

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Participação de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e
Ctenocephalides felis felis (Bouché, 1835) na epidemiologia da
leishmaniose visceral canina**

por

Gustavo Fontes Paz

**Belo Horizonte
Novembro/2010**

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Participação de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e
Ctenocephalides felis felis (Bouché, 1835) na epidemiologia da
leishmaniose visceral canina**

por

Gustavo Fontes Paz

**Tese apresentada com vistas à obtenção
do Título de Doutor em Ciências na área de
concentração Doenças Infecciosas e
Parasitárias**

Orientação: Dr. Edelberto Santos Dias

Co-orientação: Dr. Múcio Flávio B. Ribeiro

**Belo Horizonte
Novembro/ 2010**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P348
2010

Paz, Gustavo Fontes.

Participação de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) na epidemiologia da leishmaniose visceral canina / Gustavo Fontes Paz. – Belo Horizonte, 2010.

xiv, 63 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 69 - 77

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Leishmaniose Visceral/prevenção & controle
2. *Rhipicephalus sanguineus*/parasitologia **3. Cães/parasitologia**
I. Título. II. Dias, Edelberto Santos (Orientação). III. Ribeiro, Múcio Flávio Barbosa (Co-Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Participação de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e
Ctenocephalides felis felis (Bouché, 1835) na epidemiologia da
leishmaniose visceral canina**

por

Gustavo Fontes Paz

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes
membros:**

Prof. Dr. Edelberto Santos Dias (Presidente)

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Profa. Dra. Lileia Gonçalves Diotaiuti

Profa. Dra. Helida Monteiro de Andrade

Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite

Suplente: Profa. Dra. Nágila Francinete Costa Secundino

Tese defendida e aprovada em: 12/11/2010

À minha esposa Fernanda e ao meu filho João Pedro

Dedico

Agradecimentos

Ao Dr. Edelberto Santos Dias, chefe, orientador e amigo. Obrigado pelos ensinamentos fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal. O seu notório saber e sua simplicidade me tornaram uma pessoa mais madura.

À minha referência profissional como pesquisador e médico veterinário, Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro. Obrigado pela disponibilidade, paciência, confiança e rigor científico na elaboração e execução desse trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Leishmanioses em especial Dra. Érika Michalsky e Dra. Ana Cristina (Tina) pela valiosa colaboração nos experimentos.

Ao Dr. Ricardo Barata pela companhia, pelos conselhos e pela grande amizade construída ao longo dessa jornada.

Ao Dr. João Carlos França da Silva pela polêmica e pela serenidade.

À Dra. Consuelo Latorres Fortes – Dias pelas contribuições em várias etapas do estudo.

À Gerência de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte pelo imenso apoio e pelas preciosas contribuições. Um especial agradecimento aos agentes, supervisores e coordenadores das atividades de campo.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz e ao Programa de Pós – Graduação em Ciências da Saúde pela estrutura fornecida para a execução das atividades, com qualidade.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos eternos mestres: Prof. Romário Cerqueira Leite, Prof. Rômulo Cerqueira Leite e Prof. Marcelo Bahia Labruna pelas oportunidades de aprendizagem.

A todos que acreditaram e a todos que não acreditaram nesse projeto, pois o que seriam dos “altos” sem os “baixos”.

Este trabalho teve o apoio financeiro concedido pela Fundação Oswaldo Cruz no Programa de Apoio à Pesquisa (PAPES V - Processo 403608-2008/2).

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1 Introdução e Justificativa.....	15
1.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil.....	15
1.1.1 Breve histórico.....	15
1.1.2 O agente.....	17
1.1.3 Flebotomíneos vetores.....	20
1.1.4 Reservatórios silvestres.....	22
1.1.5 O reservatório doméstico (<i>Canis familiaris</i>).....	23
1.2 Participação de outros artrópodes na epidemiologia da leishmaniose visceral canina.....	26
2 Objetivos	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 Material e Métodos.....	31
3.1 Cães utilizados no experimento.....	31
3.2 Colônia de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	34
3.2.1 Criação e manutenção de larvas de <i>R. sanguineus</i> livres de <i>Leishmania</i> sp.....	34
3.2.2 Criação e manutenção de ninfas de <i>R. sanguineus</i>	37
3.2.3 Criação e manutenção de adultos de <i>R. sanguineus</i>	37
3.3 Detecção da infecção por <i>Leishmania</i> sp. em diferentes estágios de <i>R. sanguineus</i> (larvas, ninfas e adultos) provenientes de infestação artificial em cães com leishmaniose visceral canina.....	38
3.4 Estudo de prevalência de infestação por <i>R. sanguineus</i> e <i>Ctenocephalides felis felis</i> e associações com a soropositividade canina.....	40
3.4.1 Local do estudo.....	40
3.4.2 Animais amostrados.....	43
3.4.3 Inspeção para pulgas e carrapatos.....	43
4 Resultados.....	44
4.1 Artigos.....	51
Evaluation of the vectorial capacity of <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis.....	52
Association between the prevalence of infestation by <i>Rhipicephalus sanguineus</i> and <i>Ctenocephalides felis felis</i> and the presence of anti- <i>Leishmania</i> antibodies: a case-control study in dogs from a Brazilian endemic area.....	58
5 Discussão.....	61
6 Conclusões.....	66
7 Anexo.....	67
Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	68
8 Referências Bibliográficas.....	69

Lista de Figuras

- Figura 1 – Desenvolvimento de *Leishmania (Leishmania)* spp. no flebotomíneo vetor segundo Bates (2007). (a) Morfologia de amastigota e promastigota; Núcleo (N); kinetoplasto (K) e flagelo (F). (b) Seqüência do desenvolvimento das formas de promastigotas; promastigota procíclica, promastigota nectomona, promastigota leptomona, promastigota haptomona e promastigota metacíclica..... 19
- Figura 2 – Ciclo esquemático da epidemiologia da leishmaniose visceral com a participação do carrapato na endemia canina (Sherlock, 1964).....28
- Figura 3 – Cão do grupo infectado com sinais clínicos de leishmaniose visceral canina.....32
- Figura 4 – Material utilizado no exame de xenodiagnóstico com *Lutzomyia longipalpis*.....32
- Figura 5 – Cone de alimentação utilizado no xenodiagnóstico com *L. longipalpis*33
- Figura 6 – Exposição das fêmeas de *L. longipalpis* na região interna da orelha de um cão em fase de triagem do xenodiagnóstico.....33
- Figura 7 – Canil telado do Departamento de Parasitologia ICB – UFMG.....34
- Figura 8 – Teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus* acondicionadas em placas de cultivo.....35
- Figura 9 – Acondicionamento de larvas de *R. sanguineus* em seringas.....35
- Figura 10 – Câmara de infestação artificial de *R. sanguineus* fixada na base do aparelho auditivo e protegida pelo colar de elizabetano.....36

Figura 11 – Coleta dos estádios ingurgitados de <i>R. sanguineus</i> desprendidos naturalmente.....	36
Figura 12 – Ninfas ingurgitadas de <i>R. sanguineus</i> desprendidas naturalmente	37
Figura13 – Fêmeas ingurgitadas de <i>R. sanguineus</i> desprendidas naturalmente	38
Figura 14 – Intestino de teleógina de <i>R. sanguineus</i> dissecado para exames parasitológicos de infecção por <i>Leishmania</i> sp.....	39
Figura 15 – Mapa do município de Belo Horizonte com destaque para a área de estudo na região Noroeste.....	41
Figura 16 – Característica da área de estudo: área urbanizada com ocupação densa por edificações de um a dois pavimentos em sua maioria, presença de vegetação arbórea no interior dos lotes e relevo pouco acentuado.....	42
Figura 17 – Infestação de <i>R. sanguineus</i> no espaço interdigital da pata do cão.....	44
Figura 18 - Estrutura flagelada encontrada em larva de <i>R. sanguineus</i> alimentada em cão com Leishmaniose Visceral (Microscopia óptica 100 x / 1.25 objetiva de imersão).....	45

Figura 19 - Visualização da PCR com iniciadores genéricos para *Leishmania* em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. (MM) peso molecular Phi X 174; (Pool 1) larvas ingurgitadas cães positivos ; (Pool 2) larvas ingurgitadas cão negativo; (Pool 3) larvas ingurgitadas controle de extração; (Pool 4) ninfas pós-ecdise cães positivos; (Pool 5) ninfas pós-ecdise cão negativo; (Pool 6) ninfas pós-ecdise controle de extração ; (Pool 7) ninfas ingurgitadas cães positivos; (Pool 8) ninfas ingurgitadas cão negativo; (Pool 9) ninfas ingurgitadas controle de extração ; (PC) controle positivo; (NC) controle negativo.....46

Figura 20 - Visualização da PCR com iniciadores genéricos para *Leishmania* em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. (MM) peso molecular Phi X 174; (Pool 10) adultos pós-ecdise cães positivos ; (Pool 11) adultos pós-ecdise cães positivos; (Pool 12) adultos pós-ecdise cães positivos; (Pool 13) adultos pós-ecdise cães positivos; (Pool 14) adultos pós-ecdise cães positivos; (PC) controle positivo; (NC) controle negativo.....47

Figura 21 – Georreferenciamento dos cães amostrados na área de estudo com destaque para os locais de concentração dos cães soropositivos.....48

Figura 22 – Distribuição espacial de *R. sanguineus* na área de estudo.....49

Figura 23 – Distribuição espacial de *C. felis felis* na área de estudo.....50

Lista de Abreviaturas e Símbolos

BA: Bahia

BOD: Biochemical Oxygen Demand, demanda bioquímica de oxigênio

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

kDNA: DNA do cinetoplasto

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

LIT: Liver Infusion Tryptose, infusão de fígado e triptose

LV: Leishmaniose Visceral

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

NNN: Meio de cultura Novy McNeal e Nicolle

OMS: Organização Mundial de Saúde

pb: Pares de bases

PBS: Phosphate Buffered Saline, solução de fosfato tamponada

PCR: Polymerase Chain Reaction, reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

RIFI: Reação de Imuno-Fluorescência Indireta

TRALd: Teste Rápido Anti *Leishmania donovani*

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

WHO: World Health Organization

µg: Micrograma

µL: Microlitro

RESUMO

Foi realizado um estudo caso-controle para avaliar possíveis associações entre as infestações por *Rhipicephalus sanguineus*, ou por *Ctenocephalides felis felis*, e a detecção de anticorpos anti – *Leishmania* em cães de uma área endêmica para leishmaniose visceral. Foi avaliado, também, a capacidade vetorial de *R. sanguineus* na transmissão da leishmaniose visceral canina (LVC), utilizando condições controladas de laboratório. Para o estudo caso-controle, foi utilizada uma amostra de 200 cães soropositivos e 200 soronegativos provenientes de um inquérito sorológico censitário em 5556 cães, dos quais 7,8% (432) foram positivos na detecção de anticorpos anti – *Leishmania* pelos testes de ELISA e RIFI (Bio-Manguinhos). Os cães foram considerados infestados ou não por carrapato e pulga com base em inspeção direta para detecção dos ectoparasitas. Foi realizado o georreferenciamento dos cães soropositivos e da presença dos ectoparasitos na área de estudo. O estudo em condições controladas para a detecção da infecção de *R. sanguineus* por *Leishmania* sp., assim como uma possível interação entre estas duas espécies, foi realizado utilizando a PCR, isolamento em cultura e esfregaço em lâminas coradas por Panótico-Laborclin. Os exames foram realizados em estádios do carrapato provenientes de infestação artificial em cães com LVC. Os cães utilizados no experimento foram infectivos para *Lutzomyia longipalpis* pelo exame de xenodiagnóstico. Antes da realização dos exames os estádios foram mantidos de 4 a 15 dias em condições controladas de laboratório. A prevalência de infestação por *R. sanguineus* nos cães soropositivos (38,5%) foi significativamente maior que nos cães soronegativos (29%) ($p=0,04$); para *C. felis felis* também houve diferença significativa nas prevalências de infestação (36,5% e 15,5%, respectivamente) ($p<0,01$). A chance de positividade para *Leishmania* sp. foi 53% mais alta nos cães infestados por carrapato (Odds ratio [OR] = 1,53; intervalo de 95% de confiança [IC95%] = 1,01-2,33) e cerca de 3 vezes mais alta nos cães com infestação por pulga (OR = 3,13; IC95% = 1,94-5,06). Ambos os ectoparasitos estiveram amplamente distribuídos na área de estudo com uma tendência em acompanhar a distribuição dos cães soropositivos. A presença de anticorpos anti – *Leishmania* mostrou – se associada tanto à infestação por *R. sanguineus* quanto por *C. felis felis*. No estudo controlado, foram positivos pela PCR 10 “pools” de estádios do carrapato, incluindo estádios de ecdises sem alimentar. Nos esfregaços não foram observadas formas parasitológicas sugestivas de *Leishmania* spp., embora pode – se observar a presença de uma estrutura flagelada em um estádio de larva ingurgitada sugestivo de um tripanosomatídeo. Na cultura em meio NNN/LIT de todos os estádios analisados não foi observado o crescimento de *Leishmania* spp. Potenciais explicações para estes resultados recaem sobre a capacidade vetorial dessas espécies em transmitir *Leishmania* sp. para a população canina, porém mais estudos são necessários para rejeitar ou não essa hipótese.

ABSTRACT

The association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies has been evaluated in dogs located in an area of Brazil endemic for canine visceral leishmaniasis. Blood samples from 5556 domestic dogs were submitted to enzyme linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescent antibody assay, and 432 (7.8%) animals tested positive. Seropositive ($n = 200$) and seronegative ($n = 200$) dogs were randomly selected and examined for the presence of ticks and fleas, the results of which were expressed qualitatively as infested or non-infested, irrespective of the intensity of infestation. The vectorial capacity of *R. sanguineus* in the transmission of canine visceral leishmaniasis has been evaluated through a laboratory-controlled experiment. One healthy *Leishmania*-free dog, and two dogs naturally infected with *Leishmania*, were infested with *R. sanguineus* in various stages of development. Engorged larvae, unfed nymphs, engorged nymphs, unfed adults, engorged female adults and fed male adults were collected from the experimental animals and examined for *Leishmania* infection by optical microscopy, polymerase chain reaction (PCR) and parasite culture. All pools of *R. sanguineus* that had fed on the infected dogs tested PCR-positive for *Leishmania* DNA, with the single exception of the pool of engorged larvae. In contrast, all pools of ticks that had fed on the *Leishmania*-free dog were PCR-negative. *Leishmania* growth was not observed in any of the tick colonies following incubation on culture medium. *Leishmania* forms were not detected in any of the 433 smears prepared from engorged colonies and in none of the 118 smears prepared from unfed colonies. However, one flagellate structure was identified in one of the smears. The prevalence of infestation by *R. sanguineus* was significantly greater ($p = 0.04$) among seropositive dogs (38.5%) compared with their seronegative counterparts (29.0%). Similarly, the prevalence of infestation by *C. felis felis* was significantly greater ($p < 0.01$) within the seropositive group (36.5%) than within the seronegative group (15.0%). Moreover, the probability of seropositivity for *Leishmania* was 53% higher in tick-infested dogs and 300% higher in flea-infested dogs in comparison with non-infested animals. The study provides evidence of the vectorial capacity of these ectoparasites in transmitting *Leishmania* to the canine population, although further studies are needed to confirm or reject this hypothesis.

1 Introdução e Justificativa

1.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil

1.1.1 Breve histórico

As leishmanioses são zoonoses de grande importância médica e veterinária, sendo clinicamente, divididas em duas formas básicas: visceral e tegumentar. Estão entre as dez endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial de Saúde (OMS), devido ao seu caráter endêmico em 88 países de várias regiões do mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais das Américas, África, Ásia e Europa (OMS, 2003). Nas Américas, a leishmaniose visceral (LV) ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo que 90% dos casos são registrados no Brasil, onde está distribuída na maioria das unidades federativas, atingindo todas as regiões brasileiras.

Antes de 1934 somente três casos de LV eram conhecidos no continente americano, um provavelmente adquirido no Brasil e os outros dois na Argentina (Migone, 1913). Em 1934, Penna detectou formas de *Leishmania* sp. em 41 amostras de cortes histológicos de fígado provenientes de óbitos por febre amarela no Nordeste Brasileiro. Evandro Chagas et al. (1936), visitaram a área de estudo e fizeram o diagnóstico clínico do primeiro caso de LV no Brasil, com sintomatologia clínica semelhante à LV do Mediterrâneo. De 1936 a 1939, Chagas e colaboradores identificaram um foco no estado do Pará com a confirmação histológica posterior por Penna em oito humanos, alguns cães e um gato.

Por alguns anos a doença não foi considerada importante do ponto de vista da saúde pública. Somente em 1953, com um achado de 46 pacientes com LV, em uma expedição realizada por Aragão em Sobral no estado do Ceará, o Ministério da Saúde criou uma comissão para avaliar o problema e iniciar um programa de controle.

Os estudos realizados por Deane e Deane em 1955 descreveram os primeiros aspectos importantes da epidemiologia da doença no Brasil: o achado do primeiro hospedeiro silvestre, a raposa *Lycalopex vetulus*,

mostrando ser infectiva para *Lutzomyia longipalpis*; o papel de *L. longipalpis* como o único vetor importante e a aplicação de inseticidas com uma medida viável de controle. Os mesmos autores ao alimentarem exemplares de *L. longipalpis* em 14 pacientes, encontraram formas flageladas no intestino anterior e médio das fêmeas alimentadas em quatro pacientes. O estudo também foi conduzido em 16 cães naturalmente infectados, sendo que 12 dos animais foram infectivos para os flebotomíneos. Desta forma, os cães foram considerados como os principais reservatórios domésticos da doença, mas tendo o homem, também, como um potencial reservatório.

A partir da década de 70, além do aumento no número de casos notificados, observou-se a crescente urbanização da doença. Esse fenômeno vem sendo observado em várias regiões do país até os dias atuais (Jerônimo et al., 1994; Romero & Boelaert, 2010).

Em 1984, havia notificação de casos autóctones em 520 municípios e no ano de 2000, esse número aumentou para 930 . Em 1998, foi demonstrado que a maior ocorrência de calazar encontrava-se no Nordeste, com 92% do total das notificações, seguida pelas regiões Sudeste (4%), Norte (3%) e Centro-Oeste (1%) (Vieira & Coelho, 1998). Em 2004, as maiores taxas de incidência (casos/100.000 habitantes) foram registradas em Tocantins (12,04), Piauí (11,05), Mato Grosso do Sul (10,09) e Maranhão (9,76) (Ministério da Saúde, 2006).

Atualmente, o crescimento desordenado das cidades ocasionando a destruição do meio ambiente, associado ao aumento da crise social, têm sido apontados como principais determinantes promotores das condições adequadas para ocorrência da LV na área urbana. Além disso, a identificação da doença nos centros urbanos é freqüentemente postergada devido à carência de informação e treinamento adequados para os profissionais da Saúde (Brasil, 2006).

As ações direcionadas ao controle desta doença buscam atingir cada elo da cadeia epidemiológica, devendo ser empregadas de forma integrada. O controle vetorial tem como principal foco o controle químico, sendo preconizado em circunstâncias específicas como em áreas de registro recente de casos autóctones, áreas de transmissão moderada/intensa ou em surtos da doença. O controle do reservatório canino recomenda a prática da eutanásia em todos

os animais com sorologia e/ou exame parasitológico positivos para *Leishmania*. Quanto ao hospedeiro, as orientações são dirigidas para o diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos. Mais recentemente o manejo ambiental vem sendo utilizado como uma medida de controle promissora (Brasil, 2006).

O difícil controle da doença e conseqüentemente o aumento significativo da sua incidência parece ser conseqüência de um processo multifatorial, sendo um dos mais relevantes a participação cada vez mais significativa do cão como reservatório doméstico (Brasil, 2006).

1.1.2 O agente

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos, são eles: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* todos pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* (Lainson et al., 1977).

Existe grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo: se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela espécie *L. infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser identificada como *L. chagasi* (Maurício et al., 1999). Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (Lainson e Shaw, 1987). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (Maurício et al., 1999; Gontijo e Melo, 2004).

A posição taxonômica da espécie *L. chagasi* é a seguinte:

Reino: Protista (Haeckel, 1887)

Sub-Reino: Protozoa (Goldfuss, 1817)

Filo: Sarcomastigophora (Honiberg & Balamuth, 1963)

Subfilo: Mastigophora (Diesing, 1866)

Classe: Zoomastigophora (Calkins, 1909)

Ordem: Kinetoplastida (Vickkerman, 1976)

Subordem: Trypanosomatina (Kent, 1880)

Família: Trypanosomatidae (Grobber, 1905)

Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903)

Subgênero: *Leishmania* (Saf Janova, 1982)

Espécie: *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) (= *L. infantum*).

Uma característica comum de *Leishmania* spp. é a capacidade de estabelecer um parasitismo intracelular com sua forma de amastigota em macrófagos de vertebrados, mais precisamente em sobreviver no compartimento lisossomal dessa célula, um local geralmente de difícil invasão por outros microorganismos. Esse fato desencadeia todo o processo etiopatológico associado às leishmanioses (Chang & Bray, 1985).

O ciclo do parasito se inicia quando uma fêmea de flebotomíneo se alimenta sobre um hospedeiro infectado e ingere as formas amastigotas juntamente com o sangue. Uma vez diferenciadas em promastigotas, os parasitos exibem uma distribuição preferencial dentro do trato digestivo do vetor, formando “micro-habitats”, o que levou Lainson & Shaw (1987) a proporem a classificação de *Leishmania* spp. como suprapiláricas ou peripiláricas.

Parasitos com comportamento peripilárico estabelecem uma infecção inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e no intestino médio abdominal, migrando para as porções mais anteriores durante o seu desenvolvimento. Esses parasitos pertencem ao subgênero *Viannia*, cujos representantes são unicamente encontrados no Novo Mundo.

A maior parte de *Leishmania* spp. que causam doenças em humanos tem comportamento suprapilárico. O desenvolvimento desses parasitos é restrito à porção do trato digestivo anterior ao piloro, sobretudo nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio.

Semelhante ao comportamento peripilárico, os parasitos migram para as porções mais anteriores, onde podem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado (Lainson & Shaw, 1987).

Parasitos com comportamento suprapilárico pertencem ao subgênero *Leishmania*, o qual inclui a espécie *L. chagasi*.

Os parasitos enfrentam mudanças adversas durante a passagem do hospedeiro mamífero para o flebotomíneo (Killick-Kendrick, 1990; Bates, 2007). Para sobreviver a variações de pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes e oxigênio, os parasitos diferenciam-se em formas altamente especializadas que se distinguem quanto ao seu requerimento nutricional, taxa de crescimento e habilidade de se dividirem, regulação da expressão de moléculas de superfície e também em sua morfologia (revisado por Sacks et al., 2008). Diversos trabalhos utilizam variadas denominações para esses morfotipos, os quais já foram observados tanto em cultura quanto no vetor (Bates, 2007; revisado por Sacks et al., 2008;). A figura 1 ilustra esses morfotipos segundo o trabalho de Bates (2007).

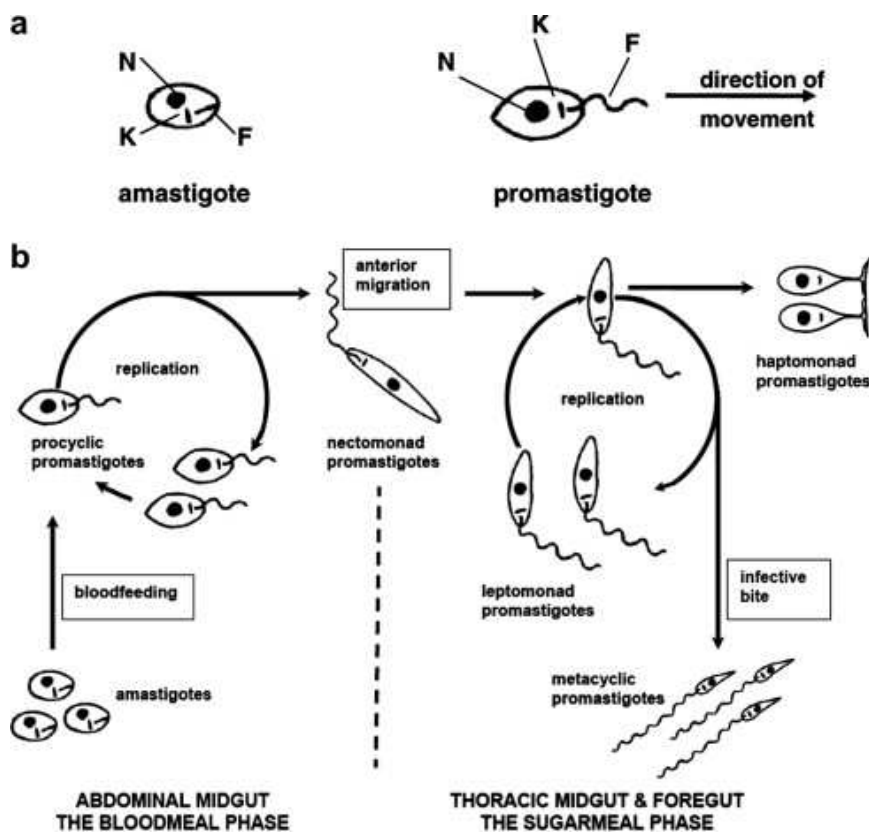


Figura 1 – Desenvolvimento de *Leishmania* (*Leishmania*) spp. no flebotomíneo vetor segundo Bates (2007). (a) Morfologia de amastigota e promastigota. Núcleo (N), kinetoplasto (K) e flagelo (F). (b) Seqüência do desenvolvimento das formas de promastigotas; promastigota procíclica, promastigota nectomona, promastigota leptomona, promastigota haptomona e promastigota metacíclica.

Segundo Chang & Bray (1985), algumas características são utilizadas para a identificação e classificação de *Leishmania* sp., são elas: sintomatologia clínica no hospedeiro vertebrado; distribuição geográfica; comportamento em animais de laboratório e em meio de cultura, interação com insetos vetores, morfologia pela microscopia óptica e eletrônica, estrutura molecular e funções, características imunológicas envolvendo resposta humoral, resposta celular, análises e detecções antigênicas.

O DNA do kinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp. tem sido alvo de pesquisa por muitos anos com a existência de uma literatura extensa sobre esse assunto. O kDNA pode ser separado do DNA do núcleo por um processo de centrifugação equilibrada em gradiente de densidade utilizando cloreto de céσιο. No kinetoplasto está presente de 10 a 25% do DNA total celular em uma rede de minicirculos (700 - 900 pares de base) e macrocirculos (20.000 – 40.000 pares de base). Nos macrocirculos estão contidos seqüências do DNA que são homologas a outras encontradas no genoma mitocondrial de outros eucariotas, que codificam os genes mitocondrial para a citocromo oxidase subunidades 1 e 2, ATPase subunidade 6 e citocromo b. A função dos minicirculos é incerta, embora suas propriedades heterogêneas tem sido intensamente exploradas como ferramenta para a diferenciação de espécies (Chang & Bray, 1985).

1.1.3 Flebotomíneos vetores

Os flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) são conhecidos popularmente por mosquito-palha, birigui, cangalhinha, asinha branca e tatuquira. Caracterizam-se pelo pequeno porte (1 a 3 mm de comprimento), ter o corpo e as patas cobertas de cerdas, hábitos de vôo crepusculares e abrigarem-se em locais úmidos e sombrios. Durante o pouso, mantém suas asas em posição vertical característica. Apenas as fêmeas são hematófagas e, portanto, possuem importância epidemiológica. São encontrados no peridomicílio e alimentam-se preferencialmente em animais domésticos (Sherlock, 1964).

Estes insetos costumam abrigar-se em troncos de árvores, tocas de animais, folhas caídas no solo, copa de árvores, frestas em rochas. Porém,

com a destruição das matas nativas, os habitats naturais destes insetos foram alterados, havendo então, uma restrição de ambientes por eles utilizáveis. Desse modo, as espécies que, de alguma forma, resistem às condições adversas, conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais dos peridomicílios (Forattini et al., 1976).

Os seus criadouros são de difícil localização na natureza, sendo que as larvas alimentam-se de matéria orgânica do solo e os adultos, tanto fêmeas quanto machos, de fontes naturais de açúcar (seiva e secreções de plantas) (revisado em Lainson & Rangel 2005). Além de açúcar, as fêmeas necessitam de alimentação sanguínea para a ovogênese (Killick-Kendrick, 1990).

Vários trabalhos sugerem que alguns fatores abióticos, como a temperatura, pluviosidade e umidade estão relacionados, em diferentes graus, com a ocorrência de flebotomíneos, seja por influência sobre os adultos ou pela modificação nos criadouros (revisado em Michalsky et al., 2009).

São descritos em torno de 800 espécies de flebotomíneos, com aproximadamente 425 encontradas no Novo Mundo e 375 no Velho Mundo. Mais de 100 espécies são incriminadas como possíveis vetoras de *Leishmania* spp., mas pouco menos de 50 são realmente comprovadas como vetores (Lainson & Rangel, 2005).

No Velho Mundo, diversas espécies estão envolvidas na transmissão da LV, como por exemplo, *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus neglectus* (revisado por Sacks et al., 2008). Já no Novo Mundo, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é, comprovadamente, o principal vetor da LV (Lainson et al., 1977).

L. longipalpis apresenta ampla distribuição geográfica desde o Sul do México até o Norte da Argentina e Paraguai, distribuição coincidente com a presença de LV nessas regiões. Esse inseto também tem habilidade de ocupar diversos nichos ecológicos, incluindo aqueles resultantes de ação antrópica (Young & Duncan, 1994).

Outra espécie que vem sendo incriminada como vetora em Corumbá-Mato Grosso do Sul é *Lutzomyia cruzi* (Santos et al., 1998). Porém, devido a uma enorme semelhança morfológica, *L. longipalpis* e *L. cruzi* estão agrupadas no complexo longipalpis, sendo as fêmeas indistinguíveis nas duas espécies, e

onde a identificação taxonômica específica se torna possível através de pequenas diferenças morfológicas entre os machos (Martins et al., 1984).

Fêmeas de outras espécies também foram encontradas infectadas pelo mesmo agente (com taxas de infecção não excedendo em sua maioria 0,5%), como *Lutzomyia almerioi* na Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul (Savani et al., 2009), *Lutzomyia neivai* e *Lutzomyia sallesi* em Lassance, Minas Gerais (Saraiva et al., 2009).

Porém, de acordo com Killick-Kendrick (1990), para ser considerado um vetor biológico o flebotômíneo deve: (1) se alimentar em humanos e no reservatório animal; (2) suportar o desenvolvimento do parasito depois que o bolo sanguíneo infectado tiver sido digerido e expulso; (3) possuir parasitos indistinguíveis daqueles isolados de pacientes e (4) ser capaz de transmitir o parasito pela picada.

1.1.4 Reservatórios silvestres

O achado do primeiro hospedeiro silvestre, a raposa *Lycalopex vetulus*, mostrando ser infectiva para *L. longipalpis* foi obtido por Deane e Deane (1955). Courtenay et al. (1996) entretanto, questionam a incriminação da espécie *L. vetulus* como reservatório da *L. chagasi*. Acreditam eles, que Deane et al. equivocaram-se na identificação do canídeo infectado, tendo o parasita sido encontrado, na verdade, na espécie *Cerdocyon thous*.

Sherlock (1964) e Sherlock et al. (1984) isolaram *L. chagasi* de dois gambás da espécie *Didelphis albiventris*, capturados em um foco de LV em Jacobina – BA, porém essa espécie não foi considerada como reservatório pelos autores, devido à baixa ocorrência da infecção nos animais amostrados (2 em 84 examinados).

O isolamento de *L. chagasi* de diversas raposas da espécie *Cerdocyon thous* e de diversos gambás da espécie *Didelphis marsupialis* e a infecção experimental em *L. longipalpis* alimentados nestes animais colocaram essas duas espécies comprovadamente na categoria de reservatórios de *L. chagasi* (Travi et al. 1998; Lainson & Rangel 2005;).

Em relação aos roedores, embora os resultados positivos pela PCR nos tecidos de algumas espécies sugerem que eles sejam reservatórios, o

isolamento do parasita e a infecção experimental em *L. longipalpis* alimentados nesses animais, são fundamentais para confirmar essa hipótese (Lainson & Rangel, 2005).

Um efetivo reservatório de qualquer parasito seria aquele que participasse de sua manutenção e disseminação na natureza, sendo aquele dependente de um vetor hematófago para sua transmissão. Assim, é necessário demonstrar que esse vetor pode ser infectado ao se alimentar no hospedeiro em questão (Lainson & Rangel, 2005).

1.1.5 O reservatório doméstico (*Canis familiaris*)

O cão representa um importante elo na manutenção do ciclo de transmissão da leishmaniose visceral e seu papel como reservatório tem sido objeto de estudo de muitos autores.

A doença no cão é descrita como, inicialmente, acompanhada por febre, descamação e eczema, especialmente, no espelho nasal e na orelha. Muitas vezes, pêlo opaco, pequenas úlceras rasas localizadas; freqüentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações. Com grande freqüência, observa-se nas fases mais adiantadas da doença, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarréia, hemorragia intestinal, edema das patas, vômito, além do aparecimento de áreas de hiperqueratose, especialmente, na ponta do espelho nasal. Na fase final da infecção ocorre, em geral, a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte do animal (Deane & Deane, 1955; Genaro, 1993). Entretanto, cães infectados podem permanecer clinicamente normais por um período muito longo de tempo e mesmo assim serem infectivos para *L. longipalpis* (Michalsky et al., 2007).

A resposta imune do hospedeiro canino tem um importante papel em sua caracterização como reservatório, devido à sua associação com a proteção e o desenvolvimento da infecção por este patógeno. Em cães, encontramos três quadros clínicos relacionados ao parasitismo por leishmaniose: a) cães sintomáticos: sinais aparentes, característicos da doença; b) cães oligosintomáticos: apresentam sinais brandos da doença e apenas dois ou três

sintomas relacionados; c) cães assintomáticos: infecção detectável apenas por exames laboratoriais (Mancianti et al., 1988).

A correlação entre dados clínicos e a resposta imune tem permitido identificar dois grupos de animais: a) os que apresentam proteção, estando esses imunes contra o parasito ou; b) os que são susceptíveis à infecção, permitindo a evolução da doença. O perfil da resposta imune relacionada a estes dois distintos grupos de animais é muito diferente. Em diversos trabalhos correlaciona-se a: a) resposta imune do tipo Th1 em animais resistentes que combateram a infecção impedindo a evolução da doença; b) ausência de resposta Th1, presença de resposta do tipo Th2 em animais que desenvolveram a doença (revisto por Baneth et al., 2008).

A confirmação do diagnóstico clínico deve ser realizada por exames laboratoriais, tendo em vista que os sinais e sintomas da doença não são patognomônicos. O diagnóstico parasitológico é o método de eleição e se baseia na demonstração microscópica do parasita em esfregaços obtidos através de punção em tecidos alvos como baço, medula, linfonodo e pele (Deane & Deane, 1955).

As taxas de positividade do diagnóstico parasitológico podem aumentar, introduzindo , juntamente com o exame de esfregaços de órgãos, a cultura de fragmentos desses tecidos em meio NNN/LIT, principalmente de medula óssea (Mayrink, 1967; Genaro, 1993).

Devido à maior rapidez e menor custo, os testes sorológicos são os mais empregados pelos programas de controle sendo seu uso recomendado em inquéritos caninos amostrais ou censitários para avaliar a soroprevalência canina e retirada dos animais infectados da área. Os testes mais utilizados são o ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Brasil, 2006). Animais doentes manifestam uma intensa resposta imune humoral, apresentando altos níveis de IgG anti-*Leishmania* sp. A soroconversão pode ocorrer, em média, após três meses da infecção e os títulos podem permanecer altos por, pelo menos, dois anos. Porém em animais saudáveis, supostamente infectados, essa resposta não é tão expressiva (Genaro, 1993).

Dos métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é o que se apresenta como o melhor, em termos de especificidade e sensibilidade,

para a detecção de DNA do parasito. A especificidade pode facilmente atingir 100%, desde que se usem iniciadores apropriados, o que pode ser muito útil em áreas onde várias espécies de tripanosomatídeos co-existem. A utilidade da PCR vem sendo demonstrada, repetidamente, mas suas limitações, incluem: o custo, a disponibilidade de reagentes, de equipamentos sofisticados, a pobre adaptabilidade do método às situações de campo e a capacidade de interpretação (Romero & Boelaert, 2010).

Embora a transmissão natural de *L. chagasi* ocorra principalmente pela picada de *L. longipalpis*, outros mecanismos de transmissão provavelmente estejam envolvidos na epidemiologia da leishmaniose visceral canina. Este fato se justifica devido à baixa taxa de infecção natural por *L. chagasi* nestes vetores, não excedendo em sua maioria 0,5% de acordo com uma revisão realizada por Montoya – Lerma et al. (2003), assim como a alta prevalência de cães infectados em regiões endêmicas, encontrados principalmente no Brasil (França-Silva et al., 2005; Dantas-Torres et al., 2006; Malaquias et al., 2007; Mestre e Fontes, 2007; Michalsky, 2007; Nunes et al., 2008). Além disso, em algumas áreas endêmicas *L. longipalpis* não é encontrada (Romero & Boelaert, 2010).

Uma das hipóteses a ser considerada seria a participação de outros artrópodes na manutenção e transmissão de *L. chagasi* para a população canina, fazendo com que a prevalência dessa infecção se mantenha alta e crescente nas áreas endêmicas, independente do controle químico da população de *L. longipalpis*.

Um dado também importante, do ponto de vista prático, são os freqüentes relatos dos agentes de controle de endemias e da população de áreas endêmicas, sobre a intensa infestação por pulgas e carrapatos nos cães, principalmente nos que são submetidos à eutanásia nos Centro de Controle de Zoonoses (CCZs) devido à detecção de anticorpos anti – *Leishmania* sp. nesses animais.

1.2 Participação de outros artrópodes na epidemiologia da leishmaniose visceral canina

São conhecidas cerca de 825 espécies de carrapatos no mundo, divididas em três famílias: Ixodidae (625 espécies), Argasidae (195 espécies) e Nuttallielidae (uma espécie). O carrapato vermelho do cão, *R. sanguineus* (Latreille, 1806), é provavelmente a espécie mais distribuída em todo o mundo, sendo adaptada nas Américas do Norte, Central e do Sul, nas regiões Leste e Oeste da Índia, China, Austrália, Micronésia, Sudeste da Europa, Madagascar e África (Soulsby, 1966).

Originária do continente africano, onde existem aproximadamente 20 espécies do gênero *Rhipicephalus* (Freitas et al., 1978), a espécie *R. sanguineus* está distribuída em todo território nacional e acredita-se que tenha sido introduzida no Brasil por volta do século XVI, com a entrada dos colonizadores europeus e seus animais (Labruna & Pereira, 2001).

R. sanguineus é um carrapato trioxeno, necessitando de três hospedeiros para completar o ciclo biológico que envolve os seguintes estádios: ovo, larva, ninfa e adultos macho e fêmea. Dentro do ciclo de vida dos carrapatos, o estágio de fêmea ingurgitada é o de maior importância no crescimento da população, pois é o único estágio que poderá dar origem a mais de um indivíduo; ou seja, enquanto uma fêmea poderá dar origem a milhares de larvas, uma larva ou uma ninfa poderá dar origem a apenas uma ninfa ou um adulto, respectivamente. Assim, pode-se inferir que no ambiente onde ocorre um maior desprendimento de fêmeas ingurgitadas do hospedeiro, será encontrado a maior parte das formas de vida livre do carrapato, especialmente as fases de fêmeas em postura, ovos e larvas não alimentadas (Paz et al., 2008).

Este carrapato tem sido encontrado em alta prevalência em cães urbanos, sendo descrita na literatura como uma das principais espécies de parasitos destes animais domésticos (Soulsby, 1966; Balashov, 1968; Linardi & Nagem, 1973; Labruna e Pereira, 2001; Soares et al., 2006). Com frequência, torna-se em uma importante praga urbana, que começa a requerer atenção dos organismos de Saúde Pública, sendo ainda, motivo de constante preocupação entre os profissionais veterinários em seus locais de atendimento. O

parasitismo humano por *R. sanguineus*, embora não seja muito comum, tem sido relatado em vários países do mundo, inclusive no Brasil e América do Norte (Gothe, 1989; Dantas -Torres et al., 2006; Guglielmone et al., 2006).

R. sanguineus é considerado um dos carrapatos de maior importância médico-veterinária do mundo. Além dos danos diretos causados pelo parasitismo em si, que não muito raramente pode levar cães à condição de exangue, é também vetor natural da bactéria *Ehrlichia canis* e dos protozoários *Babesia canis* (= *B. vogeli*), *B. gibsoni* e *Hepatozoon canis* (Smith et al., 1976; Gothe et al., 1989). Além disto, está envolvido na transmissão de riquetsias para humanos no Velho Mundo (especialmente *Rickettsia conorii*).

Alguns autores levantam a hipótese da participação de *R. sanguineus* na epidemiologia da LVC. Em um trabalho francês foi demonstrado a capacidade de *R. sanguineus* ser infectado experimentalmente e manter *Leishmania* sp. na transmissão transtadial, assim como transmitir a infecção por inóculo de macerado para o roedor *Citellus citellus* (Blanc & Caminopetros, 1930), porém o autor não descreveu de forma detalhada a metodologia utilizada para uma melhor interpretação de seus resultados.

Alguns pesquisadores do Mediterrâneo, citados por Sherlock (1964), apresentaram argumentos a favor da transmissão de *Leishmania* sp. por *R. sanguineus* (Figura 2). O mesmo autor salientou que flagelados de gênero próximo a *Leishmania* poderiam não apenas ser mantidos, como também se desenvolverem no tubo digestivo de ixodídeos. É interessante notar que a presença da matriz peritrófica, crucial para o desenvolvimento de *Leishmania* spp. no flebotomíneo (Pimenta et al., 1997), já foi demonstrada em outras espécies de carrapatos (Zhu et al., 1991).

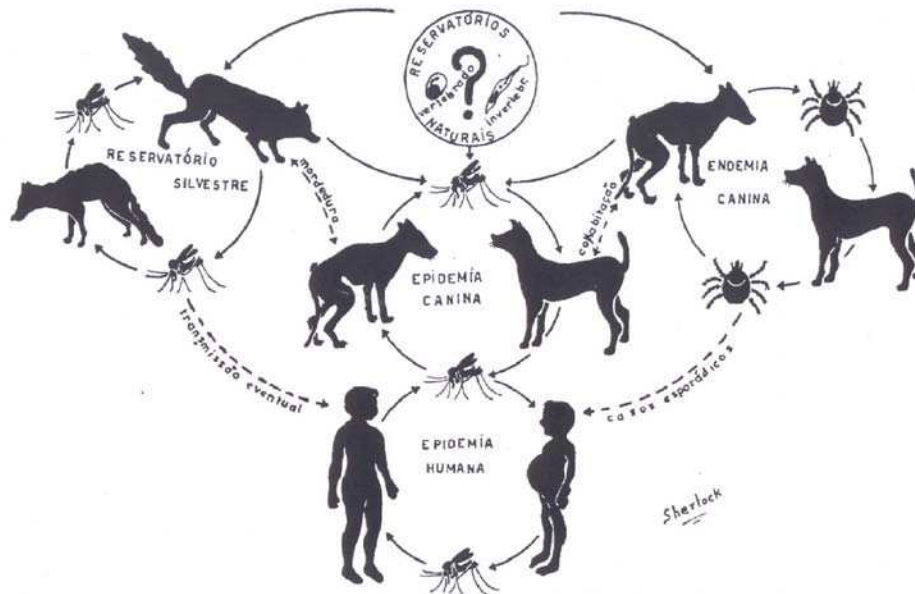


Figura 2 – Ciclo esquemático da epidemiologia da leishmaniose visceral canina com a participação do carrapato na endemia canina (Sherlock, 1964)

No Brasil foi demonstrado, apesar do pequeno número de *R. sanguineus* coletados (6 fêmeas, 11 machos e 22 ninfas) em cães soropositivos para *Leishmania* sp., uma taxa de infecção natural de 15,4% detectada pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). A infectividade de *Leishmania* sp. encontrada nos carrapatos foi comprovada através de inoculação experimental de macerados de carrapatos positivos em hamsters (*Mesocricetus auratus*), atingindo taxas de infectividade da ordem dos 58,8% pela técnica de esfregaço em fígado e baço (Coutinho et al., 2005).

Mais recentemente foi encontrada a detecção de kDNA em dois “pools” de glândula salivar (um de cinco fêmeas e outro de cinco machos) provenientes de *R. sanguineus* coletados de cães soropositivos para *Leishmania* sp. no sul da Itália (Dantas-Torres et al., 2010a). Os mesmos autores, ao infectarem experimentalmente teleóginas com formas promastigotas de *Leishmania infatum* também encontraram kDNA desse parasito nos ovos e larvas provenientes das mesmas (Dantas – Torres et al., 2010b).

A infecção natural de *R. sanguineus* por *Leishmania* sp., assim como uma boa interação entre estas duas espécies, pode ser favorecida por vários fatores como: a alta prevalência de ambas as espécies em cães urbanos de área endêmica para LVC; a grande duração do repasto sanguíneo, assim como um bom tempo de permanência e contato do carrapato com os cães; o processo

de digestão sanguínea dos carrapatos e a troca de hospedeiros para completar o ciclo trioxeno.

A capacidade de um agente etiológico de se manter, multiplicar e em alguns casos ser transmitido de forma transtadial e transovariana em uma espécie de ixodídeo, é um fator crucial para que se possa pensar na hipótese da possível capacidade vetorial deste carrapato em transmitir este agente.

A pulga da espécie *C. felis felis* também tem sido alvo de pesquisas devido à sua provável participação na epidemiologia da LVC (Coutinho e Linardi 2007, Ferreira et al. 2009), porém com menos fundamento científico que o carrapato.

As pulgas, independente de sua espécie, são insetos com metamorfose completa, sendo seu ciclo biológico dividido em quatro fases diferenciadas: ovo, larva, casulo pupal e adulto. O ciclo biológico dos pulicídeos tem início quando os ovos são depositados entre os pêlos dos hospedeiros. Após a oviposição, estes caem ao solo, tendendo a acumular-se em grandes quantidades nos locais habitualmente mais freqüentados pelos hospedeiros. As larvas eclodem no intervalo entre um e dez dias, de acordo com as condições ambientais de temperatura e umidade relativa, sendo o tempo médio de desenvolvimento larval de cinco a onze dias, passando por três instares, separados entre si por duas mudas de cutícula. No final do seu desenvolvimento, o terceiro instar larval deixa de se alimentar e esvazia seu trato digestivo, iniciando a produção de tênues fios de seda viscosos, para a formação do casulo pupal, que irá aderir-se a qualquer sujidade ambiental como grãos de areia ou outro tipo de resíduo. A emergência das pulgas adultas ocorre em cerca de 5 a 9 dias após o início da pupação, podendo chegar a um tempo longo como 140 dias. As pulgas emergentes apresentam fototropismo positivo e geotropismo negativo, além de serem atraídas por vibrações, correntes de ar, gás carbônico, ruídos, odores e outros estímulos químicos. Logo após a emergência, as pulgas iniciam o repasto sanguíneo e a oviposição ocorre num tempo máximo de 36 a 48 horas do primeiro repasto (Linardi e Guimarães, 2000).

A consequência da infestação por essa espécie em cães, vão desde danos provocados diretamente pela sua picada e transmissão de vários patógenos, até o desencadeamento de uma importante enfermidade, denominada "dermatite alérgica a picada de pulgas - DAPP", determinada por componentes

contidos na saliva dos sifonápteros. *C. felis felis* pode ser hospedeira de *Dipylidium caninum*, *Dirofilaria immitis* e de *Dipetalonema reconditum* (Linardi and Guimarães 2000).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliação da capacidade vetorial de *Rhipicephalus sanguineus* na transmissão da leishmaniose visceral canina e a provável associação da infestação por *Rhipicephalus sanguineus* e *Ctenocephalides felis felis* e infecção por *Leishmania* sp. em cães de área endêmica.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a infecção por *L. chagasi* em estádios ingurgitados de *R. sanguineus* (larva, ninfa e adulto) alimentados em cães infectados naturalmente.

Investigar a provável transmissão transestadial de *L. chagasi* em *R. sanguineus* alimentados em cães infectados naturalmente.

Determinar a prevalência de infestação natural de *R. sanguineus* e *C. felis felis* em cães soropositivos provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral.

Avaliar a importância da infestação por *R. sanguineus* e *C. felis felis* em cães de área endêmica para leishmaniose visceral como fator de risco para a infecção por *Leishmania* nestes animais.

3 Material e Métodos

3.1 Cães utilizados no experimento

Foram utilizados três cães, sem raça definida, para as infestações artificiais utilizando estádios de *R. sanguineus* criados em laboratório, sendo um cão sadio livre de infecção por *Leishmania* spp. (grupo controle) e dois cães infectados naturalmente com *Leishmania* sp. Os cães foram considerados infectados por apresentarem sintomatologia clínica característica de LVC (Figura 3); testes positivos de ensaio imunoenzimático (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI)(Bio-Manguinhos) e teste rápido de diagnóstico para *Leishmania donovani* (TRALd, *Inbios International*). Além da comprovação da infecção dos animais por *Leishmania* sp., a infectividade dos mesmos para *L. longipalpis* foi comprovada pela realização do xenodiagnóstico de acordo com Michalsky et al.(2007) (Figuras 4,5,6).



Figura 3 – Cão do grupo infectado com sinais clínicos de leishmaniose visceral canina



Figura 4 – Material utilizado no exame de xenodiagnóstico com *Lutzomyia longipalpis*



Figura 5 – Cone de alimentação utilizado no xenodiagnóstico com *L. longipalpis*



Figura 6 – Exposição das fêmeas de *L. longipalpis* na região interna da orelha de um cão em fase de triagem do xenodiagnóstico

O cão do grupo controle apresentou dois exames negativos de RIFI e ELISA, intervalados de 30 dias. Os cães foram mantidos em baias separadas padronizadas e teladas pertencentes ao canil do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (Figura 7).



Figura 7 – Canil telado do Departamento de Parasitologia ICB - UFMG

3.2 Colônia de *Rhipicephalus sanguineus*

3.2.1 Criação e manutenção de larvas de *R. sanguineus* livres de *Leishmania* sp.

Fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram coletadas de cães adultos soronegativos para *Leishmania* sp. nos testes de ELISA e RIFI. Os cães eram provenientes de uma área não endêmica para LVC. As teleóginas foram limpas, lavadas em água destilada e secas em papel filtro. Foram selecionadas e identificadas 30 fêmeas (Aragão & Fonseca, 1961), que foram acondicionadas, individualmente, em placas de cultivo de 24 wells e incubadas em estufa climatizada, com temperatura de 24 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ (Figura 8).



Figura 8 – Teleóginas de *R. sanguineus* acondicionadas em placas de cultivo.

Durante o período de postura foram coletados ovos a cada cinco dias, acondicionando 50mg de ovos em seringas plásticas descartáveis, previamente preparadas. As seringas foram fechadas com o próprio êmbolo e com algodão, e mantidas na estufa climatizada nas mesmas condições citadas anteriormente.



Figura 9 – Acondicionamento de larvas de *R. sanguineus* em seringas.

As larvas eclodidas (aproximadamente 1.250 por seringa) permaneceram na estufa em jejum de 15 a 20 dias antes das infestações (Figura 9).

Cada cão foi infestado com aproximadamente 2.500 larvas, utilizando duas câmaras de infestação (aproximadamente 1.250 larvas/câmara). O

modelo de câmara de infestação foi o mesmo utilizado por Pinter et al. (2002) modificado para cães. As câmaras foram fixadas na região dorsal da cabeça abrangendo o aparelho auditivo. Para prevenir a retirada da câmara, foi colocado um colar de elizabetano nos animais (Figura 10).



Figura 10 – Câmara de infestação artificial de *R. sanguineus* fixada na base do aparelho auditivo e protegida pelo colar de elizabetano

Após a infestação, de dois em dois dias foi realizada a abertura da câmara de infestação para a coleta das larvas ingurgitadas desprendidas naturalmente (Figura 11).



Figura 11 – Coleta dos estádios ingurgitados de *R. sanguineus* desprendidos naturalmente

3.2.2 Criação e manutenção de ninfas de *R. sanguineus*

As larvas ingurgitadas coletadas foram armazenadas em seringas devidamente identificadas. As seringas foram fechadas como anteriormente descrito, e mantidas na estufa climatizada. Após a ecdise, as ninfas permaneceram por 15 a 20 dias antes de serem utilizadas (ninfas pós – ecdise). Foram utilizadas aproximadamente 400 ninfas para cada cão, sendo inoculadas em duas câmaras de infestação (200 ninfas/câmara). Após a infestação, de três em três dias foi realizada a abertura da câmara de infestação para a coleta das ninfas ingurgitadas desprendidas naturalmente (Figura 12).



Figura 12 – Ninfas ingurgitadas de *R. sanguineus* desprendidas naturalmente

3.2.3 Criação e manutenção de adultos de *R. sanguineus*

As ninfas ingurgitadas coletadas foram mantidas nas mesmas condições laboratoriais das larvas ingurgitadas. Após a ecdise os adultos permaneceram em jejum por 15 a 20 dias antes de serem utilizados (adultos pós – ecdise). Os adultos foram separados por sexo e inoculados em duas câmaras de infestação, sendo aproximadamente 75 fêmeas e 75 machos para cada câmara. Após a infestação, de quatro em quatro dias foi realizada a abertura da câmara de infestação para a coleta das fêmeas ingurgitadas desprendidas

naturalmente (Figura 13). Os machos foram coletados quando todas as fêmeas haviam sido retiradas das câmaras de infestação.



Figura 13 – Fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* desprendidas naturalmente

3.3 Detecção da infecção por *Leishmania* sp. em diferentes estádios de *R. sanguineus* (larvas, ninfas e adultos) provenientes de infestação artificial em cães com leishmaniose visceral canina

O estudo da detecção da infecção de *R. sanguineus* por *Leishmania* foi realizado em estádios ingurgitados (larvas, ninfas e adultos) e nos estádios pós-ecdises. Antes da realização dos exames laboratoriais, os estádios ingurgitados ficaram de 4 a 7 dias incubados em estufa climatizada e os estádios pós – ecdises 15 dias. A determinação da infecção foi através de exames parasitológico, reação em cadeia da polimerase (PCR) e isolamento em cultivo.

O exame parasitológico foi realizado em estádios ingurgitados (larvas, ninfas e adultos) provenientes dos cães infectados. O número de cada estágio a ser estudado foi determinado através de cálculo amostral considerando uma prevalência esperada de 15% de acordo com Coutinho et al.(2005), 95% de confiança, uma margem de erro de 5%, encontrando 196 exemplares de cada estágio de larva ingurgitada e ninfa ingurgitada. Para os estádios de fêmeas ingurgitadas foram utilizadas apenas 10 amostras e para os estádios de

machos alimentados 31 amostras. As larvas e ninfas foram prensadas entre duas lâminas de vidro, e os adultos foram dissecados e realizado esfregaço do intestino (Figura 14). As lâminas foram coradas pelo método rápido (Panótico-Laborclin) e examinadas em microscópio sob imersão.

A mesma metodologia foi utilizada para os estádios pós - ecdise de *R. sanguineus*, com exceção do número de amostras necessárias para o estudo da transmissão transestadial e do tempo de permanência na estufa (15 dias). Foram utilizadas 59 amostras de ninfas e adultos cada (com uma probabilidade de 95% de detectar pelo menos um estágio positivo, adotando o limite de confiança $\alpha = 0,05$).



Figura 14 – Intestino de teleógina de *R. sanguineus* dissecado para exames parasitológicos de infecção por *Leishmania* sp.

A PCR foi realizada de acordo com Michalsky et al. (2007) utilizando os seguintes iniciadores genérico: (5' GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA 3'; 5' CCGCCCCTATTTTACACCAACCCC 3'; 5' GGCCCACTATATTACACCAACCCC 3'), para amplificação da região conservada do kDNA de minicirculo de *Leishmania* spp. (Degraive et al.,1994). Foram utilizados “pools” de 10 amostras dos estádios de cada colônia (larva ingurgitada, ninfa pós – ecdise, ninfa ingurgitada e adultos pós - ecdise).

Como controle positivo de extração de DNA dos estádios de *R. sanguineus*, utilizou a inoculação de 10µl de cultura de formas promastigotas

da cepa MHOM/BR/74/PP75 de *L. chagasi* em fase estacionária em cada “pool” de estádios do grupo controle macerado no *LIT*.

Para a determinação pelo cultivo, “pool” de 10 a 20 amostras de cada estádio proveniente dos cães infectados foi preparado como inóculo para a tentativa de isolamento de *Leishmania* em meio *NNN/LIT*. Para a preparação do inóculo cada “pool” de *R. sanguineus* foi imerso em álcool 70%, lavado em PBS 1% e macerado em meio *LIT*.

3.4 Estudo de prevalência de infestação por *R. sanguineus* e *Ctenocephalides felis felis* e associações com a soropositividade canina

3.4.1 Local do estudo

O estudo foi realizado no município de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, Brasil. O clima de Belo Horizonte é classificado como tropical de altitude, característica advinda de sua altitude média de 900 metros acima do nível do mar e da latitude de 19,9°S e longitude de 43,9°W, em que o período de verão registra chuvas e temperaturas elevadas, enquanto o inverno é caracterizado por baixas temperaturas e pouca precipitação (INMET,2009).

A temperatura é amena durante o ano, variando em média de 15°C a 28°C sendo a média anual de 21°C. O mês mais frio geralmente é julho, com uma temperatura mínima absoluta registrada de -4,1°C. O mês mais quente costuma ser janeiro, com uma temperatura máxima absoluta registrada de 35,4°C (INMET,2009).

A cidade conta com a proteção da Serra do Curral, que barra os ventos mais fortes. A umidade relativa do ar gira em torno de 65% e a média anual de chuvas é de 1.600mm, sendo mais frequentes de outubro a março.

As diferenças entre as quatro estações anuais não costumam ser tão pronunciadas como em localidades de climas temperados e os climatologistas dizem que, na maior parte do território brasileiro, podemos caracterizar duas estações anuais bem vistas (uma quente e úmida de outubro a março, e uma mais fria e seca de abril a setembro). As características mais bem vistas do clima tropical é enchentes/inundações no verão e queimadas no inverno. Ambas situações bem vividas na capital mineira e entorno.

O trabalho foi conduzido em uma área da região noroeste do município (Figuras 15 e 16); durante os meses de Janeiro, Fevereiro e Março de 2009 (estação de verão). De acordo com estimativas de 2009, a população de Belo Horizonte é de 2 452 617 habitantes. Na área de estudo há aproximadamente 62.000 habitantes (IBGE,2009). A área é considerada endêmica para leishmaniose visceral, sendo que no período de 2005 a 2009 foram confirmados a ocorrência de 19 casos humanos autóctones da doença, de acordo com dados da Secretaria Municipal de Saúde.

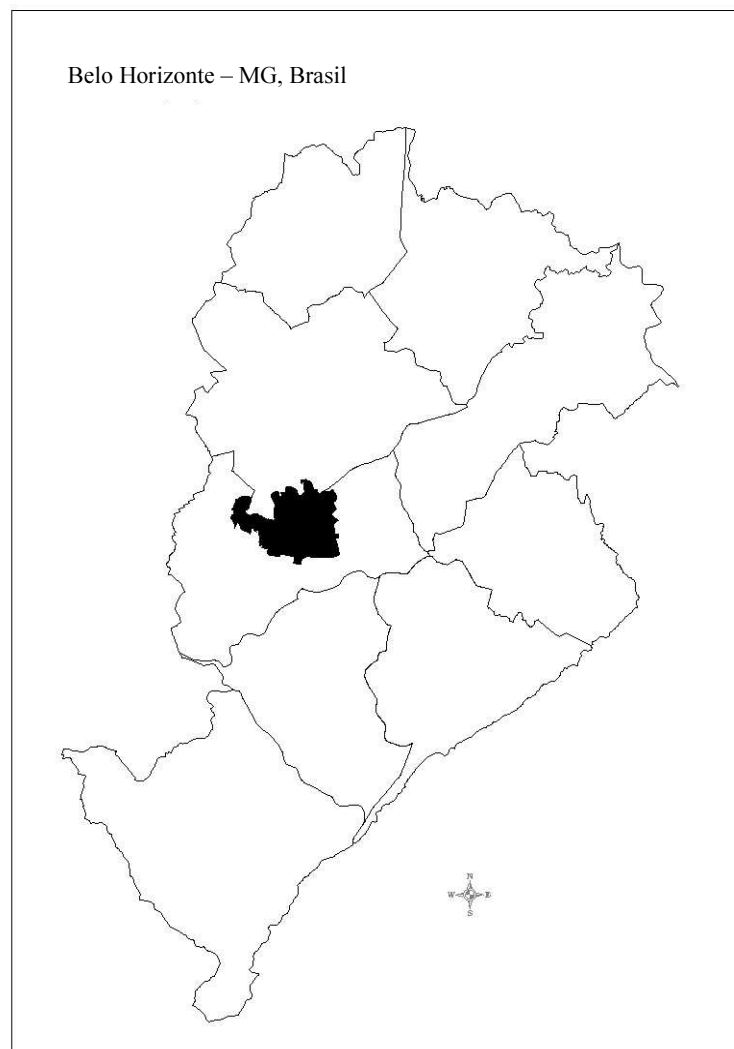


Figura 15 - Mapa do município de Belo Horizonte com destaque para a área de estudo na região Noroeste



Figura 16 – Característica da área de estudo: área urbanizada com ocupação densa por edificações de um a dois pavimentos em sua maioria, presença de vegetação arbórea no interior dos lotes e relevo pouco acentuado.

3.4.2 Animais amostrados

Inicialmente foram coletadas amostras sanguíneas de todos os cães domiciliados presentes na área de estudo durante os meses de janeiro a março de 2009, totalizando 5.556 animais. A coleta foi realizada em papel filtro e a detecção de anticorpos anti – *Leishmania* sp. foi feita pelos testes de ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Bio Manguinhos) de acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil (Brasil ,2006). O teste de ELISA foi utilizado como triagem e a RIFI como confirmatório, sendo considerado como soropositivo os cães com resultado positivo nos dois testes.

Após o resultado da sorologia foram selecionados, por sorteio, 200 cães soropositivos e 200 soronegativos , baseado no cálculo amostral para estudos caso-controle considerando uma prevalência esperada de infestações por pulga e carrapato nos cães de 35% e poder de 90% para detectar com significativo ($p < 0,05$) um Odds Ratio [OR] ≥ 2 entre infestação por pulga e carrapato e positividade para *Leishmania*. Os animais soronegativos tiveram o resultado confirmado 30 dias após os primeiros exames. Os animais amostrados, assim com a presença de ectoparasitas foram georreferenciados e os dados analisados no programa Mapinfo 7.5 e na ferramenta para construção do mapa de *kernel*

3.4.3 Inspeção para pulgas e carrapatos

Nos 400 animais amostrados foram realizadas inspeções para detecção da presença de pulga e carrapato. O resultado da inspeção para os ectoparasitos foi expresso de forma qualitativa, sendo o cão considerado infestado ou não independente da intensidade da infestação. A inspeção foi realizada na seguinte seqüência: rosto, aparelho auditivo externo, pescoço, regiões dorsal e ventral do tórax, abdômen e espaços interdigitais das patas (Figura 17). Foram coletadas 50 amostras de pulga e de carrapato aleatoriamente durante a inspeção sendo colocadas em tubos contendo álcool 70° e levados ao laboratório para identificação. Os carrapatos foram

identificados segundo Aragão & Fonseca (1961) e as pulgas segundo Linardi & Guimarães (2000).



Figura 17 – Infestação de *R. sanguineus* no espaço interdigital da pata do cão

Para o estudo das associações entre as infestações por pulga ou carrapato e a presença de anticorpos anti-*Leishmania* foi utilizado o teste qui-quadrado e calculados odds ratios e respectivos intervalos de 95% de confiança.

4 Resultados

No exame parasitológico das 433 lâminas confeccionadas dos diferentes estádios ingurgitados e das 118 dos estágios pós-ecdise não foram observadas formas sugestivas de *Leishmania*. Em um esfregaço de larva ingurgitada proveniente de um cão infectado foi verificada a presença de uma estrutura flagelada (Figura – 18).

No estudo pela PCR, os estádios evolutivos de *R. sanguineus* provenientes dos cães infectados foram denominados de colônia A e do cão sem infecção de colônia B (grupo controle). Foram utilizados 140 estádios de *R. sanguineus* divididos em 14 “pools” com 10 amostras cada, sendo: (1) larvas ingurgitadas da colônia A – LiA; (2) larvas ingurgitadas da colônia B – LiB; (3)

larvas ingurgitadas controle de extração – LIE; (4) ninfas pós-ecdise da colônia A – NA; (5) ninfas pós-ecdise da colônia B – NB; (6) ninfas pós-ecdise controle de extração – NE; (7) ninfas ingurgitadas da colônia A – NiA; (8) ninfas ingurgitadas da colônia B – NiB; (9) ninfas ingurgitadas controle de extração – NiE; (10) adultos pós-ecdise colônia A – A1; (11) adultos pós-ecdise colônia A – A2; (12) adultos pós-ecdise colônia A – A3; (13) adultos pós-ecdise colônia A – A4; (14) adultos pós-ecdise colônia A – A5. O maior número de “pools” de adultos pós-ecdise da colônia A se deu ao grande número de estádios recuperados. Dos “pools” de estágio de *R. sanguineus* alimentados no cão infectados todos foram positivos, com exceção do “pool” de larvas ingurgitadas (Li) (Figura 19 e Figura 20). Todos os “pools” de estádios obtidos do cão controle foram negativos. O cão do grupo controle permaneceu soronegativo para *Leishmania* sp. e sem sintomatologia clínica até o término do experimento

Quanto a cultura em meio *NNN/LIT* em todos os “pools” analisados não foi observado o crescimento de *Leishmania*.

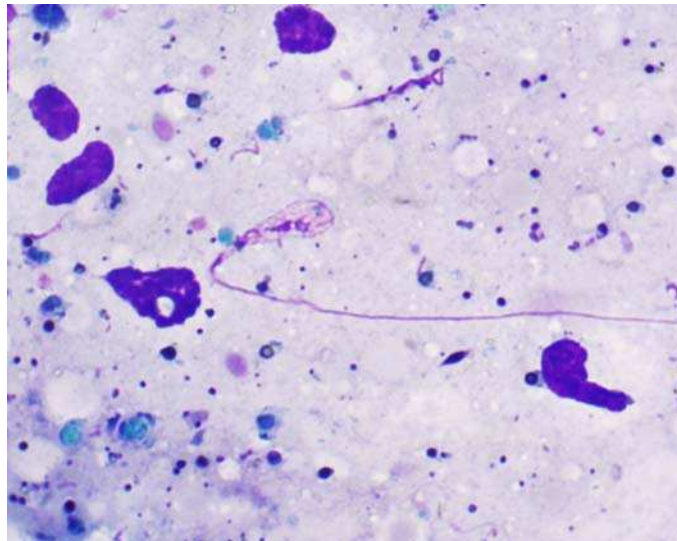


Figura 18 - Estrutura flagelada encontrada em larva de *R. sanguineus* alimentada em cão com Leishmaniose Visceral (Microscopia óptica 100 x / 1.25 objetiva de imersão)

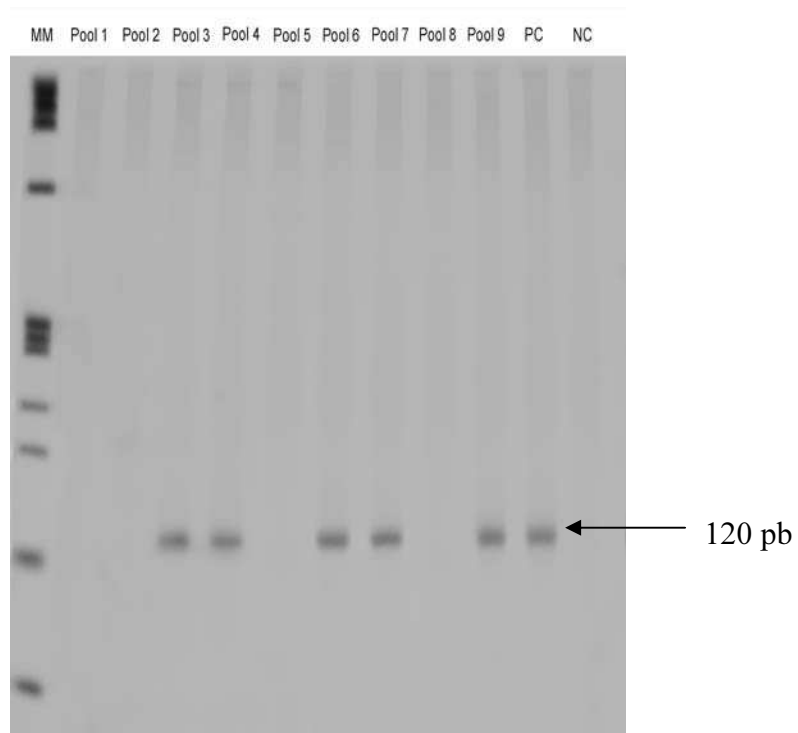


Figura 19 - Visualização da PCR com iniciadores genéricos para *Leishmania* em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. (MM) peso molecular Phi X 174; (Pool 1) larvas ingurgitadas cães positivos ; (Pool 2) larvas ingurgitadas cão negativo; (Pool 3) larvas ingurgitadas controle de extração; (Pool 4) ninfas pós-ecdise cães positivos; (Pool 5) ninfas pós-ecdise cão negativo; (Pool 6) ninfas pós-ecdise controle de extração ; (Pool 7) ninfas ingurgitadas cães positivos; (Pool 8) ninfas ingurgitadas cão negativo; (Pool 9) ninfas ingurgitadas controle de extração ; (PC) controle positivo; (NC) controle negativo

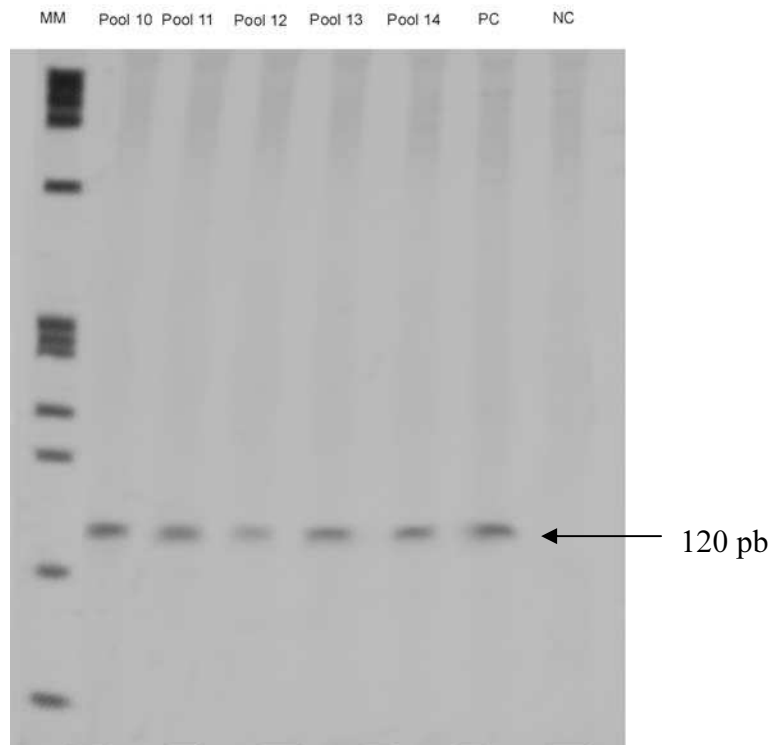


Figura 20 - Visualização da PCR com iniciadores genéricos para *Leishmania* em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata. (MM) peso molecular Phi X 174; (Pool 10) adultos pós-ecdise cães positivos ; (Pool 11) adultos pós-ecdise cães positivos; (Pool 12) adultos pós-ecdise cães positivos; (Pool 13) adultos pós-ecdise cães positivos; (Pool 14) adultos pós-ecdise cães positivos; (PC) controle positivo; (NC) controle negativo.

Com relação ao estudo de campo, foram coletadas 5556 amostras sanguíneas de cães da área de estudo das quais 432 (7,8%) apresentaram anticorpos anti – *Leishmania* detectados pelo ELISA e pela RIFI. Este resultado permitiu a formação dos grupos dos animais soropositivos e soronegativos necessários para o estudo .

As pulgas coletadas foram identificadas como sendo da espécie *C. felis felis* e todos os carrapatos foram da espécie *R. sanguineus*. A prevalência de infestação por *R. sanguineus* foi significativamente maior ($p=0,04$) no grupo de animais soropositivos (38,5%) quando comparado com o grupo soronegativo (29,0%). O mesmo foi observado com a infestação por *C.felis felis* onde o grupo de soropositivos apresentou maior prevalência (36,5%) que a do grupo soronegativo (15,0%) ($p<0,01$).

A chance de positividade para *Leishmania* sp foi 53% mais alta nos cães infestados por carrapato (OR = 1,53; IC95% = 1,01-2,33) e cerca de 3 vezes mais alta nos cães com infestação por pulga (OR = 3,13; IC95% = 1,94-5,06). A presença de ambos os ectoparasitas na área mostrou – se bem distribuída com uma tendência em acompanhar a distribuição dos cães soropositivos (Figura 5 e Figura 6).

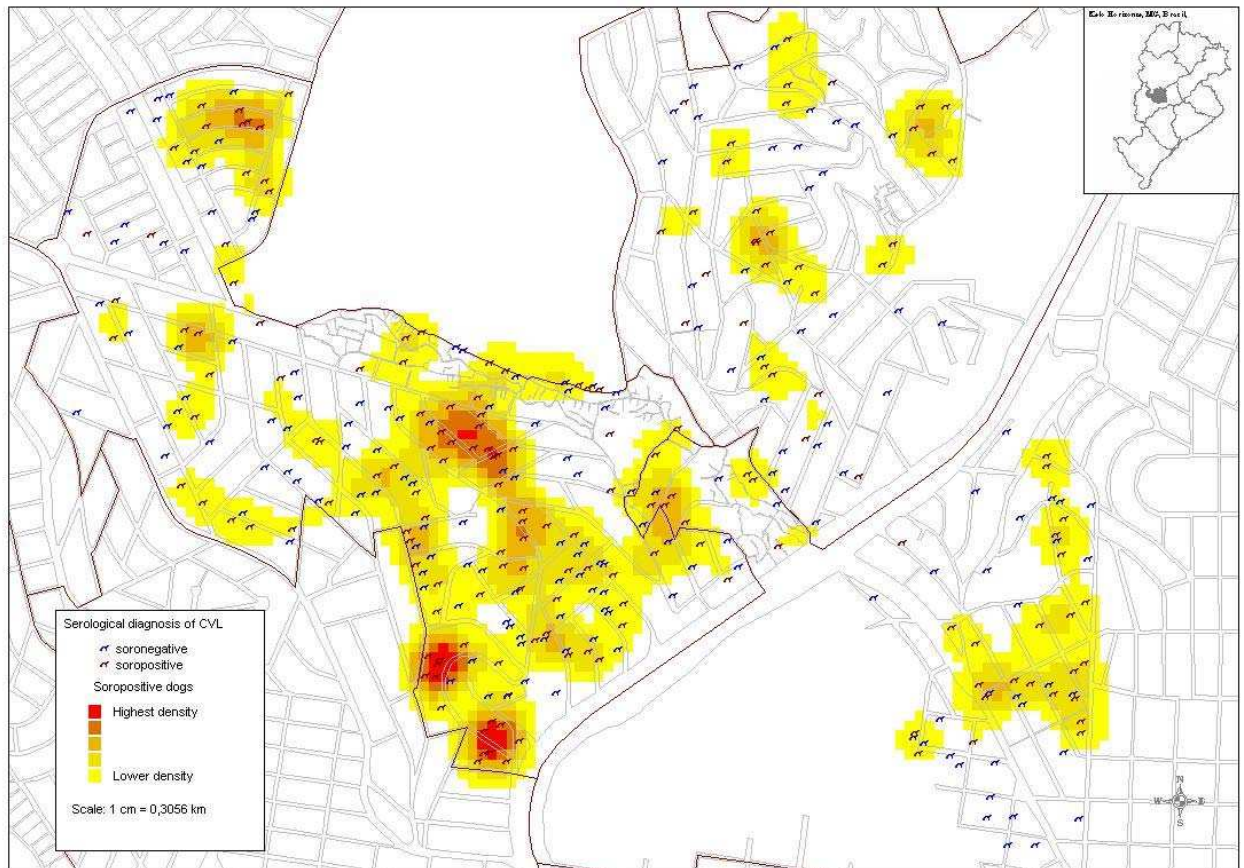


Figura 21 – Georreferenciamento dos cães amostrados na área de estudo com destaque para os locais de concentração dos cães soropositivos

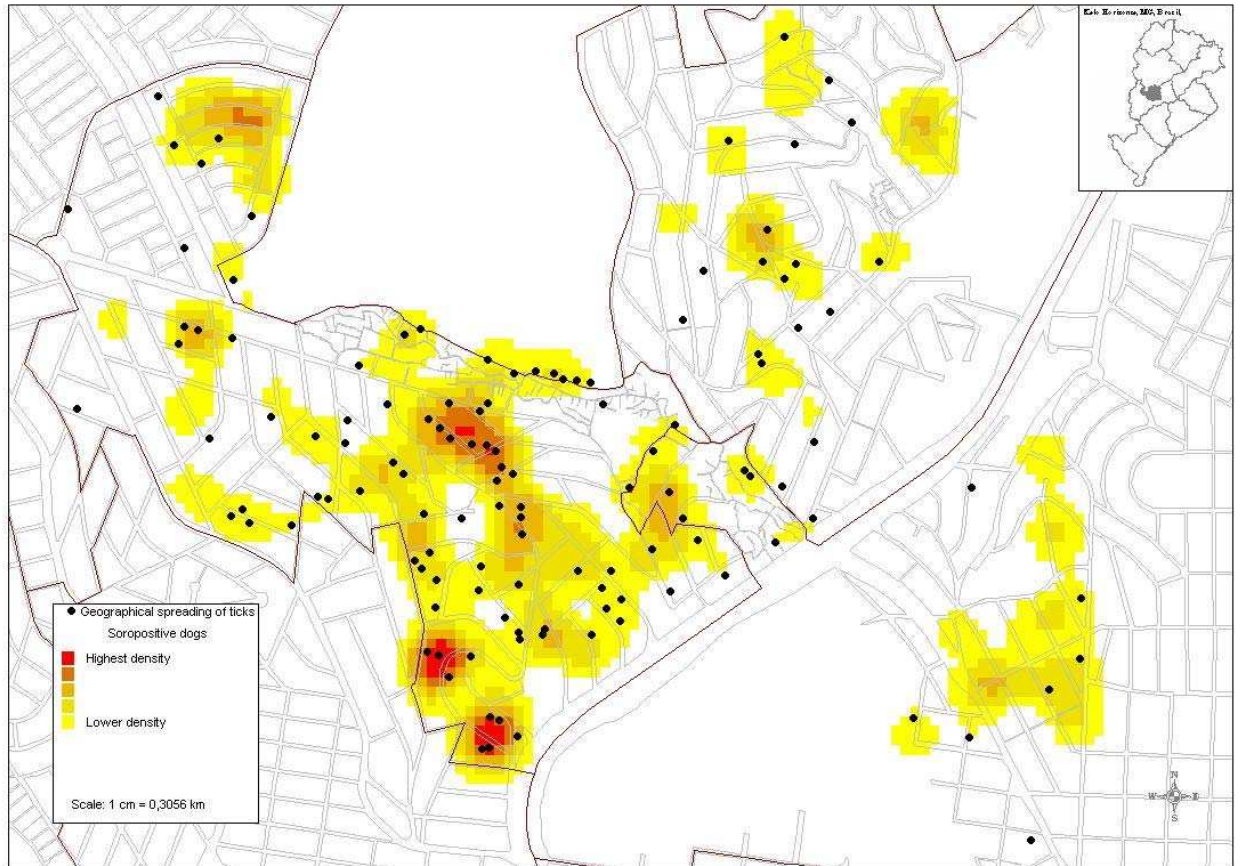


Figura 22 – Distribuição espacial de *R. sanguineus* na área de estudo

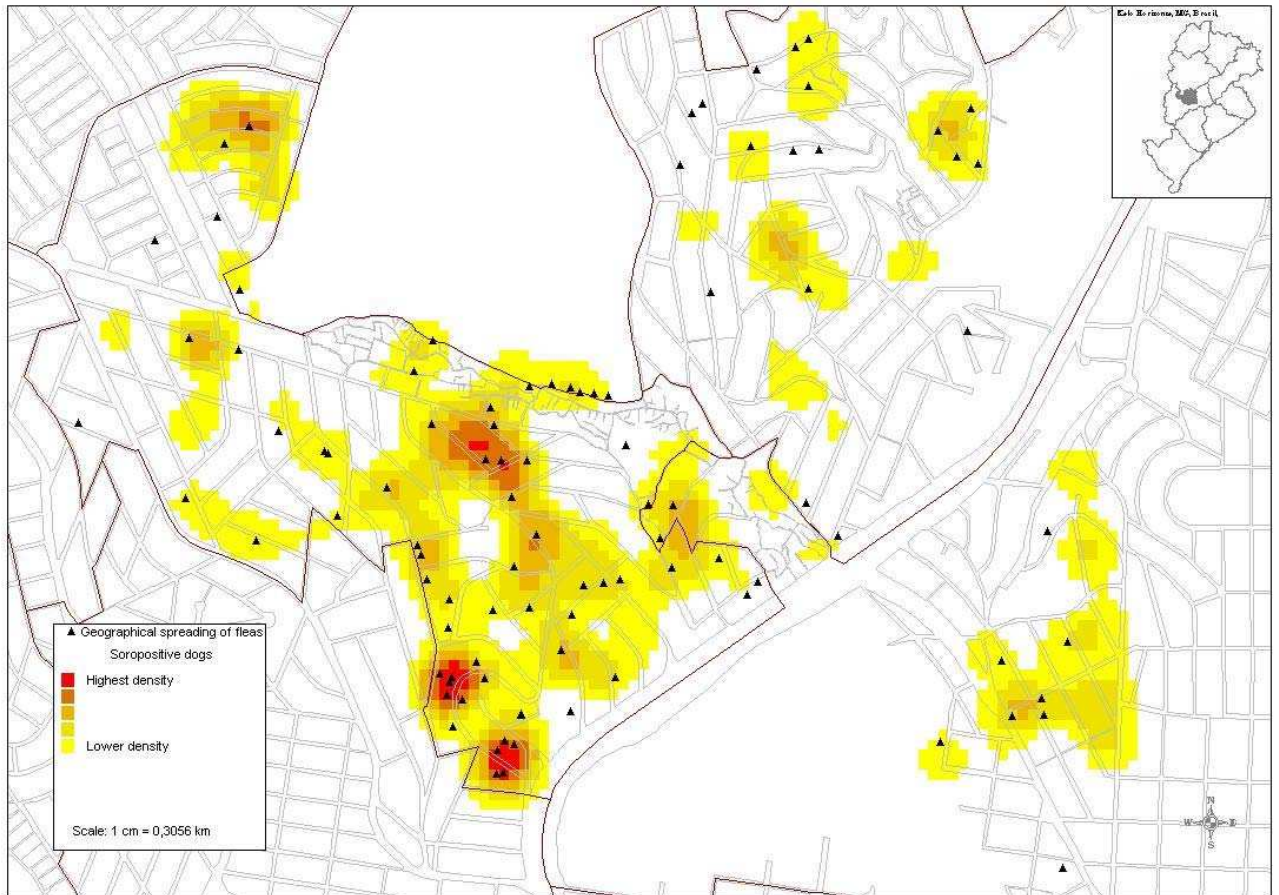


Figura 23 – Distribuição espacial de *C. felis felis* na área de estudo

4 .1 Artigos

Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis

Gustavo Fontes Paz · Múcio Flávio Barbosa Ribeiro · Érika Monteiro Michalsky · Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha Lima · João Carlos França-Silva · Ricardo Andrade Barata · Consuelo Latorre Fortes-Dias · Edelberto Santos Dias

Received: 29 July 2009 / Accepted: 23 November 2009 / Published online: 10 December 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract The vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* in the transmission of canine visceral leishmaniasis has been evaluated through a laboratory-controlled experiment. One healthy *Leishmania*-free dog and two dogs naturally infected with *Leishmania* were infested with *R. sanguineus* in various stages of development. Engorged larvae, unfed nymphs, engorged nymphs, unfed adults, engorged female adults and fed male adults were collected from the experimental animals and examined for *Leishmania* infection by optical microscopy, polymerase chain reaction (PCR) and parasite culture. *Leishmania* forms were not detected in any of the 433 smears prepared from engorged colonies nor in any of the 118 smears prepared from unfed colonies. However, one flagellate structure was identified in one of the smears. All pools of *R. sanguineus* that had fed on the infected dogs tested PCR-positive for *Leishmania* DNA, with the single exception of

the pool of engorged larvae. In contrast, all pools of ticks that had fed on the *Leishmania*-free dog were PCR-negative. *Leishmania* growth was not observed in any of the tick colonies following incubation on culture medium. Considering that no *Leishmania* forms were identified in any of the meticulously analysed smears derived from engorged colonies of *R. sanguineus*, it appears somewhat unlikely that the maintenance and multiplication of *Leishmania* occurs within the tick.

Introduction

Female sand flies of the species *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) are responsible for the natural transmission of *Leishmania chagasi* in the Americas, although it has been proposed that other vectors might also be involved in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis (CVL). Such a hypothesis is based on the finding that the rate of infection of *L. longipalpis* by *L. chagasi* is very low ($\leq 0.5\%$; Montoya-Lerma et al. 2003), while the prevalence of CVL in endemic regions of Brazil is very high (França-Silva et al. 2005; Dantas-Torres et al. 2006; Malaquias et al. 2007; Mestre and Fontes 2007; Michalsky et al. 2007; Nunes et al. 2008).

The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) is the most prevalent parasite amongst urban dogs (Soulsby 1966; Balashov 1972; Linardi and Nagem 1973; Labruna and Pereira 2001; Soares et al. 2006) and is known to be involved in the transmission of various pathogens including *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* (Smith et al. 1976; Gothe et al. 1989). Despite the lack of information concerning the interaction between *Leishmania*, host and vector or the capacity of ticks in transmitting *Leishmania*

G. F. Paz · É. M. Michalsky · A. C. V. M. da Rocha Lima · R. A. Barata · E. S. Dias (✉)
Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil
e-mail: edel@cpqrr.fiocruz.br

M. F. B. Ribeiro · J. C. França-Silva
Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

C. L. Fortes-Dias
Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática, Fundação Ezequiel Dias, 30510-010, Belo Horizonte, MG, Brazil

either mechanically or biologically, some researchers have hypothesised that *R. sanguineus* is involved in the epidemiology of CVL. In this context, there is evidence that some *Leishmania*-like flagellates are able to survive and develop within the digestive tube of Ixodidae ticks (Sherlock 1964). Moreover, since the process of intracellular digestion in Ixodidae parasites is slow, it is possible that *Leishmania* protozoa would not immediately be exposed to the proteolytic enzymes present in the gut and, hence, could remain viable for a prolonged period (Obenchain and Galun 1982).

Blanc and Caminopetros (1930) demonstrated that experimentally infected *R. sanguineus* is able to carry *Leishmania* during transstadial transmission and that the inoculation of tick macerates can produce infection in the European ground squirrel *Citellus citellus*. In a more recent study conducted in Brazil, Coutinho et al. (2005) collected ticks from dogs that were seropositive for *Leishmania* and reported a rate of natural infection of 15.4% as established by polymerase chain reaction (PCR). Additionally, the experimental inoculation of hamsters (*Mesocricetus auratus*) with macerates prepared from *Leishmania*-positive ticks revealed an infectivity rate of approximately 58.8% as determined by examination of liver and spleen smears.

The somewhat limited success in the control of CVL that has been achieved so far indicates that our knowledge concerning the epidemiology of CVL is still insufficient and that the involvement of other vectors in the transmission of *Leishmania* to canine reservoirs is very plausible. With the aim of evaluating the vectorial capacity of *R. sanguineus* and its possible participation in CVL transmission, a laboratory-controlled experiment involving the exposure of ticks at several stages of development to dogs naturally infected with *Leishmania* has been conducted. Engorged larvae, unfed nymphs, engorged nymphs, unfed adults, engorged female adults and fed male adults were collected from the experimental animals and examined for *Leishmania* infection by optical microscopy, PCR and parasite culture.

Materials and methods

Study animals

One healthy *Leishmania*-free dog (control animal) and two dogs that had been naturally infected with *Leishmania* (experimental animals) were used in the experiment. All three dogs were maintained in separate standardised cages at the kennel of the Parasitology Department of the Institute of Biological Sciences at the Universidade Federal de Minas Gerais. Infection in the experimental dogs was previously confirmed by clinical examination (symptoms compatible with CVL), enzyme-linked immunosorbent

assay (ELISA), indirect immunofluorescent antibody test (IFAT), rapid immunochromatographic test (TRALd/rK39; InBios International, Seattle, WA, USA) and xenodiagnosis with *L. longipalpis* as described by Michalsky et al. (2007). Absence of infection in the control dog was demonstrated by negative ELISA and IFAT assays carried out twice at 30-day intervals.

Establishment and maintenance of *Leishmania*-free and *Leishmania*-infected *R. sanguineus* colonies

Engorged *R. sanguineus* females were collected from adult seronegative (as determined by ELISA and IFAT) dogs and immediately cleaned, washed with distilled water and blotted-dried over filter paper. Thirty selected engorged females were placed separately in 24-well culture plates and maintained in an incubator at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ at a relative humidity $\geq 80\%$. Eggs were collected at 5-day intervals during the oviposition period and transferred to disposable plastic syringes (50 mg/syringe). The harvested eggs were kept in the syringe (closed at one end by the plunger and at the other by a cotton wool plug) and incubated under the conditions described above. Hatched larvae (approximately 1,250 larvae/syringe) were maintained in an incubator for 15–20 days until required for infestation experiments.

Each of the study dogs was infested at the dorsal region of the head with approximately 2,500 larvae by fixing two infestation chambers (1,250 larvae/chamber) prepared according to Pinter et al. (2002) with slight modification for dogs. In order to prevent removal of the chambers, the head and ears of the dog were screened off using an Elizabethan dog collar (Fig. 1). Every 2 days, the infestation chambers were opened in order to collect the



Fig. 1 Experimental dog being prepared for experiments. The infestation chambers were fixed on the top of the head, which was screened off using an Elizabethan collar

naturally released engorged larvae, which were then placed into labelled syringes, closed and maintained in an incubator under the conditions described above. Following ecdysis, nymphs were kept in an incubator for 15–20 days until required for further infestation experiments. Each study dog was infested with approximately 400 unfed nymphs using two infestation chambers (200 nymphs/chamber). Every 3 days, the infestation chambers were opened in order to collect the naturally released engorged nymphs, which were then placed into labelled syringes, closed and maintained in an incubator under the conditions described above. After ecdysis, adults were kept in an incubator for 15–20 days, following which they were separated according to sex and immediately employed in further infestation experiments. Each study dog was infested with 300 unfed adults using two infestation chambers (75 females and 75 males per chamber). Every 4 days, the infestation chambers were opened for the collection of naturally released engorged female adults. The males were removed from the infestation chambers after the engorged females had been collected.

Investigation of infection of *R. sanguineus* larvae, nymphs and adults with *Leishmania*

R. sanguineus at various stages of development (i.e. engorged larvae, unfed nymphs, engorged nymphs, unfed adults, engorged female adults and fed male adults) were tested for *Leishmania* infection using parasitological (microscopic examination of smears), molecular (polymerase chain reaction—PCR) and biological (parasite culture) methods. Prior to analysis, ticks were incubated at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ at a relative humidity $\geq 80\%$ for 4–7 days for those in the engorged phases or for 15 days for those in the unfed phases.

Parasitological examination was performed on engorged larvae, nymphs and adult ticks collected from infected dogs. The number of individuals that needed to be examined was calculated on the basis of an expected prevalence of 15% (Coutinho et al. 2005), within a confidence interval of 95% and an error margin of 5%. Thus, 196 engorged larvae and 196 engorged nymphs were analysed. For adult ticks, ten engorged females and 31 fed males were analysed. Larvae and nymphs were squashed between two glass slides, whereas adults were dissected and smears of the intestine were prepared. Slides were stained with Panotic stain (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) and examined under the optical microscope at $\times 1,000$ magnification. A similar methodology was employed for the unfed colonies of *R. sanguineus*, except that the number of unfed nymphs and adults was 59 individuals each (95% probability of detecting at least one positive individual and confidence limit of $\alpha=0.05$).

PCR was conducted according to Michalsky et al. (2007) using generic primers (5' GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA 3'; 5' CCGCCCTATTTTACACCAACCCC 3'; 5' GGCCACTATATTACCAACCCC 3') in order to amplify the conserved region within the minicircles of *Leishmania* kDNA (Degraeve et al. 1994). DNA was extracted from 14 different tick pools (each consisting of ten individuals) characterised as follows: pool 1—engorged larvae from experimental dogs; pool 2—engorged larvae from the control dog; pool 3—positive control comprising macerate of engorged larvae from the control dog mixed with 10 μL of stationary-phase promastigotes of *L. chagasi* (strain MHOM/BR/74/PP75) previously cultured in liver infusion tryptose (LIT) medium; pool 4—unfed nymphs from experimental dogs; pool 5—unfed nymphs from the control dog; pool 6—positive control comprising macerate of unfed nymphs from the control dog mixed with *Leishmania* promastigotes (as in pool 3); pool 7—engorged nymphs from experimental dogs; pool 8—engorged nymphs from the control dog; pool 9—positive control comprising macerate of engorged nymphs from the control dog mixed with *Leishmania* promastigotes (as in pool 3); pools 10 to 14—unfed adults from experimental dogs.

In order to isolate *Leishmania* from the various tick colonies, parasite cultures were established in Novy, McNeal and Nicolle (NNN)/LIT medium from engorged larvae, engorged nymphs, engorged females and fed males using 10–20 individuals for each isolation. Inocula of the various colonies were prepared by immersing each colony pool in 70% commercial alcohol, washing in 1% phosphate-buffered saline and macerating in LIT medium. In the case of engorged females, the intestines were dissected and macerated in LIT medium. All cultures were incubated at 25°C for 50 days with periodic subculture at 7-day intervals.

Results

Leishmania forms were not detected in any of the 433 smears prepared from colonies of engorged ticks or in any of the 118 smears from unfed colonies. However, one flagellate structure was identified in one of the smears prepared from engorged larvae fed on one of the experimental dogs (Fig. 2).

PCR assays revealed that pools 4, 7 and 10–14 of *R. sanguineus* that had fed on the experimental dogs were positive for *Leishmania* DNA, while pool 1, comprising engorged larvae from experimental dogs, presented a negative PCR test. All of the pools fed on the control dog (i.e. pools 2, 5 and 8) were negative. It is important to note that the control dog remained seronegative for *Leishmania* and without CVL symptoms until the end of the experi-

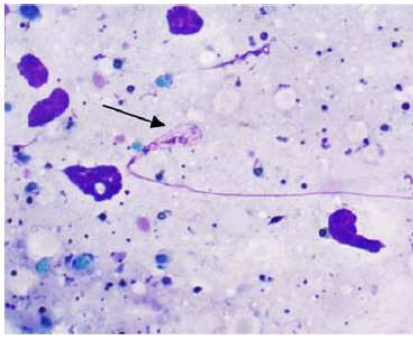


Fig. 2 Flagellate structure (arrowed) found in a smear prepared from *R. sanguineus* engorged larvae fed on *Leishmania*-infected dogs ($\times 1,000$ magnification; 1.25 objective)

ment. As expected, the PCR of the positive controls (pools 3, 6 and 9) were positive for the presence of *Leishmania* DNA (Figs. 3 and 4). *Leishmania* growth was not observed in any of the tick colonies cultured in NNN/LIT medium.

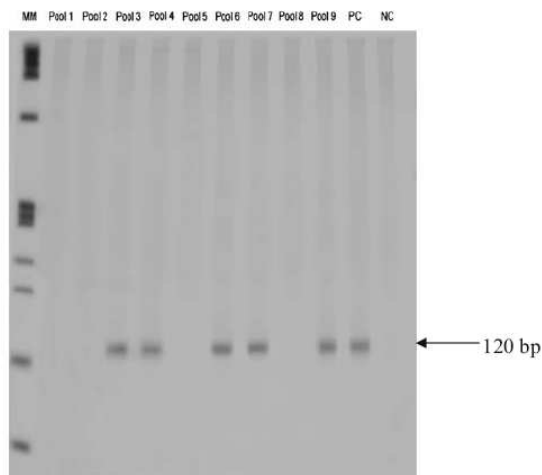


Fig. 3 Polyacrylamide gel electrophoresis (6%; silver stain) of PCR amplicons obtained using *Leishmania* generic primers. DNA was extracted from nine different tick pools (each consisting of ten individuals) characterised as follows: *pool 1* engorged larvae from experimental dogs; *pool 2* engorged larvae from the control dog; *pool 3* positive control comprising macerate of engorged larvae from the control dog mixed with 10 μ L of stationary-phase promastigotes of *L. chagasi* (strain MHOM/BR/74/PP75) previously cultured in liver infusion tryptose medium; *pool 4* unfed nymphs from experimental dogs; *pool 5* unfed nymphs from the control dog; *pool 6* positive control comprising macerate of unfed nymphs from the control dog mixed with *Leishmania* promastigotes (as in pool 3); *pool 7* engorged nymphs from experimental dogs; *pool 8* engorged nymphs from the control dog; *pool 9* positive control comprising macerate of engorged nymphs from the control dog mixed with *Leishmania* promastigotes (as in pool 3). *MM* molecular marker, *PC* positive control (*L. braziliensis*/M2903), *NC* negative control (no DNA)

Discussion

The importance of *R. sanguineus* as a vector for pathogenic organisms such as *B. canis* and *E. canis* is unquestionable (Smith et al. 1976; Gothe et al. 1989). With regard to *Leishmania*, the natural infection of *R. sanguineus* is favoured by many factors including the high prevalence of both ectoparasite and protozoan, in urban dogs within CVL-endemic areas, the prolonged duration of the blood feeding process, the prolonged contact between ticks and dogs, the slow digestion of ticks and the swapping of hosts during the life cycle of the tick. However, in order to confirm the postulated role of *R. sanguineus* as a vectorial agent in CVL, it is necessary to establish the capacity of the tick in supporting the growth and multiplication of *Leishmania*, together with the subsequent transstadial transmission of the protozoan.

The results obtained in the present study offer only limited support for a vectorial role of *R. sanguineus* but are insufficient to confirm or reject the hypothesis outright. *Leishmania* DNA was evidently present in the various developmental stages of *R. sanguineus*, including in unfed (post-ecdysis) nymphs and adults, suggesting the possibility of maintenance and transstadial transmission of *Leishmania* by the tick. However, PCR is a very sensitive technique, and small amounts of *Leishmania* DNA (≤ 1 ng) can be detected in samples (Prichard 1997). The results obtained with PCR can be misleading because DNA from just a few protozoa or from a single organism can give a positive

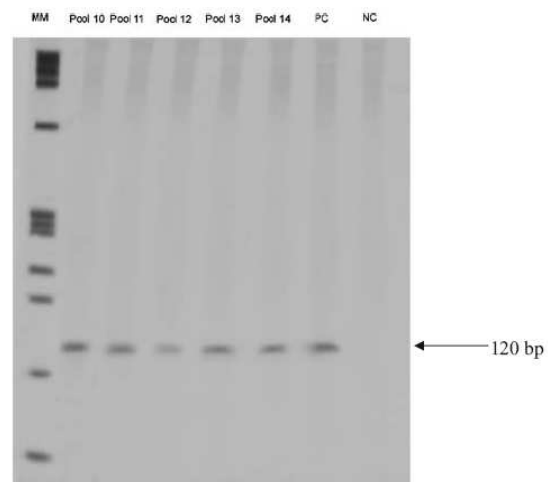


Fig. 4 Polyacrylamide gel electrophoresis (6%; silver stain) of PCR amplicons obtained using *Leishmania* generic primers. DNA was extracted from five different colonies (pools 10–14) of unfed adults collected from experimental dogs, each consisting of ten individuals. *MM* molecular marker, *PC* positive control (*L. braziliensis*/M2903), *NC* negative control (no DNA)

result, and the technique can also detect fragments of the target DNA. Hence, a positive PCR does not necessarily characterise a valid interactive infection of this protozoa with *R. sanguineus*.

According to the study conducted by Coutinho et al. (2005), 15.6% of the *R. sanguineus* forms collected from naturally infected dogs were infected with *Leishmania*, and the viability of such forms were confirmed by inoculating macerates into *C. citellus*. However, the methodology used by these authors is questionable since the macerates of *R. sanguineus* were inoculated immediately after collection of the ticks. It is possible, therefore, that ticks still contained undigested blood monocytes from the vertebrate host in which infecting *Leishmania* amastigotes were present. In the study described here, tick colonies were incubated under controlled conditions for between 4 and 15 days following removal from the experimental animals in order to assess the survival of *Leishmania* in the gut of *R. sanguineus*.

The study of the digestion process in Ixodidae species is rendered somewhat difficult because of the slow and prolonged feeding process that occurs continuously whilst the tick is in contact with the host. Indeed, ticks feed during all developmental stages from engorgement until the drop-off point. Another problem is that protease activity in the gut depends on a number of factors including the development stage of the tick, the feeding period and the sex of the parasite (Obenchain and Galun 1982). There is, however, no evidence that the *Leishmania* forms ingested with blood are destroyed in the intestine by the direct action of digestive enzymes (Balashov 1972).

The flagellate structure found in one of the smears prepared from engorged *R. sanguineus* larvae suggests the presence of organisms belonging to the family Trypanosomatidae since similar flagellates have been previously detected, but not characterised, in Ixodidae ticks (Sherlock 1964). Moreover, the occurrence of *Crithidia hyalommae* flagellates within eggs and haemolymph of *Hyalomma* and *Boophilus calcaratus* ticks has been reported (Balashov 1972), and *Trypanosoma theileri* epimastigotes have been found in haemolymph from Ixodidae larvae (Ribeiro et al. 1988).

Considering that no *Leishmania* forms were identified in any of the numerous (433 in total) meticulously analysed smears derived from engorged colonies of *R. sanguineus*, it appears somewhat unlikely that the maintenance and multiplication of *Leishmania* occurs within *R. sanguineus*. Hence, the hypothesis concerning the possible vectorial capacity of *R. sanguineus* remains in doubt, and the interspecific relationship between *Leishmania* and *R. sanguineus* demands further investigation. In particular, information is essential concerning which of the developmental stages of *R. sanguineus* might be susceptible to *Leishmania* infection, whether *Leishmania* can survive and

multiply within the gut of the tick during digestion and subsequently develop into an infecting form for the vertebrate host and the possibility of transstadial transmission of *Leishmania* by *R. sanguineus*.

The two infected dogs, which had their infection checked through serology and xenodiagnosis with *L. longipalpis*, were sufficient to provide the number of *R. sanguineus* stages previously determined by the statistical method employed. The PCR results showed that different stages of *R. sanguineus* ingested *Leishmania*, thus demonstrating that the number of dogs was enough to reach our objective. Further investigations should be designed so as to eliminate any possible effects of the characteristics of the individual vertebrate host on the interaction between *R. sanguineus* and the infected animals.

Acknowledgements The authors wish to thank the staff of the Secretaria Municipal de Saúde (Bom Sucesso, MG, Brazil) and the Serviço de Controle de Zoonoses (Belo Horizonte, MG, Brazil) for their valuable assistance. Special thanks are due to Prof. Evaldo do Nascimento for assistance with the maintenance of the dogs. The project was financially supported by PAPES V/FIOCRUZ (Proc. 403608/2008-2).

Ethical standards The study was submitted to and approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ) under protocol no. L-044/08. All procedures involving experimental animals were conducted according to the guidelines of Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Conflict of interest None.

References

- Balashov YS (1972) Bloodsucking ticks (Ixodidae)—vectors of diseases of man and animals. *Misc Publ Entomol Soc Am* 8:161–376
- Blanc G, Caminopetros J (1930) La transmission du Kala-Azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. *C R Acad Sci* 191:1162–1164
- Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi PM (2005) Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 128:49–155
- Dantas-Torres F, De Brito ME, Brandão-Filho SP (2006) Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol* 31:54–60
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U (1994) Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*—a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89:463–469
- França-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GL, Vieira EP, Prata A, Mayrink W, Nascimento E, Fortes-Dias CL, Da Silva JC, Dias ES (2005) Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 10:213–220
- Gothé R, Wegerot S, Walden R, Walden A (1989) Epidemiology of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs in Germany. *Kieintierpraxis* 34:309–320

- Labruna MB, Pereira MC (2001) Carrapato em cães no Brasil. *Clin Vet* 30:24–32
- Linardi PM, Nagem RL (1973) Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. *Rev Bras Biol* 33:529–538
- Malaquias LC, Do Carmo Romualdo R, Do Anjos JB Jr, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Reis AB (2007) Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniasis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. *Parasitol Res* 100:233–239
- Mestre GL, Fontes CJ (2007) The spread of the visceral leishmaniasis epidemic in the State of Mato Grosso, 1998–2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:42–48
- Michalsky EM, Rocha MF, Da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, Dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES (2007) Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* 147:67–76
- Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, Lane RP (2003) Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop* 85:19–29
- Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, Burattini MN (2008) Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 6:19–23
- Obenchain FD, Galun R (1982) *Physiology of ticks*. Pergamon, Oxford
- Pinter A, Labruna MB, Faccini JLH (2002) The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on male feeding period in the laboratory. *Vet Parasitol* 105:79–88
- Prichard R (1997) Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 31:155–175
- Ribeiro MFB, Lima JD, Guimarães AM (1988) Occurrence of *Trypanosoma theileri*, Laveran 1902, in *Boophilus microplus* in the State of Minas Gerais, Brazil. *Arq Esc Vet UFMG* 35:65–68
- Sherlock IA (1964) Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 16:19–26
- Smith RD, Sells DM, Stephenson EH, Ristic M, Huxoll DL (1976) Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. *Am J Vet Res* 37:119–126
- Soares AO, Souza AD, Feliciano EA, Rodrigues AF, D'agosto M, Daemon E (2006) Evaluation of ectoparasites and hemoparasites in dogs kept in apartments and houses with yards in the city of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 15:13–16
- Soulsby EJJ (1966) *Biology of parasites, emphasis on veterinary parasite*. Academic, New York, pp 72–77



Contents lists available at ScienceDirect

Preventive Veterinary Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prevetmed

Short communication

Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case–control study in dogs from a Brazilian endemic area

Gustavo F. Paz^a, Múcio F.B. Ribeiro^b, Danielle F. de Magalhães^c, Kelly P.B. Sathler^d, Maria Helena F. Morais^d, Vanessa O.P. Fiúza^d, Silvana T. Brandão^d, Guilherme L. Werneck^e, Consuelo Latorre Fortes-Dias^f, Edelberto S. Dias^{a,*}

^a Laboratório de Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 30123-970 Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Gerência de Controle de Zoonoses, Prefeitura de Belo Horizonte, 30130-007 Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, 21041-210 Rio de Janeiro, Brazil

^f Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, 30510-010 Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2010

Received in revised form 16 August 2010

Accepted 26 August 2010

Keywords:

Leishmania

Dogs

*Rhipicephalus sanguineus**Ctenocephalides felis felis*

ABSTRACT

The association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies has been evaluated in dogs located in a city of Brazil endemic for canine visceral leishmaniasis. Blood samples from 5556 domestic dogs domiciliated in the urban area of Belo Horizonte (Minas Gerais state) were submitted to enzyme linked immunosorbent (ELISA) and indirect immunofluorescent antibody (IFAT) assays, and 432 (7.8%) animals tested positive. Seropositive ($n = 200$) and seronegative ($n = 200$) dogs were randomly selected and examined for the presence of ticks and fleas, the results of which were expressed qualitatively as infested or non-infested, irrespective of the intensity of infestation. The prevalence of infestation by *R. sanguineus* was significantly greater ($p = 0.04$) among seropositive dogs (38.5%) compared with their seronegative counterparts (29.0%). Similarly, the prevalence of infestation by *C. felis felis* was significantly greater ($p < 0.01$) within the seropositive group (36.5%) than within the seronegative group (15.0%). Moreover, the probability of seropositivity for *Leishmania* was 53% higher in tick-infested dogs and 300% higher in flea-infested dogs in comparison with non-infested animals. Our data provide evidence of the vectorial capacity of these ectoparasites in transmitting *Leishmania* to the canine population, although further studies are needed to confirm or reject this hypothesis.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is endemic in a number of Brazilian cities, including Belo Horizonte, the

capital of the State of Minas Gerais (Margonari et al., 2006; Borges et al., 2008). CVL is caused by protozoa of the genus *Leishmania*, among which *Leishmania chagasi* is the principal agent responsible for the infection of dogs (*Canis familiaris*) and humans. The natural transmission of *L. chagasi* occurs via females of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), a species of phlebotomine sand flies, that have been shown to occur in Belo Horizonte (Souza et al., 2004).

* Corresponding author. Tel.: +55 31 33497758; fax: +55 31 33497758.
E-mail address: edel@cpqrr.fiocruz.br (E.S. Dias).

Table 1

Association between infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies in dogs from an area of Brazil that is endemic for visceral leishmaniasis.

Ectoparasite infestation	Seropositive dogs, n (%)	Seronegative dogs, n (%)	Odds ratio	95% confidence interval	ρ value
<i>R. sanguineus</i>					
Yes	77 (38.5)	58 (29.0)	1.53	1.01–2.33	0.04
No	123 (61.5)	142 (71.0)	1.00		
<i>C. felis felis</i>					
Yes	73 (36.5)	31 (15.5)	3.13	1.94–5.06	<0.01
No	127 (63.5)	169 (84.5)	1.00		

A number of studies relating to the epidemiology of CVL have indicated that in some endemic areas the rate of infection of *L. longipalpis* with *L. chagasi* is very low (Montoya-Lerma et al., 2003). It has, therefore, been proposed that transmission of CVL might involve the participation of other vectors including ticks of the family Ixodidae, in particular *Rhipicephalus sanguineus*, and the cat flea *Ctenocephalides felis felis* (Coutinho et al., 2005; Coutinho and Linardi, 2007; Ferreira et al., 2009; Otranto and Dantas-Torres, 2010; Paz et al., 2010). Both arthropods are cosmopolitan and are considered by veterinarians to be the most important ectoparasites of domestic animals by virtue of their direct and indirect involvement with various other diseases, especially in cases of severe infestation (Linardi and Nagem, 1973; Labruna and Pereira, 2001; Gehrke et al., 2009; Otranto and Wall, 2008; Paz et al., 2008).

The aim of the present study was to evaluate the association between the prevalence of infestation by *R. sanguineus* and *C. felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies in dogs from an area of Brazil that is endemic for CVL.

2. Materials and methods

The study was submitted to and approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ) under protocol number L-044/08. All procedures involving experimental animals were conducted according to the guidelines of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

The described case-control study was conducted during the summer of 2009 (January–March) in an area to the northeast of Belo Horizonte that is endemic for CVL. The study area was selected based on similar environmental and socio-economical characteristics.

The annual prevalence of the canine disease is about 10%, according to the local Health Department. In order to identify domestic dogs that were seropositive for anti-*Leishmania* antibodies, blood samples were collected from a total of 5556 animals, corresponding to almost every resident dog in the area in the period of our study. A first screening for the presence of anti-*Leishmania* antibodies canine sera was performed by ELISA. Samples with absorbance values equal or higher than 3 times the standard deviation of the cutoff value were considered positive. These samples were then submitted to indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) and those with fluorescence at 1:40 dilution were confirmed to be positive. Both assays were performed according to established protocols (Bio-

Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and the recommendations of the Ministério da Saúde do Brasil (2006). Only the dogs that tested positive in both assays were considered as such. Based on this survey, 200 seropositive and 200 seronegative animals were randomly selected according to a case-control sample size calculation in which the expected prevalence of infestation by ticks and fleas was taken to be 35%, with a power of 0.9 (error type II = 0.1) to detect as significant (error type I = 0.05) an odds ratio (OR) ≥ 2 between arthropod infestation and positivity for *Leishmania*. For seronegative animals, confirmation of seronegativity was obtained 30 days after the first tests had been applied.

All 400 animals were examined for the presence of ticks and fleas and the results were expressed qualitatively as infested or non-infested, irrespective of the intensity of infestation. Inspection was performed in the sequence: muzzle and cheek, ears, neck, back, flanks, under the chest and within the paws, especially in the spaces between the toes. During the inspection procedure, 50 samples of fleas and ticks were randomly collected and transferred to tubes containing 70% ethanol for subsequent identification.

Associations between infestation by ticks and fleas and the presence of anti-*Leishmania* antibodies were evaluated using the χ^2 test, and the ORs and respective 95% confidence intervals (CI_{95%}) were calculated.

3. Results

A total of 432 (7.8%) of tested animals living in the study area were seropositive for anti-*Leishmania* antibodies as indicated by ELISA and IFAT tests. It was, therefore, possible to randomly select sufficient seropositive and seronegative animals ($n = 200$ each) for the case-control study. The ticks and fleas collected during examination of the study animals were unambiguously identified as *R. sanguineus* and *C. felis felis*. As revealed in Table 1, the prevalence of infestation by *R. sanguineus* or *C. felis felis* was significantly greater ($\rho = 0.04$ and $p < 0.01$, respectively) among seropositive dogs compared with their seronegative counterparts. Moreover, the probability of seropositivity for *Leishmania* was 53% higher in tick-infested dogs and 300% higher in flea-infested dogs in comparison with non-infested animals.

4. Discussion

R. sanguineus is the main species of tick that plagues dogs living in the large urban areas of Brazil. In Belo Horizonte, 222 (7.8%) of 2848 dogs that had attended a pet

clinic, were exclusively infested with this tick species all year around (Silveira et al., 2009). Additionally, a study conducted in a veterinary hospital in Belo Horizonte revealed that 100% of engorged female ticks collected from dogs originating from different zones within the city were *R. sanguineus* (Paz et al., 2008).

With respect to flea infestation, it is well-documented that *C. felis felis* is the predominant species in dogs from urban areas in every month of the year (Linardi and Nagem, 1973; Linardi and Guimarães, 2000; Gracia et al., 2008; Rodrigues et al., 2008).

The specificity of ELISA and IFAT assays for CVL is between 86–100% and 100%, respectively. The sensitivity varies into the range 71–98% for ELISA and 72–100% for IFAT when the parasitological method is taken as reference. The variation may be due to the clinical state of the animal (Romero and Boelaert, 2010).

The present study shows a statistical association between flea or tick infestation and risk of visceral leishmaniasis in dogs. Whilst such an association may be deduced from the evidence supporting the vectorial capacity of these arthropods in the transmission of *Leishmania* (Coutinho et al., 2005; Coutinho and Linardi, 2007; Ferreira et al., 2009) some authors called attention to the need of more detailed studies to confirm or to reject this hypothesis (Otranto and Dantas-Torres, 2010; Paz et al., 2010). According to Killick-Kendrick (1990), a series of concomitant features are needed to incriminate any given species as a *Leishmania* vector, such as feeding in both host and reservoir, supporting the parasite development after digestion and expelling of the infected blood meal, showing parasites undistinguishable from those isolated from sick patients and being able of parasite transmission by biting.

Acknowledgment

The study received financial support from the Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES V) organized by FIOCRUZ (Proc. 403608/2008-2).

References

- Borges, B.K.A., Silva, J.A., Haddad, J.P.A., Moreira, E.C., Magalhães, D.F., Ribeiro, L.M.L., Fiúza, V.O.P., 2008. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Brasil. Cad. Saúde Pública* 24, 777–784.
- Coutinho, M.T., Linardi, P.M., 2007. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet. Parasitol.* 147, 320–325.
- Coutinho, M.T.Z., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., De Maria, M., Genaro, O., Linardi, P.M., 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 128, 49–155.
- Ferreira, M.G.P.A., Fattori, K.R., Souza, F., Lima, V.M.F., 2009. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet. Parasitol.* 165, 150–154.
- Gehrke, F.S., Gazeta, G.S., Souza, E.R., Ribeiro, A., Marrelli, M.T., Schumaker, T.T., 2009. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro/Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 267–268.
- Gracia, M.J., Calvete, C., Estrada, R., Castillo, J.A., Peribáñez, M.A., Lucientes, J., 2008. Fleas parasitizing domestic dogs in Spain. *Vet. Parasitol.* 151, 312–319.
- Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4, 1–24.
- Labruna, M.B., Pereira, M.C., 2001. Carrapato em cães no Brasil. *Clin. Vet.* 30, 24–32.
- Linardi, P.M., Guimarães, L.R., 2000. Siphonápteros do Brasil. *Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.*
- Linardi, P.M., Nagem, R.L., 1973. Pulicídios e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. *Rev. Bras. Biol.* 33, 529–538.
- Margonari, C., Freitas, C.R., Ribeiro, R.C., Moura, A.C., Timbó, M., Gripp, A.H., Pessanha, J.E., Dias, E.S., 2006. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 31–38.
- Ministério da Saúde do Brasil, 2006. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, Available at http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/popup/manual.vigilancia_controle.leishmaniose_visceral.html.
- Montoya-Lerma, J., Cadena, H., Oviedo, M., Ready, P.D., Barazarte, R., Travi, B.L., Lane, R.P., 2003. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *L. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop.* 85, 19–29.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., 2010. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: caution is needed. *Vet. Parasitol.* 168, 173–174.
- Otranto, D., Wall, R., 2008. New strategies for the control of arthropod vectors of disease in dogs and cats. *Med. Vet. Entomol.* 22, 291–302.
- Paz, G.F., Leite, R.C., Oliveira, P.R., 2008. Control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) in the kennel of the UFMG Veterinary School, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 41–44.
- Paz, G.F., Ribeiro, M.F., Michalsky, E.M., da Rocha-Lima, A.C., França-Silva, J.C., Barata, R.A., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2010. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 106, 523–528.
- Rodrigues, D.F., Daemon, E., Rodrigues, A.F., 2008. Caracterização da população de ectoparasitos em cães de núcleos de expansão urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 185–188.
- Romero, G.A., Boelaert, M., 2010. Control of visceral leishmaniasis in latin America—a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e584.
- Silveira, J.A., Passos, L.M., Ribeiro, M.F., 2009. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 161, 270–275.
- Souza, C.M., Pessanha, J.E., Barata, R.A., Monteiro, E.M., Costa, D.C., Dias, E.S., 2004. Study on phlebotomine sand fly (Diptera:Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 795–803, ISSN 0074-0276.

5 Discussão

Um estudo que possa comprovar ou rejeitar a possibilidade da participação de um vetor na epidemiologia de uma doença, deve possuir metodologias que nos permitam avaliar possíveis interações interespecíficas.

A importância de *R. sanguineus* como vetor de agentes patogênicos para cães é indiscutível e bem fundamentada na literatura com destaque para a transmissão de *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* (Gothe et al., 1989; Smith et al., 1976).

A capacidade de um agente etiológico de se manter, multiplicar e em alguns casos ser transmitido de forma transtadial e transovariana em uma espécie de ixodídeo, é um fator crucial para que se possa pensar na hipótese da possível capacidade vetorial deste carrapato. Nossos resultados demonstraram a presença de kDNA de *Leishmania* em diferentes estágios de *R. sanguineus*, incluindo os estádios de pós- ecdises, sugerindo a manutenção e transmissão transtadial de *Leishmania* nessa espécie de carrapato.

Dantas-Torres et al. (2010a) detectaram kDNA de *Leishmania infantum* em dois “pools” de glândula salivar (um de cinco fêmeas e outro de cinco machos) provenientes de *R. sanguineus* coletados de cães soropositivos para *Leishmania* sp. no sul da Itália. Entretanto, este fato não representa necessariamente que este órgão possa estar realmente infectado por formas de *Leishmania*. Deve - se levar em consideração uma possível contaminação pelo próprio sangue do intestino no momento da dissecação das glândulas. Os mesmos autores, ao infectarem experimentalmente teleóginas com formas promastigotas de *Leishmania infantum* também encontraram kDNA desse parasito nos ovos e larvas provenientes das mesmas (Dantas – Torres et al., 2010b). Da mesma forma não pode – se afirmar que esse agente é transmitido verticalmente nessa espécie de carrapato

A técnica da PCR tem sido muito utilizada em pesquisa e diagnóstico na parasitologia veterinária, porém muitas das vezes os seus resultados são interpretados equivocadamente. Devido à sua alta sensibilidade, pode – se detectar aproximadamente 1 ng de DNA alvo na amostra examinada ou até menos. Assim essa pequena quantidade pode representar poucos parasitas, um único parasita e ou até mesmo fragmentos deste agente (Prichard, 1997).

Todas as amostras de estádios de *R. sanguineus* analisadas pela PCR nesse nosso trabalho, passaram por um período de 4 a 15 dias em condições controladas de laboratório, com o objetivo de avaliar a sobrevivência de *Leishmania* durante e após o processo de digestão destes estágios. A fase inicial do processo de digestão nos ixodídeos é difícil de estudar devido ao processo lento e longo de alimentação durante o período em que o carrapato fica em contato com o hospedeiro.

O processo de digestão nos carrapatos é intracelular e lento. A atividade mais lenta da digestão nos ixodídeos indica que os patógenos não são imediatamente expostos às ações proteolíticas dessas enzimas dentro dos intestinos desses ectoparasitos (Obenchain & Galun, 1982). Conseqüentemente a viabilidade de *Leishmania* sp., ao longo do tubo digestivo de *R. sanguineus*, pode ser prolongada, indicando ser mais um fator favorável ao processo de manutenção do parasito.

As atividades das proteases digestivas dependem de vários parâmetros como estágio evolutivo do carrapato, tempo de alimentação e sexo do carrapato (Obenchain & Galun, 1982). Muitos parasitas que entram no intestino dos carrapatos juntamente com o sangue alimentado podem ser destruídos, mas não há evidência que isto possa ser ação direta do processo de digestão sanguínea (Balashov, 1968).

Assim, os nossos achados pela PCR, assim como os achados de outros autores, podem ser apenas fragmentos de *Leishmania* não caracterizando uma infecção ou interação deste agente com *R. sanguineus*. Todavia não podemos descartar a provável infecção destes estágios pelo parasito. Segundo Coutinho et al. (2005) 15,4% dos estágios de *R. sanguineus* analisados pela PCR estavam infectados por *Leishmania* e a viabilidade deste agente foi comprovada pela inoculação de macerados de estágios infectados no roedor *Citellus citellus*. Um ponto a se discutir é que pela metodologia realizada pelos autores, os estádios de *R. sanguineus* oriundos de infestação natural de cães infectados com *Leishmania* foram macerados e inoculados após a coleta dos mesmos. Assim, os fatores relacionados à fisiologia do carrapato, como o processo de digestão, não tiveram provavelmente influência na sobrevivência da *Leishmania* nos estádios de *R. sanguineus*. Provavelmente as formas que foram infectantes para os roedores eram formas amastigotas presentes ainda

em células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro vertebrado. O poder infectante das formas amastigotas intracelulares entre hospedeiros é pouco discutido na literatura, merecendo mais estudos concisos.

Os exames parasitológicos de lâminas e isolamento foram negativos, apesar da identificação de uma estrutura flagelada em um estágio de larva alimentada em um dos cães infectados com *Leishmania*. O achado de estruturas flageladas em ixodídeos, sugestivas de serem da família Tripanosomatidae, também foi relatado por Sherlock (1964), apesar do autor também não ter identificado o gênero e a espécie do possível flagelado. Relatos de vários autores, citados por Balashov (1968), descrevem flagelados da espécie *Crithidia hyalommae* em hemolinfas e ovos de carrapatos de espécies de *Hyalomma* e de *Boophilus calcaratus*. A ocorrência de *Trypanosoma theileri* foi descrita por vários autores, encontrando principalmente as formas epimastigotas em hemolinfas de várias teleóginas de carrapatos ixodídeos (Ribeiro et al., 1988). Pelo número expressivo de amostras de estádios de *R. sanguineus* analisadas (433) pelo método Panótico-Laborclin, mesmo levando em consideração a baixa sensibilidade dos testes parasitológicos, pode – se sugerir também que a manutenção e multiplicação de *Leishmania* em estádios de *R. sanguineus* seja pouco provável. Porém essa hipótese não pode ser ainda totalmente rejeitada. Cabe ressaltar que os estágios de larvas utilizados na infestação artificial foram criados em condições laboratoriais. Assim, a estrutura flagelada sugestiva de um tripanosomatídeo encontrada nesse estágio ingurgitado, provavelmente estava presente no cão infectado.

Apesar de termos utilizados somente dois cães infectados com *Leishmania*, ambos os cães eram infectivos para *L. longipalpis*, incriminado como vetor biológico de LVC no novo mundo. Mesmo assim este estudo deve ser repetido em estádios de *R. sanguineus* provenientes de uma infestação natural de cães com LVC, de maneira a eliminar possíveis variáveis específicas de cada indivíduo que possa interferir na interação entre o agente, hospedeiro e vetor.

A espécie de carrapato de importância epidemiológica que parasita cães de área urbana de grandes cidades do Brasil é predominantemente *R. sanguineus*, estando de acordo com os nossos resultados de campo. Szabó et

al. (2001) verificaram que em 102 cães de área urbana de São Paulo, 27,5% estavam infestados exclusivamente com *R. sanguineus*. Silveira et al. (2009) observaram que de 2848 cães atendidos num petshop de Belo Horizonte, 222 (7,8%) apresentavam infestação exclusiva por *R. sanguineus* em todos os meses do ano. Os mesmos autores sugerem que essa espécie de carrapato desenvolve três gerações por ano nas condições climáticas de Belo Horizonte, completando o ciclo de vida em aproximadamente 121 dias. Paz et al. (2008) realizaram coleta de 100 teleóginas no canil de um Hospital Veterinário em Belo Horizonte, com cães provenientes de diversos bairros da cidade, e todas foram identificadas como *R. sanguineus*.

Quanto às pulgas é incontestável que a *C. felis felis* está muito mais disseminada do que sua congênera, *C. canis* (Linardi and Guimarães 2000; Rodrigues et al. 2008; Gracia et al. 2008). No estado de Minas Gerais, Linardi & Nagem (1973) verificaram que de 4.499 pulgas capturadas de 282 cães provenientes de 11 municípios a *C. canis* foi identificada em somente 0,76% das pulgas e estavam em 3,19% dos cães.

Coutinho & Linardi (2007) coletaram 207 exemplares de pulgas (todos identificados como da espécie *C. felis felis*) provenientes de 59 cães soropositivos para *Leishmania* sp. Após dissecação de todo o material, em 4 pulgas (1,9%) foram identificadas formas promastigotas de tripanosomatídeos. Em 144 exemplares foi realizado a PCR, sendo 43 amostras (29,9%) positivas. Em outra amostra de 409 pulgas, coletadas de 9 cães soropositivos, realizou – se um macerado desses exemplares sendo, posteriormente, inoculado pelas vias oral e peritoneal em 36 hamsters. Destes animais, 6 morreram antes do término do experimento (6 meses pós inócuo), 16 animais (53,3%) tiveram sorologia e PCR positivos para *Leishmania* sp., porém em nenhum foi encontrado formas amastigotas.

Em outro estudo mais recente realizado em Araçatuba – São Paulo, 22 exemplares de *C. felis felis* coletados de 22 cães soropositivos (sendo um exemplar por cão) foram submetidos ao exame de PCR e inoculados no peritônio de 22 hamsters. Os resultados demonstraram que 59% das pulgas deram PCR positivo e 18% dos animais foram positivos pelo ELISA e PCR (Ferreira et al., 2009).

Outro dado importante é que as pulgas apresentam alta taxa de infecção natural por outros tripanosomatídeos como *Leptomonas*, *Herptomonas* e *Crithidia* (Linardi e Guimarães, 2000; Coutinho & Linardi, 2007). Assim, a infecção por *Leishmania* nessa espécie parece ser provável mantendo a hipótese de sua capacidade vetorial na transmissão da LVC.

Em nosso trabalho, a prevalência de infestação por pulga e carrapato nos cães soropositivos foi significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparada com os cães soronegativos. Este dado demonstra a ocorrência de uma associação direta entre as infestações por pulga ou carrapato com a presença de anticorpos anti – *Leishmania*.

A especificidade dos testes de ELISA e RIFI, utilizados para a detecção de anticorpos anti – *Leishmania* está entre 86% - 100% e 100% respectivamente e a sensibilidades variando de 71 - 98% para ELISA e 72 - 100% para a RIFI, utilizando o método parasitológico como referência. Essa variação é decorrente, principalmente, do quadro clínico do animal (Romero & Boelaert, 2010). Especificidade de 100% na RIFI também foi encontrada quando os testes de ELISA – leishmaniose - visceral – canina – Bio-Manguinhos e RIFI – leishmaniose – vísceral- canina - Bio-Manguinhos foram utilizados de maneira consecutiva, ou seja, sendo considerado soropositivo o cão com amostra positiva nos dois testes (Lira et al. 2006), sendo essa a metodologia aplicada nesse trabalho e, também, utilizada em programas de controle da doença no Brasil.

As análises pela OR mostraram que as infestações por carrapato ou principalmente por pulga, representam um importante fator de risco para a LVC. Assim, os cães com a presença desses ectoparasitos teriam uma maior probabilidade de serem eutanasiados, tendo em vista que uma das medidas para o controle da LV no Brasil consiste na eutanásia dos cães soropositivos para *Leishmania* detectados pelos testes de ELISA e RIFI (Bio - Manguinhos) (Ministério da Saúde, 2006).

Essa associação pode estar relacionada com a possível capacidade vetorial de ambas as espécies em transmitir *Leishmania* para a população canina (Coutinho et al., 2005; Coutinho & Linardi, 2007; Ferreira et al., 2009). Entretanto, mais estudos são necessários para rejeitar ou não essa hipótese.

O mapa de *kernel* dos cães soropositivos demonstra uma boa distribuição espacial da doença com alguns focos de alta densidade na área de estudo. A distribuição espacial de *R. sanguineus* e *C. felis felis* sugere estar associada com os cães soropositivos, porém outros estudos são necessários para comprovar essa hipótese. Essa ferramenta pode ser muito útil em programas de controle da LV, por permitir uma delimitação dos focos de transmissão e um maior direcionamento das medidas de controle da doença.

6 Conclusões

Foi detectada a presença de kDNA de *Leishmania* sp. nos estágios de ninfa e adultos de *R. sanguineus* alimentados nos cães com leishmaniose visceral

kDNA de *Leishmania* sp. se mantém e é transmitido transestadialmente para os estágios de ninfas e adultos pós - ecdise de *R. sanguineus*.

Foi encontrada uma estrutura flagelada sugestiva de um Tripanosomatídeo infectando o estágio de larva de *R. sanguineus* alimentado em cão com leishmaniose visceral.

As prevalências de infestação natural de *R. sanguineus* e *C. felis felis* em cães soropositivos para *Leishmania* sp. mostraram – se relevantes e com taxas bastante semelhantes para as duas espécies.

A infestação por *R. sanguineus* é um fator de risco para a leishmaniose visceral canina, com uma probabilidade de 53% a mais dos cães infestados adquirirem a infecção.

A infestação por *C. felis felis* é um fator de risco para a leishmaniose visceral canina, com uma probabilidade de 313% a mais dos cães infestados adquirirem a infecção.

7 Anexo



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado “*Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806): estudo de aspectos biológicos, parasitológicos e moleculares relevantes para a avaliação da capacidade vetorial na transmissão da Leishmaniose Visceral Canina” sob a responsabilidade de **Edelberto Santos Dias**, foi licenciado pelo nº **L-0044/08** e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em 02/06/2008. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 02 de junho de 2012.

Rio de Janeiro, 02 de junho de 2008.

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ

8 Referências Bibliográficas

Aragão HB, Fonseca F. Notas de Ixodologia III. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. Mem Inst Oswaldo Cruz 1961; 59: 115 – 29.

Balashov YS. Bloodsucking ticks (Ixodoidea). Vectors of Disease of man and animals. Miscell. Public Entomol Soc Am 1968; 8: 376.

Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. Vet J 2008;175:14-5.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 2007; 37:1097-106.

Blanc G, Caminopetros J. La transmission du Kala – Azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. C R Acad Sci 1930; 191:1162 – 4.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 2006. Disponível em: http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/popup/manual_vigilancia_controlo_leishmaniose_visceral.html

Chagas E, Cunha AM, Castro GO, Ferreira LC, Romana C. Leishmaniose Visceral Americana (Nova entidade mórbida do homem na América do Sul). Relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo em Leishmaniose Visceral Americana em 1936. Mem Inst Oswaldo Cruz 1937; 32: 321 – 90.

Chagas E, Cunha AM, Ferreira LC, Deane L, Deane G, Guimarães FN. Leishmaniose Visceral Americana (Relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo em Leishmaniose Visceral Americana em 1937). Mem Inst Oswaldo Cruz 1938; 33: 89 – 229.

Chang KP, Bray RS, editors. Leishmaniasis. The Netherlands: Amsterdam;1985.

Courtenay O, Santana E W, Johnson P J, Vasconcelos AW. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identify. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90: 498-502.

Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? Vet Parasitol 2007; 147: 320 - 5.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol 2005;128:149 – 55.

Cunha AM, Chagas E. New espécies of protozoa of the genus *Leishmania* patogenic to mam *Leishmania chagasi* n. sp previous note. O Hospital 1937; 11: 3-9.

Dantas-Torres F, De Brito ME, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. Vet Parasitol 2006; 31: 54 – 60.

Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, De Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. Parasitol Res 2010a; 106: 857-60.

Dantas-Torres F, Martins TF, De Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Lima BS, Brandão-Filho SP. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. Exp Parasitol 2010b; 125:184-5.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89: 463 – 9.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. O Hospital 1955; 48: 61-76.

Deane LM, Deane MP. Leishmaniose Visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. O Hospital (Rio de Janeiro) 1955; 47:113-29.

Deane, LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço Social de Educação Sanitária; 1956.

Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. Rev Inst Med Tropical São Paulo: 4, 198-212, 1962.

Forattini OP. Novos encontros de flebotomíneos no Estado de São Paulo, Brasil, com especial referência à *Lutzomyia longipalpis*. Rev Saúde Publ 1976; 10:125-8.

Freitas MG, Costa HMA, Costa JO. Entomologia e Acarologia Médica Veterinária. 6nd ed. Belo Horizonte: Precisa; 1984.

Ferreira MGPA, Fattori KR, Souza F, Lima VMF. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. Vet Parasitol 2009;165: 150-154.

França-Silva JC, Barata RA, Costa RT, Monteiro EM, Machado-Coelho GL, Vieira EP et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. Vet Parasitol 2005;10: 213-220.

Genaro O. Leishmaniose visceral canina experimental [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas;1993.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol 2004; 7:338-49.

Gothe R, Wegerot S, Walden R, Walden A. Epidemiology of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs in Germany. Kleintierpraxis 1989; 34: 309 – 320.

Gracia MJ, Calvete C, Estrada R, Castillo JA, Peribáñez MA, Lucientes J. Fleas parasitizing domestic dogs in Spain. Vet Parasitol 2008; 151: 312-319.

Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South América. Exp Appl Acarol 2006; 40: 83-100.

Jerônimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, Luz KG, et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88: 386 – 388.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol 1990; 4:1-24.

Labruna MB, Pereira MC. Carrapato em Cães no Brasil. Clin Vet 2001; 30: 24 - 32.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100: 811 – 27.

Lainson R, Ward RD, Shaw JJ. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature* 1977; 266: 628 – 30.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W, Killick-Kendrick, R. *The Leishmaniases in Biology and Epidemiology*. Academic Press: London, 1-120, 1987.

Linardi PM, Guimarães LR. *Siphonápteros do Brasil*. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

Linardi PM, Nagem, R. L. Pulicídeos e outros ectoparasitos de cães de Belo Horizonte e municípios vizinhos. *Rev Bras Biologia* 1973; 33: 529 - 38.

Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AG, Silva ED, Abath FG, Alves, LC, Souza WW, Gomes YM,. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet Parasitol* 2006; 137:11-16.

Lutz A, Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1912;4: 84 – 95.

Malaquias LC, Do Carmo - Romualdo R, Do Anjos Jr JB, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniosis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. *Parasitol. Res.* 2007;100: 233 - 39.

Mancianti F, Gramiccia M, Grandoni L, Pieri S. Studies on canine Leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 566 – 67.

Martins AV, Falcão AL, Da-Silva JE, Dias ES. Nota sobre *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *cruzi* (Mangabeira, 1938), com a descrição da fêmea (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79: 439-442.

Maurício IL, Howard MK, Stothard JR, Miles, MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitol 1999; 119: 237-46.

Mayrink, W. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da leishmaniose visceral. (Tese), Belo Horizonte, 112 p, 1967.

Mestre GL, Fontes CJ. The spread of the visceral leishmaniasis epidemic in the State of Mato Grosso, 1998-2005. Rev Soc Bras Med Trop 2007;40: 42 - 8.

Michalsky EM, Rocha MF, Da Rocha-Lima AC, França - Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. Vet Parasitol 2007;147: 67-76.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, França-Silva JC, Rocha MF, Barata RA, Dias ES. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104: 1191- 3.

Migone L E. Um caso de Kalazar em Assunción (Paraguay). Bulletin de La Société de Pathologie Exotique: Paris, p.118-120, 1913.

Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, et al. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. Longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. Acta Trop 2003; 85:19 – 29.

Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri, SH, Andrade AM, Dias FE, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol 2008; 6:19 – 23.

Obenchain FD, Galun R. Physiology of Ticks. Pergamon Press, 509 p. 1982.

Organização Mundial de Saúde. Epidemiology and control of Leishmaniasis. Technical Report Series. Geneva: WHO; 2003.

Paz GF, Leite RC, Oliveira PR. Control of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) in the kennel of the UFMG Veterinary School, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2008; 17: 41-44.

Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL .A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. Parasitol 1997; 115:359-369.

Penna, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. Bras Méd 1934; 48: 949 – 50.

Pinter A, Labruna MB, Faccini JLH. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on male feeding period in the laboratory. Vet Parasitol 2002; 105: 79 – 88.

Prichard, R. Application of molecular biology in veterinary parasitology. Vet Parasitol 1997; 31:155-175.

Ribeiro MFB, Lima JD, Guimarães AM. Ocurrence of *Trypanosoma theileri*, Laveran 1902, in *Boophilus microplus* in the State of Minas Gerais, Brazil. Arq Esc Vet UFMG. 35: 65 – 68.

Rodrigues DF, Daemon E, Rodrigues AF. Caracterização da população de ectoparasitos em cães de núcleos de expansão urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet 2008; 17:185-188.

Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4: e584.

Sacks DL, Lawyer P, Kamhawi S. The Biology of *Leishmania*- sand fly interactions. In: Bibliográficas 202 Myler P, Fasel N, editores. *Leishmania: After the Genome*. UK: Caister Academic Press Norfolk; 2008. p. 205-38.

Santos SO, Arias J, Ribeiro A A , Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1998; 12 : 315-317.

Saraiva L, Carvalho GML, Gontijo CMF, Quaresma PF, Lima ACVMR, Falcão AL, et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol* 2009; 46, 1159-1163,.

Savani ESM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniases focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol* 2009;160: 18 – 24.

Sherlock I. A. Nota sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1964; 16: 19 - 26.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79: 5 - 11.

Silveira JA, Passos LM, Ribeiro MF. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2009; 161: 270 – 275.

Smith RD, Sells DM, Stephenson EH, Ristic M, Huxoll DL. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. *Am J Vet Res* 1976; 37:119 – 26.

Soares AO, SOUZA AD, Feliciano EA, Rodrigues AF, D'agosto M, Daemon E. Evaluation of ectoparasites and hemoparasites in dogs kept in apartments and houses with yards in the city of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2006;15: 3 – 6.

Soulsby E.J.L. Biology of Parasites. Emphasis on Veterinary Parasitology. Academic Press. New York and London, p. 72-77, 1966.

Szabó MP, Cunha TM, Pinter A, Vicentini F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. Exp Appl Acarol 2001; 25: 909-16.

Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998; 92: 275-78.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). American Entomological Institute. Florida (Eds.), 1994.

Zhu Z, Gern L, Aeschlimann A. The peritrophic membrane of *Ixodes ricinus*. Parasitol Res 1991; 77: 635 – 641.