cutânea	130	68,79

Dermatites	134	70,90
Onicogrifose	189	100,00
Ceratoconjuntivite	147	77,78
Apatia	168	88,89
Caquexia	176	93,13
Linfoadenopatia	105	55,56
Distensão Abdominal	71	37,57
Edema	50	26,46
Epistaxe	54	28,58
Artropatia	63	33,34

Ao analisar os sinais clínicos nos animais examinados observa-se que a alopecia e onicogrifose, esteve presente em 100,0% dos animais deste estudo.

Segundo Marzochi et al. (1985), os achados de onicogrifose nos animais com infecção natural por *Leishmania* sp., variam muito (MARZOCHI et al., 1985; CIARAMELLA, et al., 1997; FEITOSA et al., 2000; NATAMI et al., 2000; ALMEIDA et al., 2005; PAIVA CAVALCANTI et al., 2005), notadamente, de acordo com a fase de evolução da doença, sendo imprecisa sua comparação com outros achados na literatura, mesmo sendo citado por vários autores.

No que concerne às dermatopatias, os resultados aqui observados foram superiores aqueles descritos por Almeida et al. (2005), que relataram a frequência de 80% de dermatopatias em cães no Estado de Pernambuco, além das observações realizadas por Ciaramella et al. (1997), Marzochi et al. (1985) e Natami et al. (2000), que relataram lesões dermatológicas em 40%, 3% e 8%, respectivamente dos animais com infecção natural por *Leishmania* sp.

A razão para frequência das dermatopatias, segundo Fondevila et al. (1997), pode ser decorrente da resposta imune dos animais infectados.

Por outro lado, a oftalmopatia aqui observada, nos animais com sorologia positiva para o calazar canino (77,78%) foi superior aos achados encontrados por Ciaramella et al. (1997), Natami et al. (2000), Feitosa et al. (2000), Paiva Cavalcanti et al. (2005), Barrouin-Melo et al. (2006), que observaram oftalmopatias em 15 a 33% dos animais infectados por *Leishmania* sp.

A frequência com que às alterações oculares se manifestam no curso clínico, da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é consideravelmente alta. Em países do

Mediterrâneo, por exemplo, tem sido atribuída à *Leishmania infantum*, que atualmente vem sendo identificada como forma similar a *Leishmania chagasi* (MAURÍCIO et al., 2000), a causa de oftalmopatias na espécie canina (GARCIA-ALONSO et al., 1998).

Segundo Koutinas et al. (1999), as lesões podem ser determinadas por parasitismo ocular direto, entretanto, mecanismos imunomediados habitualmente podem se associar. Ciaramella et al. (1997) e Roze (2002) observaram que as manifestações oculares encontram-se, freqüentemente, associadas aos sinais sistêmicos, todavia, podem se manifestar isoladamente.

Com relação à caquexia, 93,13%, (176/198) dos animais examinados apresentavam perda acentuada e progressiva de peso corporal. Estes dados foram superiores aqueles observados por Ciaramella et al. (1997) e Natami et al. (2000) que registraram o emagrecimento em 17% e 32 % de cães com calazar canino, respectivamente, Feitosa et al (2000) e Barrouin-Melo et al (2006) que observaram redução no peso em 47% dos cães com leishmaniose visceral e aqueles descritos por Paiva Cavalcanti et al (2005) que identificaram a perda de peso em 63,9% em cães na Região Metropolitana do Recife (PE).

Contudo, os dados aqui apresentados foram inferiores aqueles relatados por Marzochi et al. (1985) que observaram emagrecimento em 100% dos animais com diagnóstico parasitológico e sorológico provenientes da cidade do Rio de Janeiro.

A infecção por *Leishmania* sp. geralmente evolui para a forma crônica com ocorrência de sinais sistêmicos associados à proliferação do agente no Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), sendo que a intensidade dos sinais clínicos dependerá da imunocompetência do hospedeiro vertebrado (SLAPPENDEL et al., 1988; FEITOSA et al., 2000).

A razão para os diferentes percentuais observados, com relação à caquexia nos animais infectados com *Leishmania* sp, pode ser relacionada à fase de evolução doença.

Entre os animais, que apresentavam infartamento ganglionar no momento do exame clínico 55,56% (105/198) mostravam-se com linfadenopatia associada à LVC.

Aumento de linfonodos nos animais com infecção natural por *Leishmania* sp. tem sido observado por Keenan et al. (1984), Marzochi et al. (1985); Ciaramella et al. (1997); Natami et al. (2000); Feitosa et al. (2000) e Paiva Cavalcanti et al. (2005),

ficando dependente a reação individual frente ao agente etiológico.

O infartamento ganglionar é ocasionado pela resposta à presença de formas amastigotas de *Leishmania sp* (NOLI, 1999), o que gera um entumescimento da camada cortical e medular dos linfonodos com atração de grande número de linfócitos e macrófagos.

No que se refere ao quadro de epistaxe, 28,58% (54/198) dos animais estudados apresentaram diateses hemorrágicas. Estes achados são superiores aqueles mencionados por Feitosa et al (2000), em apenas 3% de animais.

Provavelmente, a principal causa para o aparecimento da epistaxe em cães com LVC, seja a presença de úlceras na cavidade nasal, contudo, outras causas para a ocorrência das hemorragias devem ser investigadas.

5.4 – CONCLUSÃO

Nas áreas endêmicas, a avaliação dos sinais clínicos é importante para confirmação do diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P. et al. An experimental model for canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 13, p. 537-550, 1991.

ALMEIDA, M.A.O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, p. 227-232, 2005.

ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. **Leishmaniose visceral canina** Manual da Schering-Plough, São Paulo, 2005. 14 p.

BONATES, A. Leishmaniosis visceral (calazar) **Veterinary News**, London/New York, ano 10, n. 61, p. 4-5, 2003.

BARROUIN-MELO, S. M. et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Veterinary Journal**, London, v. 171, n. 2, p. 331-339, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2004, 120 p.

BRITO, F. L. C. **Alterações oculares e análise do humor aquoso de cães (*Canis familiaris* Linnaes, 1758) infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas, 1937)**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 53 p.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, London, v. 141, n. 21, p.539-543, 1997.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264 p.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar, no Ceará. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 61-76, 1955.

DEANE, L. M. **Leishmaniose Visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará**. Rio de Janeiro: SNES, 1956. 162 p.

DENEROLLE, P.H. Leishmaniose canine: difficultés du diagnostic et du traitement (125 cas). **Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, Paris, v. 31, p. 137-145, 1996.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A; LUVIZOTTO, M. C. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 28, p. 36-42, 2000.

FERRER, L. Clinical aspects of canine Leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 6-10.

FERRER, L. Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 27., 2002, Granada. **Proceedings...** Granada, 2002.

Disponível em: <<http://www.avepa.org/granada2002>> Acesso em: 07 jan. 2006.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 56, n. 3/4, p. 319-27, 1997.

GARCIA-ALONSO, M. et al. Patología ocular asociada a leishmaniosis canina. **Consulta de Difusión Veterinária**, Lisboa, v. 6, n. 54, p. 49-53, 1998.

KEENAN, C. M. et al. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. I. Infection, clinical disease and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v. 21, p. 80-86, 1984.

KOUTINAS, A. F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 35, p. 376-383, 1999.

MARZOCHI, M.C.A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 3, p. 349-357, 1985.

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M.K.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex, **Parasitology**, Amsterdam, v. 119, p. 237-246, 1999.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, p. 188-189, 2000.

MELO, M. N., Leishmaniose Visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, p. 41-45, 2004.

Suplemento

MELO, M. A. **Ensaio clínico terapêutico na Leishmaniose Visceral Canina. Imunoterapia em animais assintomáticos.** 1998. 74 f. Dissertação (Mestrado) Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MILES, M.A. et al. Canine leishmaniasis in Latin América: control strategies for visceral leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona, 1999. p. 46-53.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v.71, n.3/4, p.181-195, 1999.

NATAMI, A. et al. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the khemisset province, Morocco. **Veterinary Research**, London, v. 31, p. 355-363, 2000.

NOLI, C. La leishmaniosis del cane. **Waltham Focus**, London, v. 9, n. 2, p.16-24, 1999.

PAIVA CAVALCANTI, M. et al. Aspectos clínicos das dermatopatias infecciosas e parasitárias em cães com diagnóstico presuntivo de leishmaniose visceral. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 58, p. 36-42, 2005.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 1, p. 39 – 44, 1996.

RIBEIRO, V. M. Leishmaniose Visceral Canina: Nossos cães devem morrer? **Cães & Gatos**, São Paulo, p. 66-70, 2005.

ROZE, M. Ocular manifestation of canine leishmaniasis. Diagnosis and treatment.

The globe Newsletter of the International Society of Veterinary Ophthalmology,
Berlin, v. 13, 2002.

SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. **Leishmaniose**
Visceral Americana. São Paulo, 2000. (Informe técnico).

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre
uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária,** São Paulo, ano 2, n. 11, p. 24-28,
1997.

SLAPPENDEL, R. J. et al. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the
Netherlands. **Veterinary Quartely,** The Hague, n. 10, p. 1-16, 1988.

CAPÍTULO IV

**AGENTES FÚNGICOS E BACTERIANOS EM UMA COLÔNIA A
NÍVEL LABORATORIAL DE *Lutzomyia longipalpis* POPULAÇÃO
IMPERATRIZ**

**AGENTES FÚNGICOS E BACTERIANOS EM UMA COLÔNIA A
NÍVEL LABORATORIAL DE *Lutzomyia longipalpis* POPULAÇÃO
IMPERATRIZ**

RESUMO

A colonização de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da Leishmaniose Visceral no Brasil foi reproduzida em laboratório. Entretanto, muito pouco se sabe sobre os contaminantes e as doenças que causam nestas colônias. O objetivo deste trabalho foi identificar a contaminação fúngica e bacteriana em colônia

de *Lutzomyia longipalpis*. Os insetos foram coletados por armadilha CDC em diversos locais do município de Imperatriz, Estado de Maranhão, Brasil e transportado ao Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRPE em recipientes de polietileno para colonização. A alimentação oferecida aos insetos foi de sangue de hámster e solução açucarada e estes foram mantidos em câmara aclimatizada a 27°C e umidade relativa de 80% para oviposição e maturação dos ovos. Diariamente, a colônia era monitorada para ver sua evolução e uma pequena quantidade de comida de peixe para larvas era polvilhada em cada recipiente. Porém, foi verificado, neste estudo, por ocasião do monitoramento das colônias de *Lutzomyia longipalpis*, contaminação fúngica e bacteriana. Os resultados da cultura bacteriana e fúngica mostraram *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. e *Aspergillus* sp. respectivamente nas colônias de *Lutzomyia longipalpis*. Entretanto, *Staphylococcus* sp. foi isolado de ovos inférteis e estágio larval, mas *Aspergillus* sp. e *Pseudomonas* sp. foram isolados somente das larvas do *Lutzomyia longipalpis*. Não foi observado mortalidade das pupas pela contaminação de fungos e bactérias neste estudo.

Palavras Chave: Flebotómos; *Lutzomyia longipalpis*; Microorganismos Patogênicos.

**BACTERIAL AND FUNGALS AGENTS IN COLONY LEVEL
LABORATORIAL OF *Lutzomyia longipalpis* IMPERATRIZ
POPULATION**

ABSTRACT

The colonization of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vector of Visceral

Leishmaniasis in Brazil, has been bred in laboratory. However, very little is known about the contaminating and the diseases they cause in these colonies. The aim of this paper was to identify the fungal and bacterial contamination in the *Lutzomyia longipalpis* colony. Sandflies were collected by CDC trap in locality several of studied county Imperatriz, Maranhao State, Brazil and transported to laboratory of Parasitic Diseases of the UFRPE in polystyrene containers to colonization. Blood meal from a hamster was offered to insects and solution sweet and they were kept in a acclimatized camara at 27°C and 80% relative humidity to oviposition and egg maturation. Everyday the colony was checked to see the evolution and a small amount of larval fish chow was sprinkled in each container. However, it was examined in this study, on the occasion of the observation in the *Lutzomyia longipalpis* colony, the fungal and bacterial contamination was reported. The results of bacterial and fungal culture showed, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. and *Aspergillus* sp. respectively on the *Lutzomyia longipalpis* colony. However the *Staphylococcus* sp. was isolated from unfertilized eggs and larval stage but *Aspergillus* sp. and *Pseudomonas* sp. were isolated only from larvae of *Lutzomyia longipalpis*. The mortality pupae by fungal and bacterial contamination were not observed in this study.

Key-Words: Phlebotomus; *Lutzomyia longipalpis*; Pathogenic microorganisms

6.1 – INTRODUÇÃO

A necessidade de criar insetos de importância na transmissão de doenças tem sido um desafio para os entomologistas, que algumas vezes improvisam diferentes técnicas usadas em insetários (WERMELINGER e ZANUNCIO, 2001).

A colonização em laboratório é essencial para se obterem exemplares limpos de agentes etiológicos, a fim de se fazerem experiências de transmissão desses agentes, estudos sobre a biologia do díptero, bem como material para estudos morfológicos (SHERLOCK e SHERLOCK, 1959).

Contudo, a contaminação fúngica e bacteriana tem sido frequentemente observada em criação de insetos em laboratório, representando o maior obstáculo na manutenção das colônias.

Entre os artrópodes de importância médico-veterinária, os flebótomos, particularmente aqueles pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, assumem importante papel em virtude de serem considerados os principais vetores das leishmanioses no Brasil (DEANE, 1956).

Colônias de *Lutzomyia longipalpis* têm sido estabelecidas com sucesso em diversas partes do mundo (SHERLOCK e SHERLOCK, 1959; KILLICK-KENDRICK et al., 1977; READY, 1978,1979; MODI e TESH, 1983; LUITGARDS-MOURA et al., 2000).

Por outro lado, apesar de a dieta larval ser considerada como fator mais importante na manutenção das espécies colonizadas em laboratório, pode contribuir para proliferação de microorganismos danosos à colônia, além de às vezes, representar um complemento alimentar para espécies de flebotomíneos (WERMELINGER e ZANUNCIO, 2001) ou o insucesso na colonização destes dípteros.

O objetivo deste trabalho foi identificar os agentes fúngicos e bacterianos em uma colônia a nível laboratorial de *Lutzomyia longipalpis* população Imperatriz.

6.2 – MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Coleta dos flebótomos

Os insetos foram coletados no Município de Imperatriz no Estado do Maranhão (5° 31' 35'' Latitude Sul e 47° 29' 30'' Longitude Oeste) através de armadilhas luminosas CDC (Center for Disease Control) a uma altura de 1,5 metros, nos intervalos de 18 horas às 06 horas da manhã, instaladas na mata em número de cinco (Figura 1), no ambiente peridomiciliar, em número de quatro (Figura 2) distante mais ou menos 20 metros das residências e intradomicílio, em número de duas (DEANE, 1956; TEODORO et al, 1993) no referido município.

Figura 1 Armadilhas luminosas CDC colocadas no ambiente rural para captura do inseto *Lutzomyia* sp. no município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005

Figura 2 Armadilhas luminosas CDC colocadas no ambiente peridomiciliar para captura do inseto *Lutzomyia* sp. no município de Imperatriz, Maranhão, Brasil, 2005

6.2.2 Colonização

Após a coleta, os flebótomos foram transferidos para o laboratório de endemia da Fundação Nacional de Saúde no referido município, os quais foram aspirados individualmente com o capturador de Castro (SHERLOCK e SHERLOCK 1972) e identificado de acordo com Galati (2003). Foram utilizados diversos materiais no processo de colonização (Figura 3) dos insetos em laboratório.

Figura 3 Materiais utilizados no processo de colonização do inseto *Lutzomyia longipalpis* no Laboratório de Endemias da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil, 2005

6.2.2.1 Alimentação das Fêmeas

Os exemplares fêmeas foram colocados dentro de gaiolas feitas de tecido sintético fino, medindo 20 cm de comprimento por 25 cm de altura e alimentados em hámsters, segundo Modi e Tesh (1983). As gaiolas foram acondicionadas em câmara aclimatizada (Figura 4) com temperatura de 27°C e umidade relativa de 80%.

Figura 4 Acondicionamento dos exemplares machos e fêmeas do inseto *Lutzomyia longipalpis* nas gaiolas em câmara climatizada com temperatura de 27° C e umidade relativa de 80% no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005

6.2.2.2 Alimentação dos Machos

Os exemplares machos foram alimentados com solução açucarada (READY, 1978; MODI e TESH, 1983) a base de glucose de milho diluídos na proporção de 30% em água destilada, embebidos em algodão e colocados à disposição dos mesmos em placa de Petri.

6.2.2.3 Preparo do substrato utilizado para oviposição, larvas e pupas

O substrato foi constituído de cristais de sulfato de cálcio hemidratado (gesso) com água destilada, que foi preparado e colocado em depósito de polietileno, com a capacidade de 300 mililitros (Figura 5).

Figura 5 Aspecto do recipiente utilizado para oviposição, larvas e pupas de *Lutzomyia longipalpis* colonizados no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005

Após a secagem da mistura distribuída nos recipientes em número de 12, os

exemplares machos e fêmeas coletados e alimentados foram distribuídos nestes recipientes com auxílio do capturador de Castro, para realizarem a cópula. Colocou-se uma tela de tecido sintético fino, contendo uma abertura central, para facilitar a manipulação dos insetos, a qual foi vedada com um tampão de algodão para evitar a fuga dos mesmos (Figura 6). Diariamente foram adicionadas gotas de água destilada para manutenção da umidade nos recipientes.

Figura 6 Aspecto da colonização do inseto *Lutzomyia longipalpis* em recipiente com tela de tecido sintético fino, com abertura central, vedada com tampão de algodão, no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005

6.2.2.4 Transporte do material

Os recipientes contendo os flebótomos foram transportados para o Laboratório de Endemias da Universidade Federal do Piauí, onde foi monitorado até a oviposição e posteriormente serem transportados ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde foram acondicionados em câmara climatizada com temperatura de 27° C e umidade relativa de 80% para eclosão.

6.2.2.5 Alimentação das larvas

A base da alimentação das larvas foi constituída de alimento composto para peixes, as liquefeitas em triturador (MODI e TESH, 1983) para posterior autoclavagem. Diariamente era adicionada aproximadamente 0,5 g do alimento por recipiente.

6.2.2.6 Monitoramento da colônia

Diariamente as colônias foram examinadas para visibilização do desenvolvimento dos estádios larval e pupal dos insetos (Figura 7), além da avaliação

da contaminação fúngica e bacteriana nos referidos estádios. Sendo assim foram verificados os aspectos referentes à umidade e coloração do substrato.

Figura 7 Aspecto da colonização do inseto *Lutzomyia longipalpis* em estágio de larva com contaminação fúngica e bacteriana no recipiente no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005

6.2.2.7 Coleta de material das colônias

Fragmentos do substrato (Figura 8) foram coletados e transferidos para placas de Petri, contendo Ágar Sangue, enriquecido com 5% de sangue ovino, Agar Levine e Agar Sabourand. A incubação das placas foi realizada em estufa microbiológica a 37° C, durante 48 horas, para cultura bacteriana e para cultura fúngica as placas foram deixadas à temperatura ambiente durante 15 dias.

Figura 8 Substrato do recipiente da colônia do inseto *Lutzomyia longipalpis* em estágio de larva com contaminação fúngica e bacteriana no Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005

6.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três dias após a eclosão das larvas nos recipientes foi observada modificação na coloração do substrato, o qual se apresentava de coloração amarelada e avermelhada. Os resultados da cultura bacteriana revelaram a presença de *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. e a cultura fúngica, *Aspergillus* sp.

A avaliação da contaminação do estágio evolutivo revelou que, *Staphylococcus* sp. foi isolado das larvas e ovos inviáveis ou seja, que não haviam eclodidos, enquanto que *Aspergillus* sp. e bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. foram isolados

apenas das larvas. Este instar de acordo com Killick-Kendrick et al. (1977) é o mais delicado e é o que representa maior perda nas colônias.

Embora Wermelinger e Zanuncio (2001), citem que a contaminação fúngica em criações de flebotomos é freqüente, os mesmos autores asseguram a importância dos fungos como complemento alimentar nas colônias.

Por outro lado, Modi e Tesh (1983) e Wermelinger e Zanuncio (2001) relatam que a contaminação fúngica é proveniente do material ofertado para alimentação das larvas. Porém, deve-se considerar no presente estudo, que o material alimentar foi autoclavado.

Sherlock e Sherlock (1959), já chamavam atenção para o fato de que, em criações de flebotomos podem aparecer agentes biológicos prejudiciais às colônias.

No presente estudo não foi observado mortalidade no estágio pupal. Este resultado foi diferente daqueles relatados por Luitgards-Moura et al. (2000) que observaram contaminação e mortalidade em pupas de *Lutzomyia longipalpis*, porém, este resultado concorda com Killick-Kendrick et al. (1977) quando relatam que a pupa é o mais robusto estágio e a perda é muito pequena ou mesmo nenhuma.

Outros estudos deverão ser realizados para avaliar melhor as variáveis envolvidas na colonização de flebotomíneos.

6.4 – CONCLUSÃO

As contaminações bacterianas e fúngicas são fatores limitantes para a colonização de flebotomíneos.

REFERÊNCIAS

DEANE, L. M. **Leishamiose Visceral no Brasil**: estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: SNES, 1956. 162 p.

GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. 368 p.

KILLICK-KENDRICK R.; LEANEY A. J.; READY P. D. The establishment

maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 13, n. 4/5, p. 429-440, 1977.

LUITGARDS-MOURA, J. F.; CASTELLON BERMUDEZ, E. G.; ROSA-FREITAS, M. G. Aspects related to productivity for four generations of a *Lutzomyia longipalpis* laboratory colony. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 2, p. 251-257, 2000.

MODI, G. B.; TESH, R. B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 20, n. 5, p. 568-569, 1983.

READY, P. D. The feeding habits of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 14, n. 5, p. 545-552, 1978.

READY, P. D. Factors affecting egg production of laboratory bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 16, n.5, p. 413-423, 1979.

SHERLOCK, I. A.; SHERLOCK, V.A. Criação e biologia em laboratório, do “*Phlebotomus longipalpis*” Lutz & Neiva, 1912 (Diptera Psychodidae). **Revista Brasileira Biologia**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 229-250, 1959.

SHERLOCK, I. A.; SHERLOCK, V.A. Métodos práticos para criação de flebotomíneos em laboratório. **Revista Brasileira Biologia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 209-217, 1972.

TEODORO, V. et al. Flebotomíneos em área de transmissão de LT na região norte do estado do Paraná-Brasil: variação sazonal e atividade noturna. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 27, p. 190-194, 1993.

WERMELING, E. D.; ZANUNCIO, J. C. Development of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) larvae in different

diets. **Brazilian Journal Biology**, São Carlos, v. 61, n. 3, p. 405-408, 2001.

7 - CONCLUSÕES GERAIS

O município de Imperatriz, região Sudoeste do Estado de Maranhão, Brasil apresenta alta prevalência de cães sororreagentes para Leishmaniose Visceral, principalmente na faixa etária compreendida de dois a quatro anos.

IgG1 e IgG2 aumentam significativamente nos cães oligossintomáticos e polissintomáticos, como também estão presentes nos cães sintomáticos com exame parasitológico de medula e pele positiva para Leishmaniose Visceral Canina.

Nas áreas endêmicas, a avaliação dos sinais clínicos é importante para confirmação do diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina.

A contaminação bacteriana e fúngica é um entrave na colonização de flebótomos.

APÊNDICE

APÊNDICE

**PROJETO DE PESQUISA
UEMA/FUNASA/CCZ
Departamento de Ciências/Laboratório de Biologia
Município de Imperatriz - MA**

REQUISIÇÃO PARA O DIAGNOSTICO DE LEISHMANIOSE

Nome do animal:.....Idade:..... Sexo: M () F ()
Proprietário do animal:.....
Endereço:.....Nº:.....
Complemento:.....Bairro:..... Telefone:.....
Raça: Data:..... OBS:.....

INFORMAÇÕES CLÍNICAS

Alopecia	()	Diarréia	()
Falta de apetite	()	Perda de peso	()
Presença de úlceras	()	Conjuntivite	()
Grifose	()	Distensão abdominal	()
Claudicação	()	Hemorragia	()

Outros Sintomas:

.....
.....
.....
.....

Procedência do exame: Parasitológico () IFI () RPL () RPI ()
ELISA () PMI () PME ()
Outros:()

ANEXOS

ANEXO B
MAPA DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ