

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANDRESSA ALMEIDA SANTANA

**FATORES EPIDEMIOLÓGICOS ASSOCIADOS E NOVAS ABORDAGENS
DIAGNÓSTICAS PARA LEISHMANIOSE E BABESIOSE CANINA NO MUNICÍPIO
DE SÃO LUÍS-MA, BRASIL.**

São Luís- MA
2011

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANDRESSA ALMEIDA SANTANA

**FATORES EPIDEMIOLÓGICOS ASSOCIADOS E NOVAS ABORDAGENS
DIAGNÓSTICAS PARA LEISHMANIOSE E BABESIOSE CANINA NO MUNICÍPIO
DE SÃO LUÍS-MA, BRASIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, como parte do requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia

Orientadora: prof^a Dra Ana Lucia
Abreu-Silva

São Luís- MA
2011

Santana, Andressa Almeida.

Fatores epidemiológicos associados e novas abordagens diagnósticas para Leishmaniose e Babesiose canina no Município de São Luis – MA, Brasil / Andressa Almeida Santana.– São Luís, 2012.

91 f

Tese (Doutorado) – Curso de Biotecnologia Renorbio, Universidade Estadual do Maranhão, 2012.

Orientador: Profa. Dr^a. Ana Lucia Abreu-Silva.

1. Leishmaniose. 2. Babesiose. 3. Epidemiologia. 4. Diagnostico molecular. I.Título

CDU: 616.993.61: 636.7



renorbio
rede nordeste de biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Estadual do Ceará
Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi

60700-000, Fortaleza-CE - Telefone: (85) 3101.9645 - E-mail: renorbio@uece.br



ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna ANDRESSA ALMEIDA SANTANA. Aos vinte e nove dias do mês de julho do ano de dois mil e onze, às 9h, reuniu-se a banca de Defesa de Tese composta pelos Professores Doutores Ana Lúcia Abreu Silva, Universidade Estadual do Maranhão, Presidente, Celeste da Silva Freitas de Souza, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Ferdinan Almeida Melo, Universidade Estadual do Maranhão, Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, Universidade Federal do Maranhão e Alcina Vieira de Carvalho Neta, Universidade Estadual do Maranhão, perante a qual **ANDRESSA ALMEIDA SANTANA**, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Maranhão, defendeu, para preenchimento do requisito de doutor, sua Tese intitulada **“FATORES EPIDEMIOLÓGICOS ASSOCIADOS E NOVAS ABORDAGENS DIAGNÓSTICAS PARA LEISHMANIOSE E BABESIOSE CANINA NO MUNICÍPIO DE SÃO LUÍS-MA, BRASIL.** A defesa da referida tese ocorreu, das 9h às 11:35, tendo a doutoranda sido submetido à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda aprovada por sua tese e, sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito satisfatório.

Eu, Ana Lúcia Abreu Silva, que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em São Luís, 29 de julho de 2011.

Ana Lúcia Abreu Silva
Profª. Drª. Ana Lúcia Abreu Silva – UEMA
(Orientadora)

Celeste da Silva Freitas de Souza
Profª. Drª. Celeste da Silva Freitas de Souza –
IOC/Fiocruz RJ
(Examinadora)

Ferdinan Almeida Melo
Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo – UEMA
(Examinador)

Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento
Profª. Drª. Maria do Desterro Soares B. Nascimento
- UFMA
(Examinadora)

Alcina Vieira de Carvalho Neta
Profª. Drª. Alcina Vieira de Carvalho Neta
- UEMA
(Examinadora)

*Aos meus pais,
Orlando e Socorro, motivos
para que eu nunca perdesse
a esperança.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, “por que dele, e por meio dele e para ele são todas as coisas”.Agradeço pelas respostas e bênçãos em forma de situações e pessoas especiais em minha vida nesses anos tão singulares.

A Prof^a Ana Lucia Abreu Silva, pelas orientações e exemplo que levarei pela vida.

A Prof^a Alcina Vieira de Carvalho Neta, pela paciência e ensinamentos nos caminhos da Biologia Molecular.

Ao prof. Lívio Martins Costa-Júnior, pelas valiosas contribuições.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão, onde foi desenvolvido o presente projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia.

A Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES pelos auxílios concedidos.

Ao Mestrado de Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Maranhão e a Caroline Romão, pelas coisas “desenroladas”.

Ao Núcleo Tarcísio Pimenta de Genômica e Bioinformática – NUGEN, professora Diana Magalhães e alunos.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Estadual do Maranhão e as pessoas tão especiais que estão ou já estiveram ligadas a ele e contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, compartilhando conhecimento, ensinando técnicas, ajudando no trabalho pesado, “distribuindo” conselhos ou mesmo um necessário sorriso nos momentos de estresse: Elaine Leão, David Soeiro, Tiago Barbalho, Leo Frasson, Aline Oliveira, Ana Patrícia Silva, Marllon Breno, prof. Fábio Henrique, prof. Ferdinan Melo, Daniel Cardoso, Alessandra Rocha, Gabriel Xavier, Mysa Gonçalves, Silvana Silva, Jairo Melo, Aline Teixeira e Gláucia Barbosa e Solange Melo.

Aos professores presentes na qualificação, professoras Maria do Desterro Nascimento, professora Flávia Nascimento, professor Ferdinan Melo e professora Rita Candanedo Guerra pelas valiosas contribuições.

A Nancyleni Chaves e Michele Oliveira pelo indispensável auxílio na estatística.

A Leonardo Frasson e Aline Oliveira irmãos que conheci em adulta e que me apresentaram à professora Ana Lucia.

A Nataly Siqueira e Herminio Lima pelas palavras de incentivo, fé, esperança. Pela boa conversa, amizade e exemplo de que há coisas que o tempo não destrói.

A Alessandra Rocha, pelo interesse e carinho em dias difíceis.

A Tiago Barbalho pelo desprendimento e ajuda sem a qual muito teria sido perdido.

A Kátia Calabrese e Celeste Souza, pelo incentivo e ótimos conselhos que não segui mesmo sabendo que deveria ter feito.

A Igor Dias, pelo amor, cuidado, compreensão e paciência. Por tantas vezes que me mandou parar de besteira e ir estudar, pelo incentivo e visão para não enxergar apenas o óbvio. A Magnólia Dias e Teresa Albuquerque (*in memoriam*) pelo carinho, incentivo e preocupação.

A Annie e Guilherme Santana, meus irmãos, dos quais desejo estar mais perto.

Aos amigos Mauro Correa, Allan Correa, Rodrigo Netto, Rodrigo Barroso, Daniela Barros e Suhelen Aragão pelo apoio, amizade e pelo bom desempenho na difícil tarefa de entender tanto “não”, “não posso”, “não dá”.

*“Fácil é ver o que queremos
enxergar...*

*Difícil é saber que nos iludimos
com o que achávamos ter
visto.”*

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO DA BABESIOSE CANINA E LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Autor: Andressa Almeida Santana

Orientador: Ana Lucia Abreu-Silva

Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

São Luís, julho de 2011

A babesiose canina e a leishmaniose visceral canina são doenças transmitidas por vetores, sendo os cães competentes reservatórios e fonte alimentar dos artrópodes envolvidos. *Babesia canis vogeli*, é um parasita intraeritrocitário transmitido pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. *Leishmania infantum* (sin. *Leishmania chagasi*) transmitidos a mamíferos pela picada dos flebotomíneos (*Lutzomyia longipalpis*), infectando macrófagos do Sistema Fagocítico Mononuclear do hospedeiro. O presente trabalho é dividido em capítulos e os resultados encontrados mostraram que a leishmaniose visceral canina ainda é endêmica no município de São Luís, e que apesar disso a taxa de coinfecção com *Babesia* foi baixa. Também foi observado que a raça Yorkshire terrier, dentre as raças estudadas, apresentou maior predisposição para contrair a infecção por *B. canis vogeli*. Outro resultado significativo foi a ocorrência de lesões oculares associadas à infecção por *L. infantum*.

Palavra chaves: leishmaniose visceral canina, babesiose canina, diagnóstico molecular, epidemiologia e coinfecção.

ABSTRACT

EPIDEMIOLOGY AND DIAGNOSE OF CANINE BABESIOSIS AND CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

Autor: Andressa Almeida Santana

Orientador: Ana Lucia Abreu-Silva

Programa de Pós Graduação em Biotecnologia

São Luís, julho de 2011.

Canine babesiosis and canine visceral leishmaniasis (CVL) are vector borne diseases, where dogs exert a play as reservoir or source for arthropods responsible by the transmission of these protozoosis. *Babesia canis vogeli*, is transmited by tick *Rhipicephalus sanguineus* while *Leishmania infantum* (sin. *Leishmania chagasi*) is transmited by sand fly (*Lutzomyia longipalpis*). The results showed that CVL remains endemic in São Luís Municipality. Despite that the coinfection between *Leishmania* and *Babesia* was low considering that both diseases are endemic in this tropical area. Beside that was observed that Yorkshire terrier presented higher predisposition to acquire the infection by *B. canis vogeli*. A remarkable result was the occurrence of ocular lesions associated to *L. infantum* infection.

Key words: *Canine visceral leishmaniasis, canine babesiosis, molecular diagnostics, epidemiology and coinfection.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 <i>Babesia</i>	14
2.1.1 Babesiose canina.....	16
2.1.1 Clínica e Diagnóstico da Babesiose canina	17
2.2 <i>Leishmania</i>	19
2.2.1 Leishmaniose visceral canina	20
2.2.2 Clínica e diagnóstico da leishmaniose visceral canina	21
3.REFERÊNCIAS	23
4.OBJETIVOS	29
5.CAPITULO I SOROPREVALÊNCIA E VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA ENDÊMICA NO MUNICÍPIO DE SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRASIL.....	31
6. CAPITULO II HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL ANALYSIS OF SKIN, SPLEEN, LYMPH NODE AND EYE LESIONS IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH VISCERAL LEISHMANIASIS.....	51
7.CAPÍTULO III FACTORS ASSOCIATED WITH SEROPREVALENCE OF CANINE BABESIOSIS CAUSED BY <i>Babesia vogeli</i> IN PURE BREED DOGS	65
8.CAPITULO IV CO-INFECTION OF <i>Leishmania infantum</i> AND <i>Babesia canis vogeli</i> IN DOGS FROM URBAN AND RURAL AREA IN NORTHEASTERN BRAZIL.	78
9.CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Distrito do Tirirical, São Luís, Maranhão, Brasil.....	37
FIGURA 1A Amastigote of <i>Leishmania</i> in macrophage from bone marrow (bar 25 µm) Giemsa stain.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Algumas espécies de <i>Babesia</i> , seus hospedeiros vertebrados e distribuição mundial. UILENBERG (2006), adaptado.....	15
TABELA 1 Taxa de prevalência e variáveis epidemiológicas associadas à soropositividade canina para <i>Leishmania</i> spp. no distrito do Tirirical, São Luís, Maranhão.....	42
TABLE Results obtained in LDU analysis in polysymptomatic dogs.....	57
TABLE Prevalence rates, and factors associated with <i>Babesia vogeli</i> infections in pure breed dogs living in São Luis Island of Maranhão, Brazil, 2008.....	71
TABLE 1. Results of PCR assays for <i>Leishmania infantum</i> and <i>Babesia canis vogeli</i> and co-infection in canine from urban and rural area.....	89
TABLE 2. Univariate analysis for <i>Leishmania infantum</i> , <i>Babesia canis vogeli</i> and co-infection in canine from urban and rural area.....	90

1 INTRODUÇÃO

Agentes causadores de doenças, dentre eles, vírus, bactérias e protozoários, podem ser transmitidos por artrópodes, incluindo mosquitos, ixodídeos e flebotomíneos, causando doença no cão (*Canis familiaris*) e outros vertebrados que lhes possam servir de hospedeiros (CARDOSO *et al.*, 2010).

A necessidade de estudo dessas patologias faz-se da proximidade do homem com esses hospedeiros domésticos e possibilidade de servirem como fontes de infecção. A compreensão de fatores ligados ao risco de infecção e o desenvolvimento de técnicas diagnósticas é extremamente importante para se estimar a verdadeira magnitude dessas doenças que acometem milhares de cães anualmente, o que tem despertado na população uma busca de mecanismos que evitem a morte precoce desses animais, que a cada dia tem criado um vínculo afetivo maior com seus eproprietários.

A babesiose e a leishmaniose estão entre as doenças mais prevalentes em cães, encontradas na Europa, África, América do Sul e do Norte, associadas principalmente a climas quentes (MAURÍCIO *et al.*, 2000; O'DWYER, *et al.*, 2001; CACCIÒ *et al.*, 2002; REITHINGER & DUJARDIN, 2007). Existem poucos estudos relacionados com a coinfeção dessas parasitoses e são poucos os dados sobre a babesiose canina no estado do Maranhão, o que justifica a realização do presente trabalho, que consta de quatro capítulos que abordam aspectos epidemiológicos, diagnóstico, coinfeção por *Leishmania chagasi* e *Babesia canis vogeli* e estão no formato de artigos, tais como foram submetidos à publicação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Babesia*

Babesia spp. são parasitos intraeritrocitários do filo Apicomplexa que tem como vetores diversas espécies de carrapatos e infectam um grande número de hospedeiros, dentre estes animais domésticos e silvestres (KUTTLER *et al.*, 1988; DANTAS-TORRES & FIGUEIREDO, 2006). Esses parasitas são inoculados na forma de esporozoítos no vertebrado no momento do repasto do vetor (MEHLHORN *et al.*, 1980). No hospedeiro vertebrado acontece a reprodução assexuada por divisão binária no interior dos eritrócitos. Quando os eritrócitos infectados por *Babesia* spp. são ingeridos por carrapatos, a maior parte dos parasitas é destruída ou degenera-se. Entretanto, alguns estágios específicos do parasita sobrevivem e passam por um maior desenvolvimento até evoluir em gametócitos. (MEHLHORN *et al.*, 1980; KAKOMA & MEHLHORN, 1994, CHAUVIN *et al.*, 2009).

São descritas várias espécies de *Babesia* capazes de causar infecção em animais domésticos e silvestres em várias regiões do mundo, relacionadas com hospedeiros – vertebrado e invertebrado – específicos (tabela 1). (KAKOMA & MEHLHORN, 1994; BOOZER & MACINTIRE, 2003; UILENBERG, 2006, CHAUVIN *et al.*, 2009).

Tabela 1 Algumas espécies de *Babesia*, seus hospedeiros vertebrados e distribuição mundial. UILENBERG (2006), adaptado.

ESPÉCIE	HOSPEDEIROS	DISTRIBUIÇÃO
<i>Babesia bigemina</i>	bovinos, bubalinos	África, America, Ásia, Austrália, Europa
<i>Babesia bovis</i>	bovinos, bubalinos	África, America, Ásia, Austrália, Europa
<i>Babesia occultans</i>	bovinos	África
<i>Babesia divergens</i>	bovinos	Europa
<i>Babesia major</i>	bovinos	Europa
<i>Babesia gibsoni</i>	Cães	Europa, América, África e Ásia.
<i>Babesia ovata</i>	bovinos	Ásia
<i>Babesia crassa</i>	ovinos, caprinos	Ásia
<i>Babesia motasi</i>	ovinos, caprinos	África, Ásia, Europa
<i>Babesia ovis</i>	ovinos, caprinos	África, Ásia, Europa
<i>Babesia caballi</i>	eqüinos	África, América, Ásia, Europa
<i>Babesia perroncitoi</i>	suínos	África, Europa
<i>Babesia canis</i>	Cães	América, Europa
<i>Babesia microti</i>	roedores	Europa, América,

2.1.1 Babesiose canina

A babesiose canina tem distribuição mundial e relevância na clínica de pequenos animais e tem como agentes etiológicos *Babesia gibsoni* e *Babesia canis* que apresentam ampla distribuição geográfica (DANTAS-TORRES, 2008; IRWIN, 2009). Sua maior prevalência se encontra nas zonas tropicais e subtropicais, provavelmente motivada por condições propícias ao vetor (TABOADA *et al.*, 1992).

A *Babesia gibsoni* tem sido encontrada na Europa (CASAPULLA *et al.*, 1998), Ásia, América do Norte, norte e leste da África (KJEMTRUP *et al.*, 2000), e Brasil (TRAPP *et al.*, 2006). É uma pequena babesia, com tamanho de 1,0 µm x 3,2 µm, que se apresenta como formas isoladas no interior dos eritrócitos. A *Babesia canis*, um parasito do grupo das grandes babesias (tamanho de 2,4 µm x 5,0 µm), é visualizada aos pares no interior das hemácias e encontrada em cães na Europa, África e América. Os parasitos diferem ainda quanto à patogenicidade e vetores, sendo a *B. gibsoni* transmitida pelos carrapatos *Haemaphysalis bispinosa* e *Rhipicephalus sanguineus* e a *B. canis* pelo *R. sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* e *Haemaphysalis leach*.

Há três subespécies descritas de *B. canis*, segundo Bicalho, *et al.*, 2002 e Boozer & Macintire, 2003:

- a. *Babesia canis rossi*, tendo o carrapato *H. leachi* como vetor e que ocorre principalmente na África do Sul, tem alta patogenicidade e sua infecção pode ser fatal;

- b. *Babesia canis canis*, de patogenicidade branda, transmitida pelo *D. reticulatus* na Europa; e
- c. *Babesia canis vogeli*, transmitida pelo *R. sanguineus* em regiões tropicais e subtropicais sendo a mais encontrada em território brasileiro, causando infecções moderadas.

No Brasil o *R.sanguineus* é descrito mais facilmente parasitando cães em ambiente urbanos. Em meio rural ou semi-urbano, predomina carrapatos do gênero *Amblyomma* (LABRUNA & PEREIRA, 2001). Existe uma alta prevalência de cães parasitados por carrapatos transmissores (*R. sanguineus*) no Nordeste, contrastando com poucos estudos com o objetivo de conhecer aspectos epidemiológicos ou determinar fatores de risco de *B. canis*, bem como caracterização molecular deste parasito. Guerra & Brito (2004), confirmam no município de São Luís a presença do carrapato *R. sanguineus* parasitando cães.

2.1.2 Clínica e diagnóstico da babesiose canina

A doença pode apresentar quadros subclínico, superagudo, agudo ou crônico. Os sinais clínicos são vagos, incluindo letargia, fraqueza, esplenomegalia, linfadenopatia, vômitos, anorexia e febre. Sinais mais específicos, tais como palidez de mucosas, icterícia, esplenomegalia, e manchas escuras da urina, costuma indicar um processo hemolítico. A clínica da babesiose não é característica, tornando-se necessário o diagnóstico diferencial com parasitos que desenvolvem quadros clínicos com febre, anemia, anorexia, letargia, linfadenopatia e esplenomegalia

(*Leptospira* spp, parasitos da família Anaplasmataceae e *Leishmania chagasi*). Desta forma, para um diagnóstico específico e definitivo é necessária a identificação do agente etiológico (IRWIN, 2009).

O diagnóstico é feito pela visualização do parasito em esfregaços sanguíneos, dentro de eritrócitos ou livres no plasma. (UNGAR DE SÁ *et al.*, 2007). A detecção de anticorpos anti-*Babesia* por ELISA ou Reação de Imunofluorescência também é empregada, sendo relatados reação cruzada entre *B. canis* e *B. gibsoni*, o que, em algumas regiões de ocorrência das duas espécies de *Babesia*, pode tornar a técnica não-recomendável por mais simples e sensível que possa ser. (TABOADA, 1992; BOOZER & MACINTIRE, 2003; PASSOS *et al.*, 2005).

As ferramentas moleculares para a detecção de fragmentos de DNA do parasito, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), possuem alta sensibilidade e especificidade servem para infecções subclínicas, agudas ou crônicas, além diferenciar as espécies do gênero *Babesia* mesmo com baixa parasitemia (SÁ, 2006). A PCR também pode ser utilizada para monitoramento de terapia, detecção de animais portadores de *Babesia* spp. e em estudos epidemiológicos sobre sua distribuição geográfica (MARTINODE *et al.*, 1986; FUKUMOTO *et al.*, 2001; MACINTIRE *et al.*, 2002). No ano de 2005, Passos realizou a primeira detecção molecular de *B. canis vogeli* no Brasil a partir do fragmento 18S do rDNA de amostras urbanas de Minas Gerais e São Paulo.

2.2 *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*), são agentes etiológicos das leishmanioses, transmitidos a mamíferos durante a picada dos flebotomíneos. Consideradas primariamente como antroponozoonoses, são um importante problema de saúde pública, encontrando-se atualmente entre as doenças tropicais prioritárias pela Organização Mundial de Saúde (ASHFORD, 1998; REITHINGER & DUJARDIN, 2007).

Os parasitos possuem formas morfollogicamente distintas: promastigotas, paramastigotas e amastigotas, que se desenvolvem respectivamente em dois hospedeiros diferentes, um inseto e um vertebrado. As formas amastigotas parasitam as células do Sistema Fagocítico Mononuclear dos hospedeiros vertebrados, enquanto as formas promastigota e paramastigota, ligam-se através de seus flagelos ao epitélio do trato digestório dos flebotomíneos que se infectaram ingerindo macrófagos parasitados presentes na derme do hospedeiro vertebrado. Em um período de tempo que varia entre 24 a 48 horas após a ingestão das amastigotas, estas transformam-se em promastigotas que, após reproduzirem-se no intestino dos insetos migram para o esôfago e a faringe. Em um próximo repasto sanguíneo essas formas serão regurgitadas na derme do hospedeiro vertebrado, serão fagocitadas pelos macrófagos, se transformarão em amastigotas, se reproduzirão e romperão as células hospedeiras para, no meio extracelular, serem fagocitadas por outros macrófagos (HANDMAN & BULLEN, 2002; KAMHAWI, 2006).

2.2.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral tem como agente etiológico a *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, sendo o *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie vetora (MOREIRA, 2007).

É uma doença de notificação compulsória, com altas taxas de incidência e letalidade, sendo endêmica em países da Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas. Na América Latina, a doença é encontrada em pelo menos 12 países, com a maioria dos casos provenientes do Brasil (GONTIJO & MELO, 2004).

No Brasil, a doença apresenta ampla distribuição territorial, com aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados. Embora seja uma doença predominantemente rural, tem-se estabelecido em áreas urbanas ou periurbanas, onde o vetor encontra as condições ambientais propícias para o seu desenvolvimento. Os registros dos casos revelam que está ocorrendo um processo de urbanização da LV no Brasil em cidades como São Luís (MA), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Natal (RN), Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), Palmas (TO) (PA), Sobral (CE), Jacobina (BA), Camaçari (BA) e Corumbá (MS) (BEVILACQUA *et al.*, 2001; GONTIJO & MELO, 2004).

A leishmaniose visceral de forma epidêmica no Maranhão ocorreu a partir de 1982, na cidade de São Luís, no Bairro do Tirirical, com registro de 1089 casos humanos da doença em 15 anos, período em que recebeu grande fluxo migratório oriundo em parte do deslocamento de lavradores de Estados vizinhos, como pelo

êxodo de famílias que viviam na zona rural do Maranhão (MENDES *et al* 2002), havendo expansão para outras áreas da Ilha de São Luís, como São José de Ribamar e Paço do Lumiar. A partir de 1988, a doença passou por uma segunda fase da epidemia, com franca expansão para áreas suburbanas da Ilha de São Luís, período em que o Maranhão transformou-se em um dos Estados com áreas de maior problema em relação à leishmaniose visceral no país (COSTA *et al.*, 1995).

A LV é mais frequente na população canina que em humanos. Os casos caninos normalmente precedem os casos humanos e a presença de parasitos na pele dos cães favorece a infecção de vetores (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997; SHAW, 2007; TOLEZZANO *et al.*, 2007). A prevalência da LV canina em áreas endêmicas pode atingir 20 a 40% desta população (SWENSON *et al.*, 1988).

2.2.2 Clínica e diagnóstico da leishmaniose canina

A sintomatologia canina engloba sintomas como linfadenopatia, perda de peso, lesões cutâneas, úlceras na orelha, onicogribose, ceratite, conjutivite. Os animais também podem permanecer assintomáticos por longos períodos, (MARZOCHI *et al*, 1985; BERRAHAL, 1996; FERRER, 1999; MOREIRA, 2007; DIAS *et al.*, 2008).

O diagnóstico clínico da doença pode causar dificuldade pelo grande percentual de cães assintomáticos ou com poucos sintomas aparentes. A doença apresenta semelhança com outras enfermidades infecto-contagiosas que acometem

os cães, como dermatoses e a fatores associados como desnutrição, o que pode mascarar ou modificar o quadro de leishmaniose visceral canina. Porém, o diagnóstico clínico é possível quando o animal apresenta sinais clínicos comuns à doença e estiver relacionado com áreas de transmissão conhecidas.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado através da detecção do parasita pela visualização de formas amastigotas de *Leishmania* sp em esfregaços de aspirado de baço, medula óssea e linfonodo (SANTA ROSA & OLIVEIRA, 1997). Técnicas baseadas na reação antígeno-anticorpo, que incluem imunofluorescência e técnicas imunoenzimáticas (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), têm sido utilizadas para demonstrar a presença de anticorpos anti-*Leishmania*, porém com a possibilidade de reação cruzada com *Leishmania braziliense* e *Trypanosoma cruzi*. A histoquímica (HE) e a imunoistoquímica (IMIQ)- em tecidos de órgãos, como o baço, linfonodo e fígado – a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), realizada em amostras de sangue pele e conjuntiva tem apresentado melhores resultados (MANNA, 2004; XAVIER, 2006, MOREIRA, 2007).

REFERÊNCIAS

- 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. *Am J Trop Med Hyg*, v. 59, p. 53–57, 1998.
- BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by PCR and immunoblotting. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, v. 55, n. 3, 273-274, 1996.
- BEVILACQUA, P. D. *et al.* Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, n.1, p. 1-8, 2001.
- BICALHO, K. A.; PASSOS, L. M. F; RIBEIRO, M. F. B. Infecção experimental de cães com amostras de *Babesia canis* isoladas em Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, n.5, 2002.
- BOOZER, A. L. & MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v. 33, p. 885–904, 2003.
- CACCIÒ, S. M. *et al.* Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 106, p. 285-92, 2002.
- CARDOSO L., *et al.* Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *The Veterinary Journal*, v. 183, p. 232–233, 2010.

CASAPULLA, R. et al. Canine piroplasmosis due to *Babesia gibsoni*: Clinical and morphological aspects. *The Veterinary Record*, v.142, p. 168–169,1998.

CHAUVIN, A. et al Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission .*Vet. Res.* v. 40, p.37-55, 2009.

COSTA, J. M. Leishmaniose Visceral no Estado do Maranhão, Brasil. A Evolução de uma Epidemia. *Cadernos de Saúde Pública* v. 11, n.2, p. 321-324, 1995.

DANTAS-TORRES F. & FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: A Brazilian perspective.*Vet.Parasitol.*, v. 141, n. 3-4, p.197-203, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*, v.1, p. 25, 2008.

DIAS, E. L. et al. Leishmaniose Visceral Canina (LVC): Soroprevalência, aspectos clínicos, hematológicos e bioquímicos de cães naturalmente infectados em uma área endêmica no município de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 3 , p. 740-745, 2008.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From canine leishmaniasis update (Ed. R. Killick-Kendrick). In: *THE CANINE LEISHMANIASIS FORUM*, 1999, Barcelona. Proceedings. Barcelona, v. 28-31, p. 6-10,1999.

FUKUMOTO, S. et al. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 63, p. 977-81, 2001.

- GONTIJO, C. M. F. & MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Bras. Epid.*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
- GUERRA, R. M. S. N. C. & BRITO, D. R. B. Ixodofauna de mamíferos domésticos da ilha de São Luís, MA. *Entomologia y Vectores*, v.11, n.3, p. 435-444, 2004.
- HANDMAN, E., BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.*, v.18, n.8, p.332–334, 2002.
- IRWIN P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, v. 2, n.1:S4, 2009.
- KAKOMA, I. & MEHLHORN, H. Babesia of Domestic Animals. *Parasitic Protozoa*, v. 7, p.141-216, 1994.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.*, v.22, n.9, p. 439-445, 2006.
- KJEMTRUP, A. M. et al. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *International Journal of Parasitology*, v. 30, p. 1501–1505, 2000.
- KUTTLER, K. L. et al. Serologic response of *Babesia equi*-infected horses as measured by complement-fixation and indirect fluorescent antibody tests. *Veterinary Parasitology*, v. 26, n.3-4, p.199-205, 1988.
- LABRUNA, M. B. & PEREIRA, M. C. Carrapato em cães. *Clin. Vet.*, v. 6, p. 24-32, 2001.
- MACINTIRE, D. K. et al. *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 220, p. 325-9, 2002.

MANNA, L. *et al.* Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* V. 125, n. 3-4, 2004.

MARTINODE, S.; LAURENT, N.; MOREAU, Y. Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, v. 19, n. 3-4, p. 245- 54, 1986.

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*, v.80, p. 349-357, 1985.

MAURÍCIO, I. L.; STOHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, v.16, p.188-99, 2000.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E.; VOIGT, W. P. Light and electron microscopic study on developmental stages of *Babesia canis* within the gut of their ticks *Dermacentor reticulatus*. *J. Parasitol.* v. 66, p.220-230, 1980.

MENDES, W.S. *et al.* Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luís, Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 3, p. 227-231, 2002.

MOREIRA, M. A. B. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet. Parasitol.*, v. 145, n. 3-4, p. 245-252, 2007.

O'DWYER L.H.; MASSARD C.L.; SOUZA J.C.P. Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.94, p.143–150, 2001.

PASSOS, L. *et al.* First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.127, p. 81–85, 2005.

REBÊLO, J. M. M. *et al.* Flebótomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São Luis, zona do Golfão Maranhense, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* v.32, n. 3 p.247-253,1999.

REITHINGER, R. & DUJARDIN J. C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.

SÁ, A. G. *et al.* Detection and Molecular Characterization of *Babesia canis vogeli* from Naturally Infected Brazilian Dog. *Intern J Appl Res Vet Med*, v. 4 n. 2, 2006.

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

SHAW, J. The leishmaniasis - A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SWENSON, C. L.; SILVERMAN, J.; STROMBERG, P. C. Visceral leishmaniasis in an english foxhound from an Ohio research colony. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 193, n. 9, p. 1089- 1092, 1988.

TABOADA, J. *et al.* Soroprevalence of babesiosis in Grey-hounds in Florida. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 200, n. 1, p. 47-50, 1992.

TOLEZZANO, J. E. *et al.* The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis

from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 149, p. 280–284, 2007.

TRAPP, S. M. *et al.* *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 141, p. 177–180, 2006.

UILENBERG, G. Babesia—A historical overview. *Veterinary Parasitology*, v. 138, p. 3–10, 2006.

UNGAR DE SÁ, M. F. M. *et al.* Estudo retrospectivo (1991-2005) dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção*, v.8, n.3, p. 178-183, 2007.

XAVIER, S. C. *et al.* Comparison of paraffin – embedded skin biopses from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection dog using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BCM Veterinary Research*, v. 2, n.17, p. 1-7, 2006.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Estudar a epidemiologia e coinfecção da leishmaniose visceral e babesiose em cães do Município de São Luís, Estado do Maranhão.

4.2 Específicos

Determinar a taxa de coinfecção entre *L. chagasi* e *B.canis vogeli*

Identificar fatores associados a leishmaniose e babesiose no município de São Luís;

Identificar as principais lesões em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*.

CAPÍTULO I

SOROPREVALÊNCIA E VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS ASSOCIADAS À
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA ENDÊMICA NO MUNICÍPIO
DE SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRASIL

DAVID SOEIRO¹ BARBOSA, ALESSANDRA LIMA ROCHA², ANDRESSA
ALMEIDA SANTANA³, CELESTE DA SILVA FREITAS DE SOUZA⁴, RICARDO
AUGUSTO DIAS⁵, LÍVIO MARTINS COSTA-JÚNIOR⁶, ANA LÚCIA ABREU-
SILVA⁷

1. Pós-graduando da Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz
2. Graduanda do Curso de Medicina Veterinária da UEMA
3. Pós-graduanda da Rede Nordeste de Biotecnologia – Renorbio
4. Tecnologista em Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz
5. Professor doutor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP
6. Professor doutor do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais/UFMA
7. Professora doutora do Centro de Ciências Agrárias/UEMA.

Ciência Animal Brasileira

Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/5933/8620>

RESUMO

SOROPREVALÊNCIA E VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS ASSOCIADAS À
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM ÁREA ENDÊMICA NO MUNICÍPIO
DE SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRASIL

Este trabalho teve como objetivos determinar a soroprevalência e as variáveis epidemiológicas associadas com a infecção de *Leishmania* spp. em cães de cinco localidades no Distrito do Tirirical no município de São Luís, Maranhão. Foram visitadas 72 moradias, perfazendo uma amostra de cem cães domiciliados, e aplicados questionários com o objetivo de determinar os fatores que poderiam estar relacionados com a ocorrência da infecção. Utilizaram-se como variáveis: proximidade da moradia com a mata, existência de criação/abrigo de animais de produção e de animais silvestres, sexo, idade, raça, além de exame clínico do animal, com observação da presença de sinais clínicos compatíveis com a doença. A análise sorológica demonstrou que 67 amostras apresentaram-se positivas para *Leishmania* spp. Os sinais clínicos observados foram linfadenopatia localizada, alopecia, pelo opaco, emagrecimento, úlceras cutâneas, descamação furfurácea, ceratoconjuntivite, e onicogrifose. Animais das localidades Cruzeiro de Santa Bárbara e Cajupari, ambas localizadas próximas de matas, têm 3,4 e 12,0 vezes mais chances de serem soropositivos para *Leishmania* spp. do que aqueles das outras localidades estudadas. Não se verificou correlação entre as outras variáveis estudadas e soropositividade para *Leishmania* spp.

PALAVRAS-CHAVES: Epidemiologia, fatores associados, leishmaniose visceral canina, soroprevalência.

ABSTRACT

SEROPREVALENCE AND ASSOCIATED EPIDEMIOLOGIC VARIABLES WITH CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS IN ENDEMIC AREA, SÃO LUIS, MARANHÃO STATE, BRAZIL

This work aimed to determine the seroprevalence and epidemiological variables associated to *Leishmania* spp. infection in dogs from five locations of Tirirical District, in São Luís, Maranhão State, Brazil. Seventy-two houses were visited and samples of one hundred dogs were taken. A questionnaire was applied in order to investigate the possible factors related to the *Leishmania* infection. The following variables were used: forest proximity from the residence, livestock of domestic animals or shelter of wild animals, sex, age and breed. Clinical examination was also performed looking for clinical signs compatible to the infection. The serological analysis revealed that 67 samples were reactive. The clinical signs observed were focal lymphadenopathy, alopecia, weight loss, cutaneous ulcers, skin desquamation, keratoconjunctivitis and onychogriphosis. Animals from Cruzeiro de Santa Bárbara and Cajupari, both locations near the forest, have 3.4 and 12.0 more chances of being reactive to *Leishmania* spp. than the ones in the other studied locations. No statistical relation was found between seropositive dogs and any other variables.

KEYWORDS: Associated factors, canine visceral leishmaniasis, epidemiology, seroprevalence.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, consideradas primariamente como zoonoses. Constituem-se importantes problemas de saúde pública, encontrando-se atualmente entre as doenças tropicais prioritárias da Organização Mundial de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A leishmaniose visceral (LV) tem como agente etiológico, no Novo Mundo, a espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo *Lutzomyia longipalpis* o principal transmissor da doença no Brasil (MENDES *et al.*, 2002). É uma doença de notificação compulsória, que apresenta taxas elevadas de incidência e letalidade, sendo endêmica em 62 países, com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob risco de infecção. Sua distribuição ocorre na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas. Na América Latina a doença já foi descrita em pelo menos doze países, com a maioria dos casos provenientes do Brasil (GONTIJO & MELO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No Brasil, a doença apresenta ampla distribuição territorial, com aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados. Atualmente vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte, mudando seu perfil epidemiológico, antes eminentemente rural. Sua distribuição geográfica abrange as regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste, sendo esta última a que apresenta a maioria dos casos notificados no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Estudos têm relatado a ocorrência de casos de LV canina

na Região Sul do país (POCAI *et al.*, 1998; KRAUSPENHAR *et al.*, 2007; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2009).

O estabelecimento da LV como epidemia no Maranhão ocorreu a partir de 1982, na cidade de São Luís, em uma extensão do Bairro do Tirirical, com registro de 1.089 casos em quinze anos, período em que recebeu grande fluxo migratório oriundo em parte do deslocamento de lavradores de Estados vizinhos, em virtude do êxodo de famílias que viviam na zona rural do Maranhão (MENDES *et al.*, 2002). Posteriormente houve expansão para outras áreas da Ilha de São Luís, como São José de Ribamar e Paço do Lumiar. A partir de 1988, a doença passa por uma segunda fase da epidemia, com franca expansão para áreas suburbanas da Ilha de São Luís, período em que o Maranhão transformou-se em um dos Estados com áreas de maior problema em relação à doença (COSTA *et al.*, 1995).

A urbanização da LV no Brasil nas últimas décadas tem criado condições epidemiológicas favoráveis para a manutenção da doença, com densa população de reservatórios, vetores e humanos, distribuídos no mesmo ambiente tropical que é extremamente favorável à transmissão (DINIZ *et al.*, 2008). Os bairros com animais positivos, em geral, estão localizados próximos de pequenas áreas de mata característica da região, o que viabilizaria a presença do vetor junto às residências (MARZOCHI, 1994; MOURA *et al.*, 1999). O controle efetivo dessa doença requer a diminuição de sua incidência em cães, que servem como reservatório para a doença no homem. Porém há discordância entre os pesquisadores de que a LV canina seja a causa

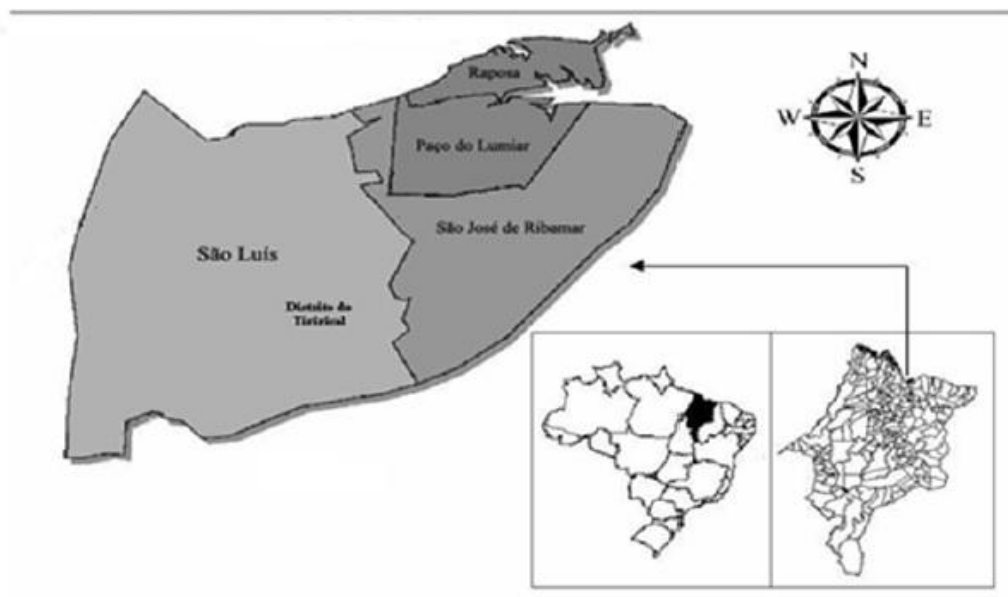
necessária para a infecção humana, apesar de os estudos apontarem nessa direção (GONTIJO & MELO, 2004).

Em virtude da importância epidemiológica do cão como reservatório da leishmaniose visceral e da situação endêmica da doença no Estado do Maranhão, além da constante busca por alternativas concretas e viáveis, tanto no campo do diagnóstico e prognóstico quanto da imunoprofilaxia da LV canina, propostas inovadoras e interdisciplinares visando o desenvolvimento de conhecimentos básicos e de alternativas para o controle da leishmaniose devem ser priorizadas. Torna-se importante determinar seu perfil epidemiológico, assim como os fatores que implicam a ocorrência da doença. Dessa forma, este trabalho teve como objetivos determinar a soroprevalência e as variáveis epidemiológicas associados com a infecção de *Leishmania* spp. em cães residentes no Distrito do Tirirical de São Luís, MA.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A área de estudo foi o município de São Luís, localizado na região norte do Estado do Maranhão (Figura 1), com área de 827 km², 24 metros de altitude, e como coordenadas geográficas 2°31' S e 44°18'. O clima é do tipo tropical, quente e semiúmido da Zona Equatorial. São Luís tem duas estações distintas: o verão, de julho a dezembro, e o inverno, de janeiro a junho. O verão



é quente e seco com ventos frescos e o inverno é chuvoso. Possui média pluviométrica de 1953 mm.

Figura 1: Distrito do Tirirical, São Luís, Maranhão, Brasil. (FONTES: IBGE e SEPLAN/ MA).

O município divide-se em sete distritos sanitários: Itaqui-Bacanga, Centro, Tirirical, Vila Esperança, Cohab, Bequimão e Coroadinho. O presente estudo foi realizado em cinco localidades, incluindo bairros, vilas e povoados que fazem parte do Distrito do Tirirical. A escolha foi baseada nos seguintes fatores: positividade canina para a doença, localização em área com características urbanas, semiurbanas e rurais e elevado índice de casos humanos. As localidades estudadas foram a Cidade Operária (ambiente com características urbanas); Cruzeiro de Santa Bárbara, Residencial José Reinaldo Tavares e Recanto Canaã (ambiente com características rurais e urbanas); Cajupari (ambiente com características rurais). Também foi levado

em consideração, na escolha das localidades do estudo, o número de casos humanos e caninos notificados pelo Centro de Controle de Zoonoses de São Luís, MA. As escolhas recaíram sobre o Residencial José Reinaldo Tavares, pelo fato de ser a maior localidade do distrito do Tirirical com menor número de casos caninos, e sobre o Recanto Canaã, porque, dentre as localidades, é a que apresenta maior número de casos humanos.

Amostras e diagnóstico laboratorial

Para diagnóstico da infecção canina, foram obtidas amostras de cem animais domiciliados, sintomáticos e assintomáticos, de 72 moradias visitadas, com a seguinte distribuição por localidade: Cidade Operária (21); Cruzeiro de Santa Bárbara (21), Residencial José Reinaldo Tavares (23); Recanto Canaã (19) e Cajupari (16). O número de animais incluídos no estudo por localidade foi resultante dos moradores que quiseram colaborar com a pesquisa, cujo somatório levou à amostra final. As localidades com menor número de amostras, caso do Cajupari e Recanto Canaã, são as que possuem menor número de casas com criação de cães, o que é uma limitação deste estudo.

Submeteram-se os animais a exames físicos para observação de sinais clínicos ou não da leishmaniose visceral canina. Em seguida foram coletadas amostras de sangue por meio de punção da veia cefálica, para realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ), para detecção de anticorpos contra *Leishmania* spp. em soros de cão. Consideraram-se positivas as amostras com titulação 1/40, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde. Os ensaios foram realizados nos

Laboratórios de Anatomopatologia e Virologia do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, Campus Paulo VI.

Ficha de investigação

Foram preenchidas fichas de investigação, junto aos moradores, com o objetivo de determinar as variáveis epidemiológicas que poderiam estar correlacionados com a ocorrência da doença, como proximidade da moradia com a mata; existência de criação/abrigo de animais de produção e animais silvestres; além de características do animal, como sexo, idade, raça, tamanho e cor do pelo.

Análise estatística

Realizou-se a associação entre os resultados da sorologia e as variáveis pelo qui-quadrado, fazendo uso do programa BioEstat 3.0. A regressão logística múltipla foi feita com as variáveis estatisticamente significativas observadas na análise univariada, mediante o programa Minitab 14.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise sorológica demonstrou que, das cem amostras analisadas, 67 (67%) apresentaram-se positivas para *Leishmania* spp.

Na determinação da soroprevalência por localidade, constatou-se que Cajupari e Cruzeiro de Santa Bárbara apresentaram elevados índices de positividade, com 94% e 81%, respectivamente. O Residencial José Reinaldo Tavares mostrou a soroprevalência mais baixa (48%). Por fim, nas localidades Recanto Canaã e Cidade Operária, observaram-se soroprevalências de 53% e 67%, respectivamente.

As localidades mostraram características diversas. Cajupari e Cruzeiro de Santa Bárbara localizam-se próximos de matas, com relatos de presença de animais silvestres nas imediações do domicílio. No Residencial José Reinaldo Tavares, as residências ficam próximas da mata e 65,2% delas não possuem abrigo e criação de animais. Também não foi relatada, pelos moradores, a presença de animais silvestres nas proximidades dos domicílios. Na localidade Recanto Canaã, as residências são próximas da mata e a maioria dos moradores da localidade relatou presença de animais silvestres nas imediações dos domicílios, tanto de gambás, também conhecidos como mucuras, na região (*Didelphis marsupialis*), quanto de raposas (*Cerdocyon thous*). A Cidade Operária é uma área urbanizada, sem proximidade com a mata, não possui criação de animais no domicílio e com poucos relatos de animais silvestres observados nas suas imediações. Tais descrições foram importantes para caracterizar o perfil da doença nas localidades, relacionando-a com as variáveis epidemiológicas, buscando identificar áreas de maior risco para a ocorrência da leishmaniose canina.

A soroprevalência elevada encontrada na Cidade Operária (67%) pode ser justificada pela expansão que a leishmaniose visceral tem demonstrado no

ambiente urbano nas últimas décadas, o que vem sendo observado no município de São Luís, MA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; DINIZ *et al.*, 2008).

Neste estudo, as localidades Cajupari e Cruzeiro de Santa Bárbara apresentaram os maiores índices de positividade, com 94% e 81%, respectivamente. Ambas são localizadas próximas de matas e há relatos da presença de animais silvestres nas imediações do domicílio. Alguns estudos relatam que, em localidades onde há presença de animais silvestres nas proximidades dos domicílios e em habitações situadas perto de matas em áreas de ocupação recente e com condições sanitárias insatisfatórias, existe uma tendência para abundância de vetores e reservatórios, o que contribui para a manutenção e disseminação da doença, revelando alta soroprevalência canina (GUIMARÃES *et al.*, 2005; OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

A população de cães positivos analisada apresentou maior número de animais assintomáticos (58,2%), o que corrobora o que é descrito na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2001; MADEIRA *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2009). Dentre os sinais clínicos observados nos animais positivos, a linfadenopatia localizada (linfonodo poplíteo) foi o mais freqüente, acometendo 27 cães (96,4%). Outros sinais encontrados foram úlceras cutâneas (60,7%), onicogrifose (50%), pelo opaco (25%), ceratoconjuntivite (21,4%), eczema furfuráceo (21,4%), alopecia (14,2%) e emagrecimento (10,7%). Não foram observados animais com formações nodulares. Em estudos realizados em Recife, PE, os sinais clínicos mais freqüentes foram úlceras cutâneas, seguidas de linfadenopatia, emagrecimento, onicogrifose e oftalmopatias (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

Tabela 1. Taxa de prevalência e variáveis epidemiológicas associadas à soropositividade canina para *Leishmania* spp. no distrito do Tirirical, São Luís, Maranhão.

Variáveis	Prevalência +/n(%)	OR	P	IC 95%
Classificação clínica				
Sintomático	28/39 (71,7%)	1,4	0,55	0,60 – 3,43
Assintomático	39/61 (63,9%)			
Sexo^a				
Macho	37/49 (75,5%)	2,2	0,08	0,89-5,45
Fêmea	30/51 (58,8%)			
Raça				
Não	59/87 (67,8%)	1,3	0,89	0,39-4,39
Sim	8/13 (61,5%)			
Idade				
Até 2 anos	26/42 (66,6%)	0,6	0,48	0,29-1,56
> 2 anos	41/58 (70,6%)			
Tamanho do pelo				
Curto	47/72 (65,2%)	0,7	0,72	0,29-1,95
Longo	20/28 (71,4%)			
Cor do pelo				
Claro	41/58 (70,6%)	1,4	0,48	0,64-3,44
Escuro	26/42 (61,9%)			
Localidade				
J. R. Tavares ^a	11/23 (47,8%)	0,5	0,27	0,16-1,73
Outras localidades	56/77 (72,7%)			
Cidade Operária ^a	14/21 (66,6%)	1,0	0,82	0,36-2,38
Outras localidades	53/79 (67%)			
C. S. Bárbara ^a	17/21 (80,9%)	3,4	0,04*	1,03-11,26
Outras localidades	50/79 (63,2%)			
Recanto Canaã ^a	10/19 (52,6%)	2,1	0,22	0,77-5,92
Outras localidades	57/81 (70,3%)			
Cajupari ^a	15/16 (93,7%)	12,0	0,01*	1,49-96,47
Outras localidades	52/84 (61,9%)			
Proximidade da mata^a				
Sim	42/56 (75%)	0,36	0,18	0,08-1,62
Não	25/44 (56,8%)			
Forma de criação				
Solto	41/57 (71,9%)	1,7	0,29	0,74-3,97
Preso	26/43 (60,4%)			
Local da criação				
Domicílio	5/8 (62,5%)	0,8	0,91	0,18-3,6
Peridomicílio	62/92 (67,3%)			
Criação de animais				
Sim	32/46 (69,5%)	1,2	0,77	0,53-2,87
Não	35/54 (64,8%)			
Animais silvestres^a				
Sim	38/51 (74,5%)	0,57	0,48	0,12-2,71
Não	29/49 (59,1%)			
Abrigo de animais				
Sim	32/45 (71,1%)	1,3	0,61	0,58-3,18
Não	35/55(63,6%)			

* = resultados estatisticamente significativos P > 0,05 / a = variáveis utilizadas na análise múltipla / n= numero de amostras variável

Neste estudo, constatou-se que animais que vivem nas localidades Cruzeiro de Santa Bárbara e Cajupari, ambas localizadas próximas de matas, têm 3,4 ($p= 0,04$) e 12,0 ($p= 0,02$) vezes maior probabilidade de serem soropositivos para *Leishmania* spp. do que aqueles que vivem nas outras localidades estudadas. Desse modo, estratégias de vigilância epidemiológica e controle da doença devem ser buscadas, visando estabelecer ações específicas direcionadas para essas áreas, onde o risco de ocorrência é maior. Isso, no entanto, não significa deixar de realizar as ações nas outras áreas, considerando-se que se trata de uma área endêmica para LVC.

Também é recomendada a realização de estudos para melhor compreender o ciclo silvestre da doença e assim propor soluções mais efetivas no controle da doença. As áreas urbanas, como observado na localidade Cidade Operária, também sofrem, atualmente, um incremento na casuística de leishmaniose. O processo de urbanização da doença vem se expandindo, inclusive, para áreas densamente povoadas. O grande número de vetores e reservatórios é extremamente favorável para a ocorrência da doença, devendo também ser controlada, evitando o risco para a saúde humana e animal (DINIZ *et al.*, 2008).

Não se verificou correlação entre as outras variáveis estudadas e soropositividade para *Leishmania* spp (Tabela 1). Em trabalhos realizados em Mossoró, RN, não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa na positividade dos cães entre o meio rural e urbano. Entre os animais peridomiciliados, houve maior soroprevalência tanto na área rural quanto urbana, e as fêmeas da zona rural foram mais prevalentes (AMÓRA *et al.*,

2006). Nesta pesquisa, notou-se que as áreas próximas de matas apresentaram soroprevalência mais elevada. Não foi evidenciada predisposição sexual.

Estudos realizados descreveram que animais de pelo curto têm maiores riscos de serem infectados por *Leishmania*. A criação de porcos e galinhas aumenta o risco para a ocorrência da doença. Também sugerem que o risco aumenta após o primeiro ano de vida do animal, permanecendo estável após este. Sexo, raça, grau de confinamento não foram fatores significativos para incidência da doença (MOREIRA *et al.*, 2003). No presente estudo não se observou correlação entre a positividade canina com o tamanho do pelo e a criação de outros animais. Contudo, os resultados aqui apresentados estão de acordo quanto à ausência de predisposição para a infecção relacionada ao sexo, idade, local e forma de criação do animal.

A leishmaniose visceral é atualmente um grave problema de saúde pública, apresentando ainda entraves para sua vigilância e controle, como falta de padronização dos métodos de diagnóstico da infecção humana e canina, discordância entre os estudos que avaliam o impacto da eliminação de cães soropositivos na prevalência da infecção humana, demonstração de que outros reservatórios podem ser fonte de infecção da *L. chagasi*, como os canídeos silvestres e os marsupiais, e a escassez de estudos sobre o impacto das ações de controle dirigidas contra os vetores (GONTIJO & MELO, 2004). A ocorrência da doença envolve aspectos biológicos, ambientais e sociais. Uma vez que a destruição das matas pelo homem vem causando um desequilíbrio, ocorre um aumento do número de casos, favorecendo, assim, a expansão e a urbaniza-

ção da doença. Apesar do processo de urbanização, constata-se que são as localidades onde as residências têm proximidade com a mata que apresentaram maior número de animais acometidos pela infecção.

CONCLUSÕES

A soroprevalência da LVC é elevada nas localidades estudadas. As localidades Cajupari e Cruzeiro de Santa Bárbara apresentaram os maiores índices de positividade canina. O Residencial José Reinaldo Tavares mostrou a menor soroprevalência. Animais que vivem nas localidades Cruzeiro de Santa Bárbara e Cajupari têm maior probabilidade de serem soropositivos para *Leishmania* spp. do que animais que vivem nas outras localidades estudadas. Com exceção da localidade, não se encontrou correlação entre as outras variáveis estudadas e soropositividade para *Leishmania* spp.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. B. P. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F. A.; DAHROUG, M. A. A.; TURBINO, N. C. M. R.; SOUSA, V. R. F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 2, 2009.

AMORA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; COSTA, S. C. G.; CALABRESE, K. S.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Fatores relacionados com a positividade de cães para Leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1854-1859, 2006.

ALBUQUERQUE, A. R.; ARAGÃO, F. R.; FAUSTINO, M. A. G.; GOMES, Y. M.; LIRA, R. A.; NAKASAWA, M.; ALVES, L. C. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na região metropolitana do Recife. **Clínica Veterinária**, Ano XII, n. 71, 2007.

COSTA, J. M. L.; VIANA, G. M. C.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIMENTO, M. D. S. B.; ALVIM, A. C.; BURATTINI, M. N.; SILVA, A. R. Leishmaniose visceral no Estado do Maranhão: a evolução de uma epidemia. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11 p. 321-324, 1995.

DINIZ, S. A.; SILVA F. L.; CARVALHO-NETA, A. V.; BUENO, R.; GUERRA, R. M. S. N. C.; ABREU-SILVA, A. L.; SANTOS, R. L. Animal reservoirs for visceral

leishmaniasis in densely populated urban áreas. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 1, p. 24-33, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GUIMARÃES, K. S.; BATISTA, Z. S.; DIAS, E. L.; GUERRA; R. M. N. C.; COSTA, A. D. C. C.; OLIVEIRA, A. S.; CALABRESE; K. S.; CARDOSO; F. O.; SOUZA, C. S. F.; ZAVERUCHA DO VALE, T.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; ABREU-SILVA, A. L. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 305-309, 2005.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, 2007.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. P.; LEAL, C. A.; MARZOCHI, M. C. A. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for Leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v.8, p.440-444, 2004.

MARZOCHI, M. C. A. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 23, n. 2, p. 82-84, 1994.

MENDES, S. W.; SILVA, A. A. M.; TROVÃO, J. R.; SILVA, A. R.; COSTA J. M. L. Expansão espacial da Leishmaniose visceral Americana em São Luís do

Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 227-231, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**. Brasília, DF; 2006. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

MOREIRA, J. R.; DUARTE E.; SOUZA, V. M. M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N. L.; SILVA, R. B. B.; CARVALHO, L. P. Peridomestic risk factors for canine Leishmaniasis in urban dwelling: new findings from a prospective study in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 393-397, 2003.

MOURA, S. T.; FERNANDES, G. C. N; PANDOLPHO, V. C.; RODRIGUES E SILVA, R. Diagnosis of canine leishmaniasis in the urban area of the District of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36 n. 2, 1999.

OLIVEIRA, A. C.; ABREU-SILVA, A. L.; LIMA, T. B.; SILVA, A. P. C.; REIS, L. F.; BARBOSA, D. S.; GUERRA, R. M. S. N. C. Soroprevalência da leishmaniose visceral canina no bairro Jardim São Raimundo em São Luís. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Suppl. v. 1, p. 140-143, 2006.

OLIVEIRA, C. D. L.; ASSUNÇÃO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte,

Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. 1231-1239, 2001.

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Leishmaniose visceral (calazar): cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 28, p. 501-505, 1998.

THOMAZ-SOCCOL, V.; CASTRO, E. A.; NAVARRO, I. T.; FARIAS, M. R.; SOUZA, L. M.; CARVALHO, Y.; BISPO, S.; MEMBRIVE, N. A.; MIZZONO, J. C.; TRUPPEL, J.; BUENO, W.; LUZ, E. Casos alóctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicações epidemiológicas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 46-51, jul.-set. 2009.

CAPÍTULO II

**HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL ANALYSIS OF SKIN,
SPLEEN, LYMPH NODE AND EYE LESIONS IN DOGS NATURALLY INFECTED
WITH VISCERAL LEISHMANIASIS**

**SANTANA, A.A¹., LIMA, , T.B²., MELO, F.A²., REIS, L.F², SILVA, AP.C².,
ANDRADE, F.E.H³., SOUZA, F.A²., SANTOS, D.M.S³. ABREU-SILVA, AL^{1/3}.**

¹ Doutorado em Biotecnologia, RENORBIO/ UEMA, Maranhão, Brazil

² Veterinarian

³ Universidade Estadual do Maranhão

Corresponding author: Abreu-Silva, A. L. (anabreu@ioc.fiocruz.br)

Adress: Departamento de Patologia da Universidade Estadual do Maranhão Avenida
Lourenço Vieira da Silva, s/n, Cidade Universitária Paulo VI, Tirirical São Luis,
Maranhão, Brazil.

Zip Code 65055 970

ABSTRACT

The emergence of visceral leishmaniasis (VL) is a growing problem for public health mainly due to demographic and ecological factors. These consist of environmental changes such as large-scale human migration, poorly-planned urbanisation and deforestation. The aim of this paper is to describe the main lesions caused by *Leishmania chagasi/infantum*. The histopathological analysis showed that the most frequent ocular lesions in dogs naturally infected with *L. chagasi/infantum* were: an inflammatory process in the cornea, in one case affecting the sclerocorneal junction and congestion. The immunocytochemical study showed occurrence of *Leishmania* in both ocular and cutaneous lesions and CD11 receptors.

INTRODUCTION

The leishmaniasis constitutes a group of diseases that continue to be a significant public health problem in at least 88 countries (DESJEUX, 2004; DUJARDIN, 2006). They are anthroponosis capable of producing skin, mucocutaneous and visceral manifestations (FEITOSA et al., 2003). It is caused by a protozoan, exclusively intracellular, that infects cells of the mononuclear phagocytic system of various animal species. Taxonomically, the causative agent belongs to the order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae, genus *Leishmania* and subgenus *Leishmania* (LAINSON, SHAW, 1987).

The emergence of visceral leishmaniasis (VL) as a growing problem for public health is due, mainly, to demographic and ecological factors. These consist of environmental changes such as large-scale human migration, poorly-planned urbanisation and deforestation (DESJEUX, 2001). Individual factors, such as HIV infection, malnutrition and also genetic factors are also related to the risk of contracting the disease (DESJEUX, 2004).

The State of Maranhão, Brazil, has seen an expansion of the disease predominantly in the periurban areas of the municipalities located on São Luís island (São Luís, Paço do Lumiar and São José de Ribamar) (ALVIM et al., 1986). Canine visceral leishmaniasis occurs in all the municipalities of São Luís Island, with a seroprevalence that varies between 22.5% and 68% (DIAS et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2006, GUIMARÃES et al., 2005; BARBOSA, et al., 2010).

In susceptible dogs, after the skin has been infected the parasite is disseminated throughout the body, with the subsequent development of the clinical signs of the

disease. The immunocompetence of the host is an important factor for the appearance of the clinical signs, which become evident over a period that varies from three months to several years (FERRER *et al.*, 1995). The spectrum of lesions produced by *Leishmania* depends on the virulence of the parasite, as well as on the immune response of the host (GREVENLINK & LERNER, 1996; DAVIES *et al.*, 2003).

Garcia-Alonso *et al.* (1996) confirmed the existence of a specific IgG in the aqueous humour, although this was not correlated with the serum; in their histopathological study, the same authors observed lesions in various structures: inflammatory zones in the ciliary processes, ciliary bodies, limbus (sclerocorneal zone), iris and lachrymal ducts. Ciaramella *et al.* (1997) reported that of 150 dogs with VL, 16% presented ocular signs with the lesions found including examples of keratoconjunctivitis, uveitis and panophthalmitis.

The objectives of this investigation were the histological and histochemical analysis of cutaneous and ocular lesions in dogs with visceral leishmaniasis, correlating the presence of ocular lesions with the humoral response and clinical manifestations.

MATERIAL AND METHODS

A total of 40 dogs of undefined breed, with thirty of them seropositive for *Leishmania* sp. and 10 animals seronegative, all of which died as a result of other pathologies. The seropositive animals were divided in three groups: 10 symptomatic animals (that presented more than three clinical signs compatible with canine visceral leishmaniasis), 10 oligosymptomatic animals (animals with one or two clinical signs) and 10 asymptomatic animals (clinically healthy animals) (MANCIANTI, *et al.*, 1988).

The animals were killed in accordance with standard ethical procedures and during necropsy fragments of skin, eye, spleen and lymph node were collected, which were fixed in 4% paraformaldehyde. After fixing the material was processed for embedding in paraffin. Sections of 5 µm in thickness were stained with haematoxylin and eosin (HE).

The macroscopic characteristics of the eye ball, spleen, skin, lymph nodes and bone marrow were noted. The organs were weighed (except bone marrow) and fragments were collected to produce smears as negative “imprints” on microscope slides in order to calculate the level of parasitism in terms of Leishman-Donovan units (LDU) as were described by GENARO *et al.* (1990) and LIMA *et al.* (2004).

Immunocytochemical procedures were carried out using normal goat serum, diluted 1:50 to prevent non-specific binding. The following monoclonal antibodies (Mabs) were used: canine anti-CD18, anti-CD11b, and anti-CD11c produced in mice, of the IgG1 subtype (MOORE *et al.*, 1990). Amastigote forms of *Leishmania* in the various tissues were stained using serum from infected dogs. The secondary antibody was a biotinylated rabbit anti-mouse (IgG1), at a dilution of 1:100 (DAKO[®] kit) (TARUFI *et al.*, 2004).

The streptavidin-peroxidase complex used was from a DAKO[®] kit. Negative controls, where performed by substituting mouse serum by PBS for the primary antibody at a dilution of 1:50, they were included on one slide in each batch for CR3 labelling. In the case of *Leishmania* staining serum from dogs not infected by *Leishmania*, and/or PBS was used.

RESULTS

The main clinical signs presented by the polysymptomatic animals were hypertrophy of the lymph nodes and onychogryphosis (90%); ocular secretions and ulcers (80%); pale mucosa and alopecia (70%); cachexia and furfuraceous desquamation (60%).

Histopathological analysis revealed that the most frequent ocular lesions among symptomatic dogs were: inflammatory infiltrates in the cornea, congestion and an inflammatory infiltrates comp

osed mainly of plasm cell and macrophages in ciliary body and iris, which clinically characterises anterior uveitis. No parasites were observed by this technique.

In the oligosymptomatic animals, we also observed a lymphoplasmocytic inflammatory process in the ciliary body, and congestion in the region below the pigmented epithelium of the retina. The animals in the control group (seronegative) did not present any ocular lesions. The Immunocytochemical analysis revealed labelled *Leishmania* in skin and ocular lesion from polysymptomatic dogs. In regard, the lymphocyte subsets just CD11b was observed in the inflammatory infiltrates in both skin and ocular lesions (Figure 1-A).

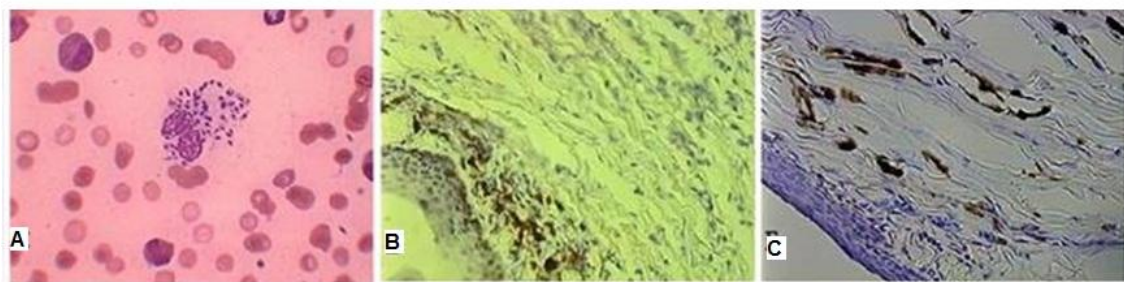


Figure 1 A: amastigotes of *Leishmania* in macrophage from bone marrow (bar 25 μ m) Giemsa stain; B: Labelled amastigotes in corneal tissue (bar 50 μ m); C: CD11 receptor immunostained in corneal tissue (bar 50 μ m).

Amastigote forms of *Leishmania* were found just bone marrow (figure 1-B), spleen and lymph nodes aspirates of polysymptomatic dogs. The results of LDU are presented in Table.

Table: Results obtained in LDU analysis in polysymptomatic dogs.

Animal	Bone Marrow	Spleen	Lymph Node
03	0.13	7.00	8.64
05	0.23	30.28	2.85
11	0.31	27.10	3.32

DISCUSSION

The most frequent clinical sign in approximately 80% of cases was generalised lymphadenopathy. Alopecia and desquamation, skin ulcers and the formation of crusts were the main cutaneous signs observed in the majority of animals. Cachexia and weight loss were observed in only 20% of the cases. Guimarães *et al.* (2005), studying dogs from São José de Ribamar, Maranhão, found that the most frequent clinical signs were skin lesions (ulcers on the ear, alopecia, onychogryphosis and furfuraceous desquamation). Calabrese *et al.* (2010) reported an accentuated inflammatory reaction and low load parasite in the skin of polysymptomatic dogs from VL, from São Luís Island, Maranhão.

Ciaramella *et al.* (1997) and Koutinas *et al.* (1999) reported a percentage of approximately 16% ocular lesions, with the most frequent types being keratoconjunctivitis, uveitis and panophthalmitis. These findings confirm that *Leishmania* can cause ocular lesions, and such lesions may often be confused with other eye pathologies.

A quantitatively more intense parasitism was noted in the samples of lymph node and spleen compared to the samples of bone marrow, while the parasite was not observed in skin samples. Despite this region be known as hyperendemic for canine visceral leishmaniasis, it is inexplicable the why dogs from this region presented a low load parasite as also described by Calabrese *et al.* (2010).

Dias *et al.* (2008) working in other locality of São Luís Island found that just 7.14% of dogs gave a positive result on the parasitological examination of bone marrow. Andrade *et al.* (2002) did not detect the parasite in bone marrow aspirates or in histopathological examinations performed on samples of spleen and lymph nodes from infected adult dogs. By contrast, Silva *et al.* (2001) and Reis *et al.* (2006), in studies carried out in Belo Horizonte, Minas Gerais, described high parasite loads in these organs.

In work by Solano–Gallego *et al.* (2001) the parasite DNA was detected in 63 dogs in at least one of the three tissues investigated: bone marrow (17%), conjunctiva (32%) and skin (51%).

Similarly, Reis *et al.* (2006) found that asymptomatic dogs presented an LDU of 7246, 1104 and 2564 amastigotes/1000 nucleated cells in skin, bone marrow and spleen, respectively. The authors considered these results are low when compared

to the LDU, and suggested that the data support the theory that asymptomatic dogs play an important role in the transmission of the infection.

Sanchez *et al.* (2004) calculated the LDU of samples of spleen and lymph nodes of naturally-infected dogs in Venezuela, obtaining a mean of 747 for the liver of dogs with clinical signs of the disease and 399 for those that were asymptomatic, while in samples of spleen they observed LDU of 238 and 90 for symptomatic and asymptomatic dogs, respectively. Meanwhile, an immunocytochemical analysis performed by the same authors also showed the presence of CD11 receptors and the proportion and distribution of immunocompetent cells in the liver and spleen.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper was supported by grant 02/2004 FAPEMA/CNPq.

REFERENCES

- ALVIM, M. C. *et al.* Situação atual do calazar na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1986;**19**:73-75.
- ANDRADE, H. M. *et al.* *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Veterinary Parasitology* 2002,**103**:71–81.
- BARBOSA, D. S. *et al.* Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no município de São Luís, Maranhão, Brasil. *Ciência Animal Brasileira* 2010,**11**: 653-659.
- CALABRESE, K.S. *et al.* *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi*: Histopathological aspects of the skin in naturally infected dogs in two endemic areas. *Experimental Parasitology* 2010,**124**:253-257.
- CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record* 1997,**141**:539-543.
- DAVIES C. R. *et al.* Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 2003,**326**:377–382.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2004,**27**:305-318.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2001,**95**:239-243.

DIAS, E. L. *et al.* Canine Visceral Leishmaniasis (CVL): seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in a endemic area of São José de Ribamar Municipality, Maranhão State, Brazil. *Ciência Animal Brasileira* 2008,**9**:740-745.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitology* 2006,**22**:4-6.

FEITOSA, M. M. *et al.* Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil): um estudo retrospectivo de 191 casos. *Clínica Veterinária* 2003,**47**:42-48.

FERRER, L. *et al.* Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Record* 1995,**136**:514-516.

GARCIA-ALONSO, M. *et al.* Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunology* 1996,**18**:617-623.

GENARO, O. *et al.* Ocorrência de calazar em área urbana da grande Belo Horizonte, MG. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1990,**23**:121.

GREVENLINK, S. & LENNER, E. Leishmaniasis. *Journal of American Academy of Dermatology* 1996,**25**:473-5.

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

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

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* 1987, **1**:1-120.

LIMA, W. G. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropical* 2004, **92**:43-53.

MANCIANTI, F. *et al.* Studies on canine Leishmaniasis control. 1- Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988, **82**:566-567.

MOORE, P. F. *et al.* Canine leukocyte integrins: characterization of a CD18 homologue. *Tissue antigens* 1990, **36**:211-220.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Soroprevalência da leishmaniose visceral canina no bairro Jardim São Raimundo em São Luís. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006, supl(**1**):73.

REIS, A. B. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 2006, **81**:68-75.

SANCHEZ, M. A. *et al.* Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2004,**70**:618-24.

SILVA, E. S. *et al.* Leishmaniose Visceral Canina: estudo clínico-epidemiológico e diagnóstico. Canine Visceral Leishmaniasis: clinical epidemiological study and diagnosis. Revista Brasileira de Medicina Veterinária 2001,**23**:111-116.

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 2001,**39**:560–563.

TAFURI, W. L. *et al.* An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. Journal of Immunological Methods 2004,**292**(1-2)17-23.

CAPÍTULO III



Welcome TO TTP7 IN Zaragoza (Spain)

**FACTORS ASSOCIATED WITH INFECTION OF CANINE BABESIOSIS
CAUSED BY *BABESIA CANIS VOGELI* IN PURE BREED DOGS**

CARVALHO SILVA, N. W.B.¹, SANTANA, A.A¹., ROCHA, A.L¹., ALMEIDA-SOUZA¹,
F., COSTA-JUNIOR, L.M², RIBEIRO, M.F.B³., SILVEIRA, J.A.G³., MELO, S.A,
ABREU-SILVA, A.L^{1*}.

1. Universidade Estadual do Maranhão, Brazil
2. Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, CCAA – UFMA, Maranhão, Brazil
3. Departamento de Parasitologia, ICB – UFMG, Minas Gerais, Brazil

* Corresponding author:

E-mail: anabreu@ioc.fiocruz.br

Departamento de Patologia – Universidade Estadual do Maranhão, Cidade
Universitária Paulo VI – Avenida Lourenço Vieira da Silva, s/n São Luís Maranhão,
Brazil Tel.: +55-98-3257- 3676; Fax.: +55-98-.3257 3676 Zip Code: 65055-970

Introduction

Babesiosis is an important tick-borne disease of dogs worldwide (Boozer and Macintire 2003), which is caused by intraerythrocytic protozoan parasites belonging to the genus *Babesia* (Irwin 2009). Nowadays, *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* are recognized as the two species that cause canine babesiosis, a clinically significant hemolytic disease of dogs (Yamane et al. 1994; Lobetti 1998). Three subspecies of *B. canis* have been proposed (Uilenberg et al. 1989). *B. canis rossi*, transmitted by the tick *Haemaphysalis leachi* in South Africa and causing a usually fatal infection in domestic dogs even after treatment; *B. canis canis*, transmitted by *Dermacentor reticulatus* in Europe and showing a more variable pathogenicity; and *B. canis vogeli*, transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* in tropical and subtropical countries, and leading to a moderate, often clinically unapparent infection (Uilenberg et al. 1989; Hauschild et al. 1995; Zahler et al. 1998; Cacciò et al. 2002).

Previous molecular studies carried out with samples from infected dogs in Brazil have shown that *B. canis vogeli* was the etiological agent involved in all cases (Passos et al. 2005). However, recently a few cases of *B. gibsoni* infection have been molecularly characterized in dogs in Brazil (Trapp et al. 2006). Although there have been several recent studies on canine babesiosis in many states of Brazil (Dell-Porto et al. 1993; O'Dwyer 2000; Furuta et al. 2004; Trapp et al. 2006; Costa-Júnior et al. 2009), no information is available in animals from Maranhão State.

Since climatic and geographic conditions may play an important role in transmission of tick-borne pathogens (Friedhoff 1988), these parameters should be taken into consideration during epidemiological surveys. Usually, the diagnosis is made on size and morphological appearance of the intra-erythrocytic forms in

peripheral blood smears. However, the parasitaemia is usually very low or the parasite is not detectable in blood smears, serodiagnostic methods are chosen for epidemiological studies (Levy et al. 1987).

The knowledge of the frequency and distribution of dogs as potential carriers of *Babesia* has significant epidemiological value (Yamane et al. 1994). Seroepidemiological investigations are fundamental in the evaluation of the current status of the disease and in determining the associated factors for the animal population. On the basis of such information, effective control measures can be planned and implemented (Maia et al. 2007). The aim of the present study was to determine the seroprevalence of *Babesia* infections in animals of pure breeds, and their associated factors in dogs from São Luís Island, Maranhão, Brazil.

Materials and Methods This study was performed in São Luís Island, Maranhão state, located 2° 46' South and 44° 22' west. The climate is tropical semi-humid, with an average of 1900 mm of rainfall per year and. Average temperatures of 26° C, with small annual variation (Núcleo Geoambiental 2002). The vegetation is composed of fields and salt marshes, with patches of savanna, and mangrove.

The number of samples to be collected was calculated based on an estimated prevalence of 53.2%, which observed in Diniz et al. (2004), with a confidence interval of 95% and an error margin of 15% (Centro Panamericano de Zoonosis 1973), giving a total of 150.2. However, an extra of 11.2% samples was collected.

It was randomly selected 167 pure breed animals, 58 large breeds, 55 medium breeds and 54 small breeds. The breeds involved in the study were boxer, dachshund, doberman, brazilian fila , pinscher, pit bull, Rottweiler, and shitzu,

yorkshire. During the collection was filled out to a questionnaire to better understand the relationship between host, vector and environment of each animal.

From each animal 3 ml of blood were collected by venipuncture (jugular or cephalic vein). The samples were placed in vacutainer tubes without anticoagulant, centrifuged at 3000 rpm for five minutes. Sera were frozen at -20°C until the serological tests for detection of anti-*Babesia*. The research of anti-*Babesia* was performed as described by IICA (1987). Titers ≥ 1 : were considered positive 40.

The results were analyzed by 2 x K contingency tables of exposure variables. The outcome variable was seropositivity to *B. vogeli* and the independent variables were: age (<2 years, 2 to 5 years, >5 years old), sex (male, female), breed (boxer, daschund, doberman, fila brasileiro, pinscher, pit bull, rottweiler, shitzu, yorkshire), hair (long, short), frequency of treatment of hair (weekly, monthly), local of acquisition of animals (veterinary clinic or pet shop, kennels), aim of rearing (commercial, company, guard), local of rearing (outside of house, inside of house), environment control of tick (yes, no), and if the dog had access to street (yes, no).

Odds Ratios (OR) and *P*-values were calculated separately for each variable using the BioEstat software (Ayres et al 2003), and logistic regression was performed with *P*-value <0.20 of variables in univariate analysis using Minitab 15 for Windows®.

Results and Discussion The serological analysis for babesiosis showed that the 167 samples analyzed, 41 (24.5%) were positive for *Babesia canis vogeli*. The variables age, sex, hair, frequency and who made of treatment of hair, aim of rearing, local of rearing, environment control of tick, and if the dog had access to street did not constitute associated factor to seroprevalency of *B. canis vogeli*. However, animals Yorkshire terrier showed a direct relationship with prevalence of *Babesia* infection, these dogs were 3.7 times ($P=0.00$, 95% CI 1.39-10.23) more likely to be seropositive than dogs of others breeds (Table).

It is known that the dynamic of tick populations is dependent on climatic conditions and affects transmission, as well as the biological cycle of the *Babesia* parasites and consequently its maintenance in nature (Friedhoff 1988). São Luis Island presents favorable conditions for the life cycle of vector and consequently the *Babesia* infection. High rates of infection with *B. canis vogeli* in urban areas of the tropics is due to the environmental conditions present in developing and maintaining populations of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Passos et al. 2005).

Dogs that develop resistant to *R. sanguineus* can show substances on the skin or in the serum that inhibit the conclusion of a blood meal by the tick (Waladde and Rice 1977). This susceptibility varies among the breeds of dogs (Loully et al. 2009). Beside the susceptibility of the dog, genetic factors of hosts can act as natural protective elements (Johnston et al. 1978; Levy et al. 1982). Differences in susceptibility to both the vector tick and the *Babesia* infection are involved, varying the rate of infection among the breeds (Martinod et al. 1986; Taboada and Merchant 1997). In the present study dogs York Shire terrier were 3.7 times more likely to be seropositive than dogs of others breeds, which are confirmed by Martinod et al

(1986) that found Cocker Spaniel, Griffon, Yorkshire terrier, Doberman, Pekinese more susceptible to *B. canis vogeli* infections than Beagle, Fox terrier, and Daschund.

Other hypothesis about the susceptibility between breed and tick borne infection are the aim and local of rearing, and access to street. This relationship was reported by Bastos et al. (2004) in a *Babesia* study and by Lindenmayer et al. (1991) in a serosurvey of Lyme disease, but this hypothesis not was demonstrate in the present study, which is confirmed in many other studies (Martinod et al. 1986; Yamane et al. 1994; Ungar de Sa et al. 2007).

The age is an important determinant of resistance, where young dogs are more susceptible to babesial infection than adults (Taboada and Merchant 1997), however the prevalence increases with age, demonstrating an increasing risk of contact with the vector (Ribeiro et al. 1990) but usually has no statistical difference (Martinod et al. 1986; Bobade et al. 1989; Ungar de Sá et al. 2007). The results from the present study indicate that canine babesiosis caused by *B.canis vogeli* is endemic in São Luís Island and Yorkshire terrier dog is more likely to be soropositive than those of other breeds.

Acknowledgements.

Dr. Abreu-Silva AL and Dr. Melo SA hold a research fellowship from the Brazilian National Research Council (CNPq), Brazil.

Table - Prevalence rates, and factors associated with *Babesia vogeli* infections in pure breed dogs living in São Luis Island of Maranhão, Brazil, 2008.

Variable	Serology			
	% Prevalence (+ / n)	OR	P-value	95% CI
Age				
<2 years	18.52 (5/27)	Ref.	Ref.	Ref.
2 – 5 years	26.15 (34/130)	1.55	0.55	0.54-4.43
>5 years old	20.00 (2/10)	1.10	0.71	0.17-6.84
Sex				
Female	23.94 (17/71)	Ref.	Ref.	Ref.
Male	25.00 (24/96)	1.05	0.48	0.51-2.16
Breed				
Mongrel	17.00 (17/100)	Ref.	Ref.	Ref.
Boxer	10.00 (2/20)	0.54	0.65	0.11-2.55
Daschund	21.05 (4/19)	1.30	0.92	0.38-4.41
Doberman	25.00 (5/20)	1.62	0.59	0.52-5.08
Brazilian Fila	30.00 (6/20)	2.09	0.29	0.70-6.22
Pinsher	10.00 (2/20)	0.54	0.65	0.11-2.55
Pit Bull	18.75 (3/16)	1.12	0.85	0.28-4.38
Rotweiler	22.22 (4/18)	1.39	0.84	0.40-4.76
Shit Zu	33.33 (5/15)	2.44	0.25	0.74-8.05
Yorkshire Terrier	52.63 (10/19)	3.77	0.00	1.39-10.23
Hair				
Short	19.55 (26/133)	Ref.	Ref.	Ref.
Long	44.12 (15/34)	0.84	0.85	0.12-5.88
Treatment of hair				
Weekly	28.79 (19/66)	Ref.	Ref.	Ref.
Monthly	21.78 (22/101)	0.68	0.39	0.33-1.40
Local of acquisition				
Veterinary clinic	22.03 (13/59)	Ref.	Ref.	Ref.
or Pet Shop				
Kennels	25.93 (28/108)	1.23	0.71	0.58-2.62
Aim of rearing				
Commercial	15.00 (3/20)	Ref.	Ref.	Ref.
Company	28.79 (19/66)	2.29	0.34	0.60-8.73
Guard	23.46 (19/81)	1.73	0.60	0.45-6.57
Local of rearing				
Outside of house	20.00 (22/110)	Ref.	Ref.	Ref.
Inside of house	33.33 (19/57)	1.23	0.72	0.38-3.94
Environment control of ticks				
Yes	28.04 (30/107)	Ref.	Ref.	Ref.
No	18.33 (11/60)	0.57	0.22	0.26-1.25
Access to street^a				
No	33.33 (1/3)	Ref.	Ref.	Ref.
Yes	24.39 (40/164)	0.64	0.74	0.05-7.30
Overall prevalence	24.55 (41/167)			

+: Number of positive animals; n: number of samples per variable; OR: Odds Ratios; P-value: probability; 95% CI: 95% Confidence Interval; Ref.: variable used as a reference value; a: If the dog have access to street.

REFERENCES

- Ayres, M., Ayres, Jr. M., Ayres, D.I., Santos, A.A.S. dos 2003. Bioestat 3.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Medicas. Belém: Sociedade Civil Mamiraua Brasília- CNPQ 290p
- Bastos, C.V., Moreira, S.M., Passos, L.M. 2004. Retrospective study (1998.2001) on canine babesiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Ann. N. Y. Acad. Sci. 10(Suppl.26), 158-160
- Bobade, P.A., Oduye, O.O., Aghomo, H.O. 1989. Prevalence of antibodies against *Babesia canis* in dogs in an endemic area. Rev. Élev. Med. Vet. Pays Tr. 42, 211–217
- Boozer, A.L., Macintire, D.K. 2003. Canine babesiosis. Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. 33, 885–904
- Cacciò, S.M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R.R., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J. 2002. Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected european dogs. Vet. Parasitol. 106, 285-92
- Centro Panamericano de Zoonosis. 1973. Procedimientos para studios de prevalencia de enfermedades crónicas en el ganado. Nota Técnica 18 Ramos Mejia Buenos Aires
- Costa-Júnior, L.M., Ribeiro, M.F.B., Rembeck, K., Rabelo, E.M.L., Zahler-Rinder, M., Hirzmann, J., Pfister, K., Passos, L.M.F. 2009. Canine babesiosis caused

by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. Res. Vet. Sci. 86 (Suppl.2), 257-260

Dell' Porto, A., Oliveira, M.R., Miguel, O. 1993. *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo Comparative studies between the clinical and hematological aspects and the indirect fluorescence antibody test. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2, 37–40

Diniz, P.P.V.P., Araújo-Júnior, J.P., Machado, R.Z., Girio, R.J.S., De Moraes, H.A.S., Schwartz, D.S. 2004. *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* and *Leptospira interrogans* infection frequency in dogs with suspected hemoparasitosis. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 13(Suppl.1), 367

Friedhoff, K.T. 1988. Transmission of *Babesia*. Ristic, M Babesiosis of domestic 5 animals and man. Boca Raton: CRC Press 23-52

Furuta, P.R. 2004. Avaliação comparativa entre o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) na detecção de anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis*. Dissertation, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista

Hauschild, S., Shayan, P., Schein, E. 1995 Characterization and comparison of merozoite antigens of different *Babesia canis* isolates by serological and immunological investigations. Parasitol. Res. 81, 638-42

IICA - Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura. 1987. Técnicas para El diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovinas. San José 79

Irwin, P.J. 2009. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit. Vectors* 2(Suppl.1), S4.

Johnston, L.A.Y., Leatch, G., Jones, P.N. 1978. The duration of latent infection and functional immunity in drought master and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. *Aust. Vet. J.* 54, 14-18

Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., Monco, L.D.J. 1987. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 48, 339-341

Levy, M.G., Clabaugh, G., Ristic, M. 1982. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. *Infect. Immun.* 37(Suppl.3), 1127-1131

Lindenmayer, J.M., Marshall, D., Onderdonk, A.B. 1991. Dogs as sentinels for Lyme disease in Massachusetts. *Am. Pub. Health* 81, 1448-1455

Lobetti, R.G. 1998. Canine babesiosis. *Comp. Cont. Educ. Prac. Vet.* 20 (Suppl.4), 418-431

Louly, C.C.B., Soares, S., Silveira, D., Neto, O., Silva, A., Borges, L. 2009. Differences in the susceptibility of two breeds of dogs, English cocker spaniel and beagle, to *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Int. J. Acarology* 35, 25–32

Maia, M.G., Costa, R.T., Haddad, J.P.A., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B. 2007. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. *Prev. Vet. Med.* 79, 155-162

Martinod, S., Laurent, N., Moreau, Y. 1986. Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. Vet. Parasitol. 19 (Suppl.3-4), 245- 54

Nucleo Geoambiental-Laboratorio de Meteorologia-Nugeo (2002)
<http://www.labgeo.uema.br>

O'Dwyer, L.H.O. 2000. Diagnóstico de hemoparasitas e carrapatos de cães provenientes de áreas rurais em três mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. PhD Thesis Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

Passos, L.M., Geiger, S.M., Ribeiro, M.F., Pfister, K., Zahlerrinder, M. 2005. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. Vet. Parasitol. 127(Suppl.1), 81-5

Ribeiro, M.F.B., Lima, J.D., Passos, L.M.F., Guimarães, A.M. 1990. Frequência de Anticorpos Fluorescentes Anti-*Babesia canis* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 42, 511-7

Taboada, J., Merchant, S.R. 1997. Infecções por protozoários e por outras causas. ETTINGER, SJ & FELDMAN, EC Tratado de Medicina Interna Veterinária São Paulo: Manole, 563-565

Trapp, S.M., Messick, J.B., Vidotto, O., Jojima, F.S., Moraes, H.S. 2006. *Babesia gibsoni* genotype asia in dogs from Brazil. Vet. Parasitol. 141, 177–180

Uilenberg, G., Franssen, F.F., Perie, N.M., Spanjer, A.A. 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. Vet. Q. 11(Suppl.1), 33-40

Ungar de Sá, M.F.M. 2007. Estudo retrospectivo (1991-2005), dos casos de babesiose canina na cidade de Salvador e Região Metropolitana, Bahia. *Rev. Bras Saúde Prod.* 8 (Supl.3), 178-183

Waladde, S.M., Rice, M.J. 1977. The sensory nervous system of the adult cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) Ixodidae. Part III. Ultrastructure and electrophysiology of cheliceral receptors. *J. Aust. Entomol. Soc.* **16**(Suppl.4), 441-453

Yamane, I., Gardner, I.A., Ryan, C.P., Levy, M., Urrico, J., Conrad, P.A. 1994. Serosurvey of *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* in pound dogs in California, USA. *Prev. Vet. Med.* 18, 293–304

Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., Gothe, R. 1998. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol. Res.* 84 (Suppl.7), 544-8

CAPÍTULO IV

Co-infection of *Leishmania infantum* and *Babesia canis vogeli* in dogs from urban and rural area in Northeastern Brazil.

Andressa A. Santana¹, Alessandra R. Lima², Tiago B. Lima⁴, Nancyleni P. Chaves¹, Solange de A. Melo¹, Michele M. M. Oliveira⁴, Alcina V. Carvalho Neta³,
and Ana L. Abreu-Silva^{1, 2 §}

¹ Doutorado em Biotecnologia, RENORBIO/ UEMA, Maranhão, Brazil.

² Departamento de Patologia

³ Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão, Brazil.

⁴ Veterinarian

Corresponding author: Abreu-Silva, A. L. (anabreu@ioc.fiocruz.br)

Adress: Departamento de patologia da Universidade Estadual do Maranhão

Avenida Lourenço Vieira da Silva, s/n, Cidade Universitária Paulo VI – Tirirical

São Luís Maranhão, Brazil

Zip Code: 65055-970

Tel.: +55-98-3257- 3676; Fax.: +55-98-3257-3676

Abstract

Canine Babesiosis and Canine Visceral Leishmaniasis are vector-borne parasitic diseases. In both diseases, canine are competent reservoir they can serve as available source of nutrition for blood-feeding arthropods. This study assessed canine babesiosis and canine visceral leishmaniasis from urban and rural area by PCR assays and determined the co-infection of both diseases. Here two hundred and thirty-four dogs from the São Luís Municipality, Maranhão State, in northeastern Brazil, from urban and rural area were included, which were selected based on convenience and availability studied. Independent the studied area the results showed that 16.66% were found positive only for *Babesia canis vogeli* and 23.93% only for *Leishmania infantum* and 3.84% presented DNA for both parasites. This study confirmed the presence of co-infection of *B. canis vogeli* and *L. infantum* only in the urban area of São Luís Maranhão State, although both parasites were found in rural and urban areas.

Key words: Canine Babesiosis, Visceral Leishmaniasis, co-infection, *Babesia canis vogeli*, *Leishmania infantum*

Background

Canine Babesiosis and Canine Visceral Leishmaniasis are vector-borne parasitic diseases. In both diseases, canine are competent reservoir they can serve as available source of nutrition for blood-feeding arthropods (16).

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is caused by *Leshmania infantum* (sin *Leishmania chagasi*) and it affects millions of dogs in Asia, North Africa, Europe and South American (18). In Brazil it was initially reported in rural areas, however, since eighty decade this disease has been described in urban area, including in the capital of several Brazilian states (10, 20, 21). This urbanization has been considered one of the major worldwide risk factors for leishmaniasis and largely contributes to the persistence of the burden of the disease (6, 9). The parasites transmitted by sandfly bite infect macrophages of mononuclear phagocytic system. *Babesia spp* is intraerythrocytic parasite transmitted by tick bite. Depending the *Babesia* species the clinical picture may range since subclinical condition to fatal disease (2). *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* are recognized as the two species that cause canine babesiosis. Three subspecies of *B. canis* have been proposed: *B. canis rossi*, transmitted by the tick *Haemaphysalis leachi* in South Africa and causing a usually fatal infection in domestic dogs even after treatment; *B. canis canis*, transmitted by *Dermacentor reticulatus* in Europe and showing a more variable pathogenicity; and *B. canis vogeli*, transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* in tropical and subtropical countries, and causing to a moderate, often clinically unapparent infection. In Northeastern Brazil, *Babesia canis vogeli* has been incriminated as the causative agent of canine babesiosis (14, 17).

Materials and Methods

Study Area

This study was performed in São Luís Island, Maranhão state, located 2° 46' South and 44° 22' west. The climate is tropical semi-humid, with an average of 1900 mm of rainfall per year and. Average temperatures of 26° C, with small annual variation (13). The vegetation is composed of fields and salt marshes, with patches of savanna, and mangrove.

Animals and samples

Two hundred and thirty-four dogs from the São Luis, municipality (134 from urban area and 100 from rural area) were included in the study, which were selected based on convenience and availability studied. The procedures were approved by ethical committee (Protocol 022/2007 CEEA - Comitê de Ética da Universidade Estadual do Maranhão).

The dogs were clinically examined and an epidemiological questionnaire was applied in order to obtain information about breed, age, sex, hair, absence or occurrence of ectoparasites.

DNA extraction and PCR assays for *Babesia* and *Leishmania*

DNA was extracted from 300µL of whole blood employing the Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega), following the manufacturer's recommendations. PCR reactions were performed for *L. infantum* according to Lachaud et al (2002), by amplifying a 145 pb fragment and performed for *B.canis* according to D'agnone et al (2009). Primers were used *Lsh1* (5' CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e

Lsh2 (5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3'), for *L. infantum* and *Piro-A* (5'-AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG-3') e *Piro-B* (5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC-3'), derived from 18S rRNA gene for all subspecies of *B. canis*. The PCR products were then subjected to agarose gel electrophoresis in 1.3% for *B. canis* and 1% for *L. infantum* (5, 11).

The reactions were processed in 0.5 mL tubes employing final volume of 25mL, and 4mL of solution DNA testing of samples and 21 mL of reaction buffer Master Mix® (Promega) containing 50 units / mL Taq DNA polymerase supplied in a Property reaction buffer (pH 8.5), 3.0 mM MgCl₂, 400µM of each dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5 mM of each primer (Invitrogen™) and nuclease-free water to complete the final volume. The material was incubated in thermocycler Biocycle, using the following sequence of 49 cycles for *L. infantum* and 30 cycles for *B. canis*. The gel will be subjected to electrophoresis and stained with a solution of ethidium bromide. The visualization of amplified products will be held on UV transilluminator.

Results

In two hundred and thirty-four dogs from the São Luis, municipality, the results showed that 16.66% were found positive only for *Babesia canis* and 23.93% only for *Leishmania infantum* and 3.84% presented DNA for both parasites.

Comparing the PCR survey for *Babesia* and *Leishmania* was observed a statistical difference between urban and rural area (Table 01).

The Table 02 showed that age, sex and hair type did not constitute as risk factors for both diseases. However, it interesting to point out that despite that statistical analysis showed that age was not significant, animals with age ranging 6 months and two years old seemed to be more susceptible than animals older.

In regard the ectoparasites was observed that 56% of animals were parasitized by ticks. The statistical analysis confirmed that in this study the absence of tick constituted a protection factor for the *Babesia canis* infection.

Despite that difference of samples obtained in rural (n=100) and urban (n=134) area the results reinforce that leishmaniasis nowadays is expansion in urban area mainly in developing countries. Environmental degradation and especially the lack of sanitation, that has been associated with the recent migration of rural populations to urban suburbs, are believed to have contributed to the urbanization of the disease as well as the adaptation of the insect vector.

Discussion

Serological studies carried out in São Luís Island showed that frequency of antibodies against *Leishmania* ranges 22.5% to 67% (1, 9). Study performed in Argentina show that PCR survey in peripheral blood was 21.1%, but the combination of peripheral blood and lymph nodes smears PCR showed a rate close to serological result (4). The sensitivity of PCR method may depend not only on the targeted multicopy-sequence small-subunit rRNA gene but also on the type of biopsy material and protocol used (15).

Regarding the rate of animals positive for *Babesia* by PCR was similar to serological data obtained by Carvalho Filho (3), which reported a seroprevalence

of 24.5% in pure breed dogs from São Luís Municipality. In this cause the similarity between these techniques could be related to predilection of the *Babesia* to erythrocytes, favoring a higher concentration of parasite in peripheral blood. This does not occur with *Leishmania* that prefers macrophages of organs of the mononuclear phagocyte system then, just a few numbers of parasites is found in blood stream.

Although several authors had been reported an association to seropositivity for *Leishmania* here no risk factor was observed for both parasites (7, 8, 12). On the other hand, considering that babesiosis is tick-borne disease, the absence of one was confirmed as protector factor for *Babesia*.

A low rate of co-infection (3.84%) between *Leishmania* and *Babesia* was observed in the present study. In Brazil, researchers employing serological methods did not observed co-infection. Recent studies reported 2.6% and 13.3% rate of co-infection in Spain and Portugal, respectively (2, 22).

This study confirmed the presence of co-infection of *Babesia canis vogeli* and *Leishmania infantum* only in the urban area of São Luís Municipality, Maranhão State, northeastern Brazil, although both parasites were found in rural and urban areas. This result show that the vectors of these parasites are well adapted to urban environment and high density of these insects has contributed to the expansion of diseases that until 30 years ago were considered diseases of rural area. The urbanization of disease such as dengue, malaria and visceral leishmaniasis are related to the emergence or reemergence of their vectors (23). Although studies show that change climate, land use and transport can interfere with in the emergence of a pathogens, this mechanism is not very well understood (19).

The frequency of *Babesia canis vogeli* was higher in urban area, whereas *Leishmania infantum* DNA detection showed no statistically significant differences between rural and urban areas. This is one of the first studies to demonstrate co-infection using molecular detection (PCR). Despite the low rate of co infection, it is an interesting finding since the simultaneous occurrence of two parasites can lead to the worsening of animal health, which can develop a severe form of one these diseases. Considering, the high endemicity for canine visceral leishmaniasis and favorable climate for the development of the tick that transmits *Babesia canis* one would expect a higher rate of co infection.

Acknowledgements:

The authors would like to thank Ms Isadora Fontenele for English review. Dr. Abreu-Silva AL and Dr. Melo SA held a fellowship by CNPq

References

1. Barbosa DS, Rocha AL, Santana AA, Souza CSF, Dias RA, [Costa-Júnior LM](#), Abreu-Silva AL: Soroprevalência e variáveis epidemiológicas associadas à leishmaniose visceral canina em área endêmica no Município de São Luís, Maranhão, Brasil. Cienc Anim Bras. 2010; 11: 653-659.
2. Cardoso L, Tuna J, Vieira L, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G: Molecular detection of Anaplasma platys and Ehrlichia canis in dogs from the North of Portugal. Vet Journal 2010; 183: 232–233.
3. Carvalho Filho, Nordman Wall. *Dissertation*. Aspectos epidemiológicos leishmaniose e babesiose em cães de raça no município de São Luis – MA. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Estadual do Maranhão, 2008.
4. Cruz I, Acosta L, Gutiérrez MN, Nieto J, Cañavate C, Deschutter J, Bornay-Llinares FJ: [A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas \(Misiones, Argentina\)](#). BMC Infect Dis. 2010; 1(10):342.
5. Dagnone AS, Souza AI, [André MR](#), [Machado RZ](#): Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. Rev Bras Parasitol Vet. 2009; 18:20-25.
6. Desjeux P: The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001; 95: 239–243.
7. Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri, SHV: Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). Clinica Veterinária. 2000; 5 (28):36–44.

8. França-Silva, JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Gennaro O, Nascimento E: Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2003; 111(2-3):161-173.
9. Guimarães KS, Batista ZS, Dias EL, Guerra, RMSNC, Costa ADC, Oliveira AS, Calabrese KS, Cardoso FO, Sousa CSF, Zaverucha do Vale T, Abreu-Silva AL: Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;131:305-309.
10. [Jeronimo](#) SMB, Oliveira [RM](#), [Mackay](#) S, Costa [RM](#), [Sweet](#) J, Nascimento ET, [KG](#) Luz, Fernandes [MZ](#), Jernigan J, [Pearson](#) RP: An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 4:386-388.
11. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet J, Bastien P: Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 210–215.
12. Moreira Jr ED, Souza VMM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, Carvalho LP: Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(4):393-397.
13. Núcleo Geoambiental do Laboratório de Meteorologia– NUGEO.(<http://www.labgeo.uema.br>)
14. O'Dwyer LH, Lopes VV, Rubini AS, Paduan Kdos S, Ribolla PE: Babesia spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2009;18(2): 23-26.
15. Oliva G, Scalone A, Manzillo VF, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradon: Incidence and time course of Leishmania infantum infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs

- exposed to three consecutive transmission seasons. J Clin Microbiol. 2006; 44:1318–1322.
16. Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt EB: Managing canine vector borne diseases of zoonotic concern: part two. Trends Parasitol. 2009; 25:228-235.
 17. Passos L, Friche M, Geigerb SM, Ribeiro MFB, Pfister K, Zahler-Rinde M: First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. Vet Parasitol. 2005; 127: 81–85.
 18. Reithinger R and Dujardin JC Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. J Clin Microbiol. 2007;45(1)21-25.
 19. Rosenberg R, Beard CB. Vector-borne infections. Emerg. Infect Dis. 2011; 17(5):769-770
 20. Silva AR. Aspectos Epidemiológicos do Calazar Urbano na Ilha de São Luís - MA, Brasil: Infecção Humana. Rev Soc Bras Med Trop. 1996; 29: 233-240.
 21. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP: Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96(3): 285-291.
 22. Tabar MD, Francino O, Altet L, Sánchez A, Ferrer L, Roura X: PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniasis. Vet Record. 2009;164: 112-116.
 23. [Tauil PL](#). Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. [Rev Soc Bras Med Trop](#). 2006;39(3):275-7.

Table 1 Results of PCR assays for *Leishmania infantum* and *Babesia canis vogeli* and co-infection in canine from urban and rural area.

	<i>B. canis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L.infantum</i> <i>+B.canis</i>
Urban area	26.12 (35/134)	23.88 (32/143)	6.71 9(/134)
Rural area	4 (4/ 100)	24 (24/100)	- (0/ 100)
Urban	16.66 (39/ 234)	23.93 (56/ 234)	3.84 (9/ 234)
+			
Rural area			

Table 2 Univariate analysis for Leishmania infantum, Babesia canis vogeli and co-infection in canine from urban and rural area

Variables	<i>L. infantum</i> and <i>B. canis vogeli</i>							
		Positive animals						
Age	samples	<i>L. infantum</i>						P value
		<i>L. infantum</i>		<i>B. canis</i>		+		
						<i>B. canis</i>		
		n	%	n	%	n	%	
≥6months<2years	106	25	23.58	22	20.75	6	5.66	0.5779
≥ 2 ≤ 5years	70	19	27.14	10	14.28	1	1.42	
> 5 years	58	12	20.68	7	12.06	2	3.44	
		Positive animals						
gender	samples	<i>L. infantum</i>						P value
		<i>L. infantum</i>		<i>B. canis</i>		+		
						<i>B. canis</i>		
		n	%	n	%	n	%	
Male	139	29	20.86	22	15.82	6	4.31	0.68
Female	95	27	28.42	17	17.89	3	3.15	
		Positive animals						
hair type	samples	<i>L. infantum</i>						P value
		<i>L. infantum</i>		<i>B. canis</i>		+		
						<i>B. canis</i>		
		n	%	n	%	n	%	
short	188	49	20.06	30	15.95	7	3.72	0.3747
long	46	7	15.21	9	19.56	2	4.34	

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Leishmaniose visceral canina e babesiose são doenças de grande importância na clínica veterinária, que podem limitar a criação de cães;

Apesar das duas doenças serem endêmicas nas localidades estudadas, a taxa de coinfeção foi baixa;

A *Leishmania chagasi* causa lesões oculares e deve ser considerada em diagnóstico diferencial principalmente quando houver quadros de ceratite;

As alterações do meio ambiente e as condições sanitárias precárias contribuem para a manutenção e a disseminação da leishmaniose.

Dentre as raças estudadas, a Yorkshire terrier apresentou uma maior soroprevalência para infecção por *B.canis vogeli*.