

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE FORMAS
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* spp. EM INTESTINOS, OVÁRIOS E
GLÂNDULAS SALIVARES DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus*
EM CÃES DE ÁREAS ENDÊMICAS

Milena Araújo Viol
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE FORMAS
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* spp. EM INTESTINOS, OVÁRIOS E
GLÂNDULAS SALIVARES DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus*
EM CÃES DE ÁREAS ENDÊMICAS**

**Milena Araújo Viol
Orientadora: Profa. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Araçatuba – SP
2015

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Viol, Milena Araújo

V81c

Considerações sobre a presença de formas promastigotas de *leishmania* spp. em intestinos, ovários e glândulas salivares de carrapatos *rhhipicephalus sanguineus* em cães de áreas endêmicas / Milena Araújo Viol.

Araçatuba: [s.n], 2015
119f. il.; CD-ROM

Tese(Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2015

Orientadora: Profa. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani

1. Carrapato. 2. Idoxidae. 3. Leishmaniose. 4. Imuno-histoquímica.
5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. I. T.

CDD 636.08965



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Considerações sobre a presença de formas promastigotas de Leishmania spp. em intestinos, ovários e glândulas salivares de carrapatos Rhipicephalus sanguineus em cães de áreas endêmicas.

AUTORA: MILENA ARAÚZ VIOL

ORIENTADORA: Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dr. JANCARLO FERREIRA GOMES

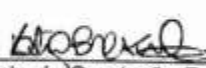

Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM


Dra. MÔNICA REGINA VENDRAME AMARANTE


Dra. GISELE FABRINO MACHADO


Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

DATA DA REALIZAÇÃO: 9 de junho de 2015.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
- Orientadora -

MILENA ARAÚZ VIOL – São Paulo – SP, 06 de dezembro de 1982. Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no ano de 2006. Realizou residência médico-veterinária na área de patologia clínica no Hospital Veterinário Luis Quintiliano de Oliveira, na Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, com início em 2007 e término em 2009. Bolsista FAPESP desde março de 2009. Concluiu o mestrado junto ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba – SP, em 2011, sob orientação da Professora Adjunto Katia Denise Saraiva Bresciani.

“O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum...
é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos,
namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos.

Se não a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.”

Francisco Cândido Xavier

Aos meus pais, Angela e Jeziel, e à minha querida tia Edna, que muito me incentivaram na busca deste título.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e Jesus, nosso mestre irmão, pela oportunidade de crescimento intelectual que me foi permitido nesta existência. Agradeço também a todos os amigos espirituais que me auxiliaram durante todo o processo de doutoramento, me protegendo e intuindo em todos os momentos de necessidade, e em especial à inesquecível Dona Júlia que com toda a certeza me auxiliou e continua auxiliando em todas as fases da minha vida.

Aos meus pais queridos que tanto me orientaram e incentivaram a seguir a carreira acadêmica, sempre dispostos a ouvir e aconselhar em todos os momentos difíceis.

À minha tia amada, muito presente, demonstrando preocupação e estando sempre disposta a me amparar quando precisei.

À minha avó pelas orações e torcida para que tudo finalizasse da melhor maneira possível.

Ao meu namorado por toda a paciência, incentivo e ajuda, representando pessoa fundamental para a realização do projeto.

À minha orientadora sempre muito dedicada, que me ensinou que a humildade, gentileza e respeito ao próximo são peças essenciais para o sucesso profissional.

Aos meus amigos que me acompanharam durante este trajeto, apoiando, ouvindo, chorando e rindo comigo.

À todos os meus colaboradores, seja pela ajuda intelectual, como também pelo auxílio na colheita e processamento dos materiais.

À Isabel pelas correções bibliográficas.

À Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, campus de Araçatuba, pelo acolhimento e suporte.

À Fapesp, pela confiança e financiamento (processos: 2011/51113-4 e 2012/00266-8).

A todos os cães envolvidos no estudo, por servirem para o aprimoramento e evolução da ciência.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	10
OBJETIVO	17
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO.....	37
1. Introdução	39
2. Material e Métodos	40
3. Resultados	43
4. Discussão	45
5. Conclusão	48
REFERÊNCIAS	49

**CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE FORMAS
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* SPP. EM INTESTINOS, OVÁRIOS E
GLÂNDULAS SALIVARES DE CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus*
EM CÃES**

RESUMO - Nós investigamos a presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. pelo método de imuno-histoquímica em intestinos, ovários e glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* em cães. Neste estudo, foram utilizados, 66 cães positivos e 33 negativos para *Leishmania* spp. pelo teste Imunoenzimático (ELISA), por exame citológico direto e por meio do método da Reação em cadeia da polimerase (PCR). Um total de 990 carrapatos foram colhidos desses 99 cães, sendo 10 por animal e estes foram dissecados, com posterior separação dos intestinos, ovários e glândulas salivares. Lâminas contendo os órgãos supramencionados foram confeccionadas para a execução da imuno-histoquímica (IHQ). Também foi efetuada a PCR em tempo real desses órgãos, bem como a quantificação da sua carga parasitária. Pela PCR em tempo real dos intestinos, ovários e glândulas salivares dos carrapatos, foram detectadas positivities de 93,94%, 46,97% e 27,27%, respectivamente. As cargas parasitárias médias no intestino foram de 9027,90 *Leishmania*/μL, nos ovários 411,66 *Leishmania*/μL e nas glândulas salivares 305,56 *Leishmania*/μL. Com relação as leituras das lâminas de IHQ, em 98,48% dos intestinos, 13,64% dos ovários e 7,58% das glândulas salivares houve imunomarcção positiva para *Leishmania* spp. Em virtude destes resultados evidenciados pela técnica de IHQ, com utilização do anticorpo primário lipofosfoglicano (LPG), nós consideramos a possibilidade da presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. em órgãos de *R. sanguineus*.

Palavras-chave: ixodídeos, leishmaniose, canino, imuno-histoquímica, PCR em tempo real

**CONSIDERATIONS ABOUT THE PRESENCE OF PROMASTIGOTES OF
Leishmania SPP. IN THE INTESTINES, OVARIES AND SALIVARY
GLANDS OF *Rhipicephalus sanguineus* IN DOGS**

SUMMARY - We investigated the presence of promastigotes of *Leishmania* spp. by immunohistochemical method in intestines, ovaries and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks in dogs. In this study, was used, 66 dogs positive and 33 negative for *Leishmania* spp. by immunoenzymatic test (ELISA), direct cytological examination and by polymerase chain reaction (PCR). A total of 990 ticks were collected from these 99 dogs, 10 per animal and these were dissected, with further separation of the intestines, ovaries and salivary glands. Slides of these organs were made for the implementation of immunohistochemistry (IHC). Also the real-time PCR was performed in these organs as well as the quantification of that parasite load. For real-time PCR of the guts, ovaries and salivary glands of ticks were detected positivities 93.94%, 46.97% and 27.27%, respectively. The average parasitic loads in the intestine were 9027.90 *Leishmania*/μL, the ovaries 411.66 *Leishmania*/μL and salivary glands 305.56 *Leishmania*/μL. Regarding the readings of IHC slides in 98.48% of the intestines, 13.64% of the ovaries and 7.58% of the salivary glands were positive for *Leishmania* spp. In view of these results shown by IHC technique, using the lipofosfoglicano primary antibody (LPG), we consider the possibility of the presence of promastigotes of *Leishmania* spp. in *R. sanguineus* organs.

Keywords: ticks, leishmaniasis, canine, immunohistochemistry, real-time PCR

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a leishmaniose como a segunda protozoose mais importante da atualidade. Na América Latina, essa enfermidade já foi descrita em vários países, sendo que 90% dos casos da forma visceral concentram-se no Brasil, especialmente na região nordeste, representando um sério problema em Saúde Pública (BRASIL, 2006).

Entre os anos de 2001 a 2010, 33.473 casos leishmaniose humana foram relatados no Brasil, sendo que 2.267 pacientes foram a óbito, segundo o Ministério da Saúde (BRAGA et al., 2013; BRASIL, 2011). Esta doença está presente em quatro continentes e é considerada endêmica em 98 países, colocando em risco mais de 350 milhões de indivíduos. Sua forma visceral ocasiona epidemias em larga escala e apresenta elevada taxa de letalidade (WHO, 2014). Cerca de 97% dos casos humanos da doença no continente americano ocorrem no Brasil, e mais de 70.000 notificações e 3.800 mortes foram notificadas nas últimas três décadas (LARA-SILVA, 2015; PAHO, 2013).

O Município de Araçatuba, São Paulo (SP), localiza-se numa região endêmica para a leishmaniose visceral canina (LVC). Dados obtidos na Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) do município, indicaram que 3227 animais estavam infectados no período de 2006 a 2010. Em humanos, de acordo com dados da Secretaria de Saúde do Estado, foram registrados um total de 1512 casos humanos e 138 óbitos de 1999 a 2009, sendo que em 2008, 291 pessoas foram diagnosticadas com a doença, e destas 23 faleceram (BEPA, 2010).

De 896 espécies de carrapatos (Ixodida) reconhecidas, em torno de 10% das mesmas são implicadas na transmissão de patógenos (GUGLIELMONE et al., 2010; JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Por serem hematófagos, estes ácaros estão predispostos a ingerir muitos tipos de microorganismos em seu repasto sanguíneo, mas isto não significa que sejam capazes de transmiti-los para outros hospedeiros.

Com ciclo de vida de três hospedeiros, o *Rhipicephalus sanguineus*, apresenta estreita relação com esta espécie animal (DANTAS-TORRES,

2008; MILLER et al., 2001), com distribuição mundial (DANTAS-TORRES, 2008), sabidamente veicula agentes etiológicos de enfermidades (DANTAS-TORRES, 2010; DANTAS-TORRES et al., 2011).

Além do inseto *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal de *Leishmania infantum* (FERREIRA et al., 2009), já foi observada presença do protozoário em macerados de pulgas (COLOMBO et al., 2011; COUTINHO; LINARDI, 2007; FERREIRA et al., 2009) e carrapatos (COLOMBO et al., 2011; COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2010a; MORAIS et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2012; TROTTA et al., 2012). Nestes estudos, foi realizada a PCR para *Leishmania* nestes ectoparasitos, no entanto não foi determinado o papel epidemiológico dos mesmos na transmissão da doença, uma vez que todos haviam ingerido sangue de cães infectados.

O primeiro caso humano de leishmaniose foi verificado na Índia por Willian Leishman, um soldado que apresentava quadro diarreico, febre e esplenomegalia, com evolução para óbito (LEISHMAN, 1903). Durante a necropsia, foram observadas grandes quantidades de corpúsculos arredondados no baço deste indivíduo (DONOVAN, 1903). Assim, com nomeação de um novo gênero, o então ganhador do prêmio Nobel de fisiologia, Ronald Ross, propôs o nome de *Leishmania donovani* (ROSS, 1903). No Brasil o relato pioneiro, foi descrito em Corumbá, Mato Grosso do Sul, após a confirmação do protozoário no sangue do paciente (MIGONE, 1913). Após observações, foi constatado que a leishmaniose encontrada no Brasil diferia da evidenciada na Índia (CHAGAS, 1936), e o agente etiológico nas Américas é a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (CUNHA; CHAGAS, 1937).

A leishmaniose é uma doença enzoótica e zoonótica causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e classificada em formas tegumentar e visceral (MONTEIRO et al., 2005).

A forma visceral tem como agente etiológico *Leishmanias* do complexo *donovani*, que compreende a *Leishmania (Leishmania) donovani*, na Ásia e África, *Leishmania (Leishmania) infantum* na Ásia, Europa e África e *Leishmania (Leishmania) chagasi* nas Américas (LAINSON et al., 1987).

A infecção tegumentar pode ser causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) naiffi* (HEPBURN, 2000).

Em um estudo sobre a evolução e a distribuição geográfica do complexo *Leishmania donovani*, a *L. (L.) chagasi* e a *L.(L.) infantum*, foram consideradas a mesma espécie, devido a evidentes similaridades moleculares e bioquímicas entre as mesmas (LUKES et al., 2007).

No Brasil o principal inseto relacionado com a transmissão da leishmaniose é a *Lutzomia longipalpis*, porém recentemente *Lutzomyia cruzi* foi incriminada como vetor no estado de Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2006; SILVA et al., 2008).

O flebotomíneo *L. longipalpis* se infecta ingerindo durante o repasto sanguíneo, formas amastigotas do parasito, presentes nas células do sistema monocítico fagocitário encontradas na derme do hospedeiro definitivo. No tubo digestivo do inseto, transformam-se em promastigotas. Sequencialmente a fêmea do flebotomíneo inocula essas formas infectantes, em outro hospedeiro. Estas então são fagocitadas por macrófagos retornando a forma amastigota, onde se multiplicam causando rompimento da célula. Desta maneira ocorre disseminação hematogênica para os tecidos como fígado, baço, linfonodo e medula óssea (LAINSON et al., 1987).

A doença canina, mais prevalente, tem precedido a ocorrência de casos humanos (PARANHOS-SILVA et al., 1996). Sabe-se que, apesar de ser uma doença de notificação compulsória, os dados disponíveis são possivelmente subestimados (GONTIJO; MELO, 2004). O cão doméstico tem sido considerado o reservatório de maior importância para a transmissão da LV ao homem (DANTAS-TORRES, 2006).

Inúmeros autores têm relatado a ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, como pode ser observado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, notificada por diversos autores, em vários estados brasileiros

Ano	Autor (es)	Local	Técnica	Número de cães examinados	Número de cães reagentes	Positividade (%)
2001	Silva et al.	Minas Gerais	RIFI	644	139	21,6
			PCR	644	70	10,9
2002	Gontijo et al.	Minas Gerais	RIFI	148	30	20,3
2003	França-Silva et al.	Minas Gerais	RIFI	33.937	3.300	9,7
2003	Savani et al.	São Paulo	RIFI	2.104	12	0,6
2004	Guerra et al.	Roraima	RIFI	3.773	390	10,4
2005	Monteiro et al.	Minas Gerais	RIFI	4.795	236	5,0
2005	Silva et al.	Rio de Janeiro	RIFI	120	25	20,8
2006	Silva et al.	Minas Gerais	PCR	98	28	28,6
2006	Dantas-Torres et al.	Pernambuco	RIFI	322	130	40,4
2007	Ferreira et al.	Minas Gerais	RIFI	234	121	51,7
			ELISA			63,2
2007	Malaquias et al.	Minas Gerais	ELISA	175	24	13,7
			RIFI	49	8	18,2
2007	Rosypal et al.	São Paulo	RIFI	107	05	4,7
2008	Azevedo et al.	Mato Grosso	RIFI	1.112	87	7,8
2008	Rondon et al.	Ceará	ELISA	750	197	26,2
2009	Almeida et al.	Mato Grosso	RIFI	468	16	3,4
2009	Andrade et al.	Mato Grosso do Sul	RIFI	303	91	30,0
2009	Silva et al.	Rio de Janeiro	RIFI	60	25	41,7
2009	Falqueto et al.	Espírito Santo	ELISA	109	62	57,0
			RIFI	106	12	11,0
2009	Troncarelli et al.	São Paulo	RIFI	200	65	32,5
2010	Dantas-Torres et al.	Pernambuco	RIFI	41	12	29,3
2010	Figueiredo et al.	Rio de Janeiro	ELISA	305	19	6,2
			RIFI		111	36,4
2010	Frehse et al.	Paraná	ELISA	364	01	0,0027
2010	Oliveira et al.	Bahia	ELISA	312	21	4,9
			RIFI		10	3,2
2010	Santos et al.	Pernambuco	RIFI	256	41	16,0
2011	Coura-Vital et al.	Minas Gerais	ELISA	1.443	230	15,9
			PCR		356	24,7
2010	Dias et al.	Minas Gerais	ELISA	6.295	267	4,2
2011	Felipe et al.	Maranhão	RIFI	138	66	47,8
2012	Viol et al.	São Paulo	ELISA	408	82	20,1
			RIFI		61	14,9
			PCR		121	29,6
2013	Silva et al.	Rio de Janeiro	ELISA	524	148	28,2
2014	Campos; Costa	Piauí	ELISA	65	35	53,8
2014	Silva et al.	São Paulo	ELISA	67	48	71,6
2015	Laranjeira et al.	São Paulo	ELISA	134	73	54,5
2015	Costa et al.	São Paulo	PCR	68	30	88,24

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA= Ensaio Imunoenzimático Indireto; PCR= Reação em cadeia de polimerase

Tabela 2 – Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, notificada por diversos autores, em outros países

Ano	Autor (es)	Local	Técnica	Número de cães examinados	Número de cães reagentes	Positividade (%)
1991	Rachamin et al.	Portugal	RIFI	43	22	51,2
			ELISA		26	60,5
1996	Sideris et al.	Grécia	RIFI	1.175	569	48,4
2000	Natami et al.	Marrocos	ELISA	323	54	16,7
2002	Abdeen et al.	Israel	ELISA	308	17	5,5
2002	Headington et al.	Reino Unido	PCR	60	37	62,0
			RIFI		12	20,0
2002	Leontides et al.	Grécia	RIFI	73	9	12,3
			PCR		46	63,0
2003	Dereure et al.	Sudão	RIFI	35	25	71,4
2003	Grosjean et al.	Estados Unidos da América	RIFI	957	18	1,9
2003	Harrat & Belkaid	Argélia	RIFI	1.800	666	37,0
2003	Rami et al.	Marrocos	RIFI	257	48	18,7
			ELISA		54	21,0
2004	Amusatogui et al.	Espanha	RIFI	479	18	3,7
2005	Ertabaklar et al.	Turquia	PCR	160	57	35,6
2006	Fernandez et al.	Colômbia	ELISA	610	171	28,1
2006	Nasereddin et al.	Palestina	ELISA	148	10	6,8
2007	Rosypal, et al.	Colômbia	RIFI	258	4	1,6
2008	Tamer et al.	Turquia	RIFI	65	2	3,0
2009	Balcioglu et al.	Turquia	RIFI	176	24	13,6
2009	Charqui et al.	Tunísia	RIFI	67	8	12,0
			PCR		14	20,9
2009	Hassan et al.	Sudão	PCR	87	2	2,3
2009	Otranto et al.	Itália	RIFI	831	79	9,5
2009	Otranto et al.	Itália	ELISA	837	143	17,1
2009	Maresca et al.	Itália	RIFI	100	8	8,0
2009	Romero et al.	Colômbia	RIFI	270	185	68,5
2009	Toz et al.	Turquia	RIFI	140	29	20,7
2010	Cabézon et al.	Espanha	PCR	48	21	43,8
2010	Cruz et al.	Argentina	RIFI	102	40	39,2
2010	Faye et al.	Senegal	PCR	160	57	35,6
2010	Khanmohamadi et al.	Irã	RIFI	384	33	11,8
2011	Kovalenko et al.	Uzabequistão	PCR	116	10	8,6
2011	Kovalenko et al.	Uzabequistão	ELISA	162	51	31,5
2012	Hamarsheh et al.	Palestina	PCR	200	23	11,5
2012	Hamarsheh et al.	Palestina	ELISA	212	16	7,5
2013	Proverbio et al.	Itália	RIFI	89	54	60,6
2014	Mahshid et al.	Irã	ELISA	201	31	15,4

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta; ELISA= Ensaio Imunoenzimático Indireto; PCR= Reação em cadeia de polimerase

As leishmanioses viscerais caninas manifestam-se de maneira variável: enquanto alguns animais apresentam poucos sintomas como raras lesões dermatológicas, outros apresentam-se caquéticos, com alterações cutâneas, descamação, nódulos e úlceras, que são freqüentes nas bordas das orelhas, podendo ser encontradas distribuídas por toda a superfície corpórea. Casos de conjuntivite, blefarite, edema de focinho, onicogribose, parestesia das patas posteriores e caquexia têm sido relatados. Nas fases adiantadas da doença ocorre esplenomegalia, linfadenopatias, diarreias e hemorragia intestinal (FEITOSA et al., 2000; SILVA et al., 2001).

O espectro patológico da leishmaniose canina é muito diversa devido às diferenças do parasito e a variação das respostas imunológicas individuais dos cães, resultando em diversas formas clínicas (SAPORITO et al., 2013).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos são muito úteis na avaliação do estado clínico do animal podendo dar indícios do diagnóstico e prognóstico. Em cães soropositivos para leishmaniose, são características a redução do número de hemácias, taxas de hemoglobina e volume globular, indicando dessa forma anemia (FREITAS et al., 2012) bem como a elevação dos níveis de proteínas totais (MEDEIROS et al., 2008) hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (CASTRO et al., 2012).

Para a realização do diagnóstico são utilizadas provas sorológicas que apresentam alta sensibilidade e especificidade, porém cães infectados podem ser soronegativos ou animais soropositivos podem não apresentar a doença. Esse fato pode ser devido a proximidade filogenética existente entre *Leishmania* spp. e outros hematozoários, principalmente o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que pertencem a mesma família Tripanosomatidae, propiciando a ocorrência de reações cruzadas à sorologia (TRONCARELLI et al., 2009).

O Ministério da Saúde preconiza como técnica sorológica de triagem, um teste imunocromatográfico, o DPP® (Dual Path Platform), que usa como antígeno uma proteína recombinante da *L. infantum* rK26/rK39 (GRIMALDI JUNIOR et al., 2012; MARCONDES et al., 2013) e o teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) é usado como teste confirmatório da doença. Este último, representa um método simples e rápido para pesquisa desta infecção

canina (LIMA et al., 2005; SCALONE et al., 2002,), com a possibilidade de processamento de considerável número de amostras em curto intervalo de tempo (MAIA; CAMPINO, 2008).

Os animais soropositivos, apresentando sintomas ou assintomáticos devem ser eutanasiados (BRASIL, 2006). Devido a esse fato, para se obter um diagnóstico mais apurado, é necessário utilizar técnicas complementares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e o exame parasitológico direto (TRONCARELLI et al., 2009).

O método molecular permite amplificar seqüências de DNA do cinetoplasto deste protozoário (ALVES; BEVILACQUA, 2004; PAIVA CAVALCANTI et al., 2009), podendo ser utilizados amostras de sangue, tecidos cutâneos, nódulos linfáticos, conjuntiva e medula óssea (SOLANO-GALLEGO et al. 2009).

A detecção de DNA parasitário pela PCR foi descrita anteriormente em carrapatos (CAMPOS; COSTA, 2014; COLOMBO et al., 2011; COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2006; DANTAS-TORRES et al., 2010a; MORAIS et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2012; TROTTA et al., 2012), mas nestas pesquisas, não foi executada a IHQ para a investigação da presença de promastigotas do protozoário em órgãos do referido ectoparasito.

A macromolécula lipofosfoglicano (LPG) está presente na superfície do glicocálice da promastigota (ASSIS et al., 2012; FORESTIER; BOONS, 2014; MCCONVILLE; BLACKWELL, 1991; MOODY et al., 1993; NADERER et al., 2004) e toda as informações a respeito da estrutura da mesma tem sido obtida a partir destas formas evolutivas (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Estudos evidenciaram especificamente em relação a *Leishmania donovani*, que suas amastigotas aparentemente não sintetizam LPG (MCCONVILLE; BLACKWELL, 1991). As formas promastigotas de todos os parasitos do gênero *Leishmania* sintetizam este lipofosfoglicano, sendo seu principal

glicoconjugado, que reveste toda sua superfície parasitária incluindo o flagelo (TURCO; DESCOTEAUX, 1992).

Em alguns países endêmicos para leishmaniose visceral americana, como o Brasil, recomenda-se a eutanásia de cães soropositivos para leishmaniose (BRASIL, 2006; TRONCARELLI, 2008), mas esta medida além de ser ineficaz na taxa de incidência de casos humanos (COSTA, 2011), ainda é controversa.

Medidas de controle a serem preconizadas são implantação de campanhas de educação em saúde, diagnóstico precoce de humanos e de animais infectados, uso de coleiras repelentes (FOGLIA-MANZILLO et al., 2006), administração de vacinas (FERNANDES et al., 2008), remoção de matéria orgânica ambiental e controle de natalidade de cães (RIBEIRO et al., 2013).

OBJETIVO

Investigar a presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. pelo método de imuno-histoquímica em intestinos, ovários e glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* em cães.

REFERÊNCIAS

ABDEEN, Z. A.; SAWALHA, S. S.; EISENBERGER, C. L.; KHANFAR, H. M.; GREENBLATT, C. L.; YOUSEF, O.; SCHNUR, L. F.; AZMI, K.; WARBURG, A.; BADER, K. A.; JAFFE, C. L.; BANETH, G. Epidemiology of visceral leishmaniasis in the Jenin district, West Bank: 1989-1998. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 4, p. 329-333, 2002.

ALMEIDA, A. B. P. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F. A.; DAHROUG, M. A. A.; TURBINO, N. C. M.; SOUSA, V. R. F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, estado de Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 2, p. 1-8, 2009.

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

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; AGUIRRE, E.; TESOURO, M. A. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1026, p. 154-157, 2004.

ANDRADE, A. R. O.; NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; ARRUDA, C. C. P.; SANTOS, M. F. C.; ROCCA, M. E. G.; AQUINO, R. B. Estudo epidemiológico das leishmanioses em áreas de turismo ambiental e ecoturismo, Estado de Mato Grosso do Sul, 2006-2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 5, p. 488-493, 2009.

ASSIS, R. R.; IBRAIN, I. C.; NOGUEIRA, P. M.; SOARES, R. P.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in

lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Bioch. Biophys. Acta.**, v. 1820, p. 1354-1365, 2012.

AZEVEDO, M. A.; DIAS, A. K.; DE PAULA, H. B.; PERRI, S. H.; NUNES, C. M. Canine visceral leishmaniasis evaluation in Poxoréo, Mato Grosso State, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 3, p. 123-127, 2008.

BALCIOGLU, I. C.; ERTABAKLAR, H.; PASA, S.; OZBEL, Y.; TOZ, S. O. Natalia ili ve ilçelerindeki Dört Köpek Barınagında leishmaniasis seroprevalansinin Arastirilmesi. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**. v .33 n. 1, p. 4-7, 2009.

BEPA. Comitê de Leishmaniose Visceral Americana. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo, atualizado em maio de 2010. **Bol. Epidemiol. Paul.**, v. 7, p.21-40, 2010.

BRAGA, A. S. C.; TOLEDO JUNIOR, A. C. C.; RABELLO, A. Factors of poor prognosis of visceral leishmaniasis among children under 12 years of age. A retrospective monocentric study in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, 2001-2005. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 1, p. 55-59, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Óbitos de Leishmaniose Visceral: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2000-2010 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_obitos_05_09_11.pdf>. Acesso em 14 jun. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde. P. 120, 2006.

CABEZÓN, O.; MILLÁN, J.; GOMIS, M.; DUBEY, J. P.; FERROGLIO, E.; ALMERÍA, S. Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. **Parasitol. Res.**, v. 107, p. 1505-1508, 2010.

CAMPOS, J. H. F.; COSTA, F. A. L. Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 56, n. 4, p. 297-300, 2014.

CASTRO, I. P.; SOUSA, M. V. C.; MAGALHÃES, G. M.; MUNDIM, A. V.; NOLETO, P. G.; PAULA, M. B. C.; PAJUABA NETO, A. A.; MEDEIROS, A. A. Hepatic and proteic profile in dogs with visceral leishmaniasis. **Biosci. J.**, v. 28, n. 5, p. 799-804, 2012.

CHAGAS E. Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Science**, v. 2183, n. 84, p. 397-398, 1936.

CHARQUI, N.; HAOUAS, N.; GORCII, M.; LAHMAR, S.; GUESMI, M.; BEN ABDELHAFIDH, A.; MEZHOUD, H.; BABBA, H. Use of PCR, IFAT and in vitro culture in the detection of *Leishmania infantum* infection in dogs and evaluation of the prevalence of canine leishmaniasis in a low endemic area in Tunisia. **Parasite**, v. 16, n. 1, p. 65-69, 2009.

COLOMBO, F. A.; ODORIZZI, R. M. F. N.; LAURENTI, M. D.; GALATI, E. A. B.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitol. Res.**, v. 109, p. 267-274, 2011.

COSTA, C. H. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind

this public health policy. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

COSTA, L. N. G.; BORBA, A. S.; CASTAGNA, C. L.; CARVALHO FILHO, E. B.; MARSON, F. A. L.; SÁ JUNIOR, F. F.; ANGERAMI, R. N.; LEVY. Evaluation of PCR in the diagnosis of canine leishmaniasis in two different epidemiological regions: Campinas (SP) and Teresina (PI), Brazil. **Epidemiol. Infect.**, v. 143, p. 1088-1095, 2015.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. A. Prevalence and Factors Associated with *Leishmania infantum* Infection of Dogs from an Urban Area of Brazil as Identified by Molecular Methods. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 8, 2011.

COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 128, p. 149-155, 2005.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet. Parasitol.**, v. 147, p. 320-325, 2007.

CRUZ, I.; ACOSTA, L.; GUTIÉRREZ, M. N.; NIETO, J.; CAÑAVATE, C.; DESCHUTTER, J.; BORNAY-LLINHARES, F. J. A canine leishmaniasis pilot survey in a emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). **Infectious Dis.**, v. 10, 342p., 2010.

CUNHA, A. M.; CHAGAS E. Nova espécie de protozoário do Gênero *Leishmania* patogênico para o homem (nota prévia). **Hospital**, v.11, n. 2, p. 5-9, 1937.

DANTAS-TORRES, F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from to dog? **Vet. Parasitol.**, v. 136, p. 379-380, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitol. Vectors**, v. 128, p.149-155, 2010.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806); from taxonomy to control. **Vet. Parasitol.**, v. 152, p. 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends parasitol.** v. 27, p. 155-159, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Vet. parasitol.**, v. 140, p. 54-60, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; LORUSSO, V.; TESTINI, G.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; STANNECK, D.; MENCKE, N.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; ALVES, L. C.; OTRANTO D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitol. Res.**, v.106, p. 857-860, 2010a.

DONOVAN, C. Memoranda: on the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India. **Br. Med. J.**, v. 6, p. 118-120, 1913.

ERTABAKLAR, H.; TOZ, S. O.; OZKAN, A. T.; RASTGELDI, S.; BALCIOGLU, I. C.; OZBEL, Y. Serological and entomological survey in a zoonotic visceral leishmaniasis focus of North Central Anatolia, Turkey: Corum province. **Acta Trop.**, v. 93, p. 239-246, 2005.

FALQUETO, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. B.; PORROZZI, R.; COSTA, M. V. S.; TEVA, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPOS-NETO, A.; GRIMALDI JR, G. Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 4, p. 559-565, 2009.

FAYE, B.; BAÑULS, A. L.; BUCHETON, B.; DIONE, M. M.; BASSANGANAM, O.; HIDE, M.; DEREURE, J.; CHOISY, M.; NDIAYE, J. L.; KONATE, O.; CLAIRE, M.; SENGHOR, M. W.; FAYE, M. N.; SY, I.; NIANG, A. A.; MOLEZ, J. F.; VICTOIR, K.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; KNECHT, R.; MELLUL, S.; DIEDHIOU, S.; GAYE, O. Canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Senegal: risk of emergence in humans? **Microbes and Infection**, v. 12, p. 1219-1225, 2010.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Rev. Clin. Vet.**, v.5, n.28, p. 36-44, 2000.

FELIPE, I. M. A.; AQUINO, D. M. C.; KUPPINGER, O.; SANTOS, M. D. C.; RANGEL, M. E. S.; BARBOSA, D. S.; BARRAL, A.; WERNECK, G. L.; CALDAS, A. J. M. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 207-211, 2011.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M.; COELHO, E. A.; MICHALICK, M. S.; FREITAS, E.; MELO, M. N.; TAFURI, L. W.; RESENDE, M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C. F.; GAZZINELLI, R. T. Protective immunity against challenge

with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FERNÁNDEZ, J.; BELLO, F.; LÓPEZ, M. C.; MONCADA, L. I.; VARGAS, J. J.; AYALA, M. S.; NICHOLLS, R. S.; LOZANO, C. A. Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in sector 8 of Neiva and in four municipalities of Huila, Colombia. **Biomedica**, v. 1, p. 121-130, 2006.

FERREIRA, E. C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. F. Comparison of serological assays for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Vet. Parasitol.**, v., 146, p. 235-241, 2007.

FERREIRA, M. G. P. A.; FATTORI, K. R.; SOUZA, F.; LIMA, V. M. F. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.**, v. 165, p. 150-154, 2009.

FOGLIA-MANZILLO, V.; OLIVA, G.; PAGANO, A.; MANNA, L.; MAROLI, M.; GRADONI, L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 142, p. 142-145, 2006.

FORESTIER, C. L.; GAO, Q.; BOONS, G. J. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? **Frontiers Cell. Infect. Microbiol.**, v. 4, n. 193, p. 1-7, 2014.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral

leishmaniosis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 111, p. 161-173, 2003.

FREHSE, M. S.; JÚNIOR, H. G.; ULLMANN, L. S.; CAMOSSI, L. G.; MACHADO, J. G.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W.; MOLENTO, M. B. Surveillance of canine visceral leishmaniasis in a disease-free area. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 1, p. 64-66, 2010.

FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LOPES NETO, B. E.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 1, p. 24-29, 2012.

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

GONTIJO, C. M. F.; SILVA, E. S.; FUCCIO, M. B.; SOUSA, M. C. A.; PACHECO, R. S.; DIAS, E. S.; ANDRADE FILHO, J. D.; BRAZIL, R. P.; MELO, M. N. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v. 81, p. 143-150, 2002.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP®CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, n. 1; p. 54–59, 2012.

GROSJEAN, N. L.; VRABLE, R. A.; MURPHY, A. J.; MANSFIELD, L. S. Seroprevalence of antibodies against *Leishmania* spp. among dogs in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 222, n. 5, p. 603-606, 2003.

GUERRA, J. A. O.; BARROS, M. L. B.; FÉ, N. F.; GUERRA, M. V. F.; CASTELLON, E.; PAES, M. G.; SHERLOCK, I. A. Leishmaniose visceral entre índios no Estado de Roraima, Brasil. Aspectos clínicoepidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, n. 4, p. 305-311, 2004.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1-28, 2010.

HAMARSHEH, O.; NASEREDDIN, A.; DAMAJ, S.; SAWALHA, S.; AL-JAWABREH, H.; AZMI, K.; AMRO, A.; EREQAT, S.; ABDEEN, Z.; AL-JAWABREH, A. Serological and molecular survey of *Leishmania* parasites in apparently healthy dogs in the West Bank, Palestine. **Parasit. Vectors**, v. 5, p. 183, 2012.

HARRAT, Z.; BELKAID, M. Leishmaniasis in Algiers: epidemiologic data. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.96, n. 3, p. 212-214, 2003.

HASSAN, M. M.; OSMAN, O. F.; EL-RABAA, F. M. A.; SCHALLIG, H. D. F. H.; ELNAIEM, D. E. A. Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. **Parasit. Vectors**, v. 2, 26p., 2009.

HEADINGTON, C. E.; BARBARA, C. H.; LAMBSON, B. E.; HART, D. T.; BARKER, D. C. Diagnosis of leishmaniasis in Maltese dogs with the aid of the

polymerase chain reaction. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, n. 1, p. 195-197, 2002.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.25, n.5, p. 363-370, 2000.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 3-14, 2004.

KHANMOHAMMADI, M.; FALLAH, E.; RAHBARI, S.; SOHRABI, I.; FARSHCHIAN, M.; HAMZAVI, F.; ASL, A. M. Study on seroprevalence of canine visceral leishmaniasis (CVL) in ownership dogs of Sarab, East Azerbaijan, Province, Northwest of Iran with indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) and its health importance in 2008-2009. **J. Anim. Vet. Adv.**, v. 9, p.139-143, 2010.

KOVALENKO, D. A.; RAZAKOV, S. A.; PONIROVSKY, E. N.; WARBURG, A.; NASYROVA, R. M.; PONOMAREVA, V. I.; FATULLAEVA, A. A.; NASEREDDIN, A.; KLEMENT, E.; ALAM, M. Z.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. L.; SCHONIAN, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis and its relationship to human visceral leishmaniasis in Eastern Uzbekistan. **Parasit. Vectors**, v. 4, 58p., 2011.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.

LARA-SILVA, F. O.; MICHALSKY, E. M.; FORTE-DIAS, C. L.; FIUZA, V. O. P.; PESSANHA, J. E. M.; REGINA-SILVA, S.; AVELAR, D. M.; SILVA, M. A.; LIMA, A. C. V. M. R.; COSTA, A. J. A.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; DIAS, E. S. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in

áreas of recente transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop.**, 2015, IN PRESS.

LARANJEIRA, D. F.; MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y.; MARCONDES, M.; CORBET, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic área. **Rev. Saúde Pública**, v. 48, n. 4, p. 563-570, 2015.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **Br. Med. J.**, v. 1, n. 2213, p. 1252–1254, 1903.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.; KOUTINAS, A. F.; GALATOS, A. D.; MYLONAKIS, M. E. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet. Parasitol.**, v. 109, p. 19-27, 2002.

LIMA, V. M. F.; BIAZZONO, L.; SILVA, A. C.; CORREA, A. P. F. L.; LUVIZOTTO, M. C. R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by na enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 25, n. 4, p. 215-218, 2005.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHL, K.; TINTAYA, K. W. Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATIONG, F.; OBORNIK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

MAHSHID, M.; BAHARAK, A.; IRAJ, S.; SINA, K.; JAVAD, K.; MEHDI, B. Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in southeast of Iran. **J. Parasit. Dis.**, v. 38, n. 2, p. 218-222, 2014.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, v. 158, p. 274-287, 2008.

MALAQUIAS, L. C. C.; ROMUALDO, R. C.; ANJOS JR, J. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. 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.**, v. 100, p. 233-239, 2007.

MARCONDES, M.; LIMA, V. M. F.; ARAÚJO, M. F. L.; HIRAMOTO, R. M.; TOLENZANO, J. E.; VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Vet. Parasitol.**, v. 197, p. 649-652, 2013.

McCONVILLE, M. J.; BLACKWELL, J. M. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 15170-15179, 1991.

MEDEIROS, C. M. O.; MELO, A. G. C.; LIMA, A. K. F.; SILVA, I. N. G.; OLIVEIRA, L. C.; SILVA, M. C. Haematological profile of dogs with visceral leishmaniasis in the city of Fortaleza, Ceará. **Ciec. Anim.**, v.18, n.1, p. 43-50, 2008.

MIGONE, L. E. Um caso de kalazar a Assuncion (Paraguai). **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 6, p. 118-20, 1913.

MILLER, R. J.; GEORGE, J. E.; GUERRERO, F.; CARPENTER, L.; WELCH, J. B. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. **J. Med. Entomol.**, v. 38, p. 298-302, 2001.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. D. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 2, p.147-152, 2005.

MOODY, S. F.; HANDMAN, E.; McCONVILLE, M. J.; BACIC, A. The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 18457-18466, 1993.

MORAIS, R. C. S.; GONÇALVES, S. C.; COSTA, P. L.; SILVA, K. G.; SILVA, F. J.; SILVA, R. P.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; DANTAS-TORRES, F.; PAIVA-CAVALCANTI, M. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 59, p. 473-481, 2013.

NADERER, T.; VINCE, J. E.; McCONVILLE, M. J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Current Mol. Med.**, v. 4, p. 649-665, p. 2004.

NASEREDDIN, A.; EREGAT, S.; AZMI, K.; BANETH, G.; JAFFE, C. L.; ABDEEN, Z. Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. **J. Parasitol.**, v. 92, n. 1, p. 178-183, 2006.

NATAMI, A.; SAHIBIB, H. LASRIB, S.; BOUDOUMA, M.; GUESSOUSS-IDRRISSIC, N.; RHALEMB, A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the khemisset province, Morocco. **Vet. Res.**, v. 31, p. 355-363, 2000.

OLIVEIRA, L. C. P.; ARAÚJO, R. R.; ALVES, C. R.; MOUTA-CONFORT, E.; LÓPEZ, J. A.; MENDONÇA-LIMA, F. W. Soroprevalência e fatores de risco

para leishmaniose visceral canina na área endêmica de Dias D'ávila, Estado da Bahia, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 4, p. 400-404, 2010.

PAHO. Pan American Health Organization, 2013. **Report Leishmaniases**. n. 1-2013, April. Disponível em:< http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=21608&itemid=270&lang=es>. Acesso em: 03 maio 15.

PAIVA CAVALCANTI, M.; BRITO M. E. F.; DE SOUZA, W. V.; GOMES, Y. G.; ABATH, F. G. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Vet. J.**, v. 182, n.2, p. 356-358, 2009.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI JUNIOR, G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. A. Cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v. 55, n. 1, p. 39-44, 1996.

PROVERBIO, D.; SPADA, E.; BAGGIANI, L.; DE GIORGI, G.B.; PEREGO, R. Comparison of a Clinic-Based ELISA Test Kit with the Immunofluorescence Antibody Test for Assaying *Leishmania infantum* Antibodies in Dogs. **BioMed. Res. Inter.**, v. 2013, p. 6, 2013.

RACHAMIM, N.; JAFFE, C. L.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C.; SCHNUR, L. F.; JACOBSON, R. L. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 85, n. 5, p. 503-508, 1991.

RAMI, M.; ATARHOUCHE, T.; SABRI, M.; CADI, S. M.; BENAZZOU, T.; DAKKAK, A. Canine leishmaniasis in the Rif mountains (Moroccan Mediterranean coast): a seroepidemiological survey. **Parasite**, v. 10, n. 1, p. 79-85, 2003.

RIBEIRO, V. M.; SILVA, S. M.; MENZ, I.; TABANEZ, P.; NOGUEIRA, F. S.; WERKHAÜSER, M.; FONSECA, A. L.; DANTAS-TORRES, F. Brasileish –A Study Group about Animal Leishmaniasis. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasit. Vectors**, v. 6, n. 1, p. 8, 2013.

ROMERO, M. H.; LÓPEZ, M. C.; SANCHEZ, J. A. Búsqueda active de casos de leishmaniasis visceral zoonótica em población infantile indígena y canina colombiana. **Rev. Salud. Public.**, v. 11, n. 6, p. 944-951, 2009.

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; FRANKE, C. R.; BARROS, R. S.; OLIVEIRA, F. R.; ALCÂNTARA, A. C.; DINIZ, A. T. Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 155, p. 24-31, 2008.

ROSS, R. Further Notes on Leishman's Bodies. **Br Med J**. v. 2, n. 2239, p. 1401, 1903.

ROSYPAL, A. C.; CORTE'S-VECINO, J. A.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; TIDWELL, R. R.; LINDSAY, D. S. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. **Vet. Parasitol.**, v. 149, p. 172-177, 2007.

SAPORITO, L.; GIAMMANCO, G. M.; DE GRAZIA, S.; COLOMBA, C. Visceral leishmaniasis: host–parasite interactions and clinical presentation in

the immunocompetent and in the immunocompromised host. **Intern. J. Infect. Dis.**, v. 17, p. 572-576, 2013.

SAVANI, E. S. M.; SCHIMONSKY, B. V.; CAMARGO, M. C. O.; DAURIA, S. R. N. Vigilância de leishmaniose visceral americana em cães de área não endêmica, São Paulo. **Rev Saúde Pública.**, v. 37, n. 2, p. 260-262, 2003.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet. Parasitol.**, v. 104, p. 275-285, 2002.

SIDERIS, V.; KARAGOUNI, E.; PAPADOPOULOU, G.; GARIFALLOU, A.; DOTSIKA, E. Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. **Parasite**, v. 3, n. 2, p. 125-130, 1996.

SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A.; CARREIRA, J. C. A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad. Saúde Pública.**, v. 21, n. 1, p. 324-328, 2005.

SILVA, A. V. M.; PAULA, A. A.; PEREIRA, D. P.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. C. A. Canine leishmaniasis in Brazil: serological follow-up of a dog population in an endemic area of American visceral leishmaniasis. **J. Parasitol. Res.**, 6p., 2009.

SILVA, C. B.; VILELA, J. A.; PIRES, M. S.; SANTOS, H. A.; FALQUETO, A.; PEIXOTO, M. P.; OLIVEIRA, T. A.; SANTOS, F. N.; SILVA, V. L.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C. L. Seroepidemiological aspects of *Leishmania* spp. in dogs

in the Itaguaí micro-region, Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 1, p. 39-45, 2013.

SILVA, D. T.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ALVES-MARTINS, M. F.; PAIXÃO, M. S.; TENÓRIO, M. S.; LOPES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 23, n. 2, p. 179-186, 2014.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J. C.; BRAZUNA, J. C. M. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Exp. Parasitol.**, v. 119, n.3, p. 343-348, 2008.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; BRAZIL, R. P. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 6, p. 896-898, 2001.

SILVA, E. S.; MEIDE, W. F.; SCHOONE, G. J.; GONTIJO, C. M. F.; SCHALLIG, H. D. F. H.; BRAZIL, R. P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. **Vet. Res. Comm.**, v. 30, p. 637-643, 2006.

SOLANO-GALLEGO, L.; ROSSI, L.; SCROCCARO, A. M.; MONTARSI, F.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T.; TROTTA, M. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniasis. **Parasit. Vectors**, v. 5, p. 98, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRA, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 165, n. 1/2, p. 1-18, 2009.

TAMER, G. S.; POLAT, E.; TÖZ, S. O.; ALTAS, K. Kocaeli Sokak Köpeklerinde visceral leishmaniasis seroprevalansı. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, v. 32, n. 3, p. 183-186, 2008.

TOZ, S. O.; SAKRU, N.; ERTABAKLAR, H.; DEMIR, S.; SENGUL, M.; OZBELI, Y. Serological and entomological survey of zoonotic visceral leishmaniasis in Denizli Province, Aegean region, Turkey. **New Microbiologica**, v. 32, p. 93-100, 2009.

TRONCARELLI, M. Z.; MACHADO, J. G.; CAMARGO, L. B.; HOFFMANN, J. L.; CAMOSSO, L.; GRECA, H.; FACCIOLI, P. Y.; LANGONI, H. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. **Vet. Zootec.**, v. 15, p. 40-47, 2008.

TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J. B.; MACHADO, J. G.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic áreas for canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 164, n.2/4, p. 118-123, 2009.

TROTTA, M.; NICETTO, M.; FOGLIAZZA, A.; MONTARSI, F.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. **Ticks tick bourn dis.**, v. 3, p. 293-296, 2012.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 65-94, 1992.

VIOL, M. A.; LIMA, V. M. F.; AQUINO, M. C. C.; GALLO, G.; ALVES, I. P.; GENEROSO, D.; PERRI, S. H. V.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H.; NUNES, C. M.; BRESCIANI, K. D. S. Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Parasitol. Res.**, v. 111, p. 1607-1613, 2012.

WHO. World Health Organization, 2014. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/706_response_more/en/index.html> Acesso em 03 maio 2015.

CAPÍTULO 2 - Presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. em intestinos, ovários e glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* em cães

Resumo - Em determinadas áreas, não são encontrados os flebotomíneos, reconhecidos vetores da leishmaniose visceral canina, porém esta ocorre em humanos e cães. O DNA parasitário de *Leishmania* spp. já foi detectado em carrapatos, mas seu papel epidemiológico precisa ser elucidado. Nós investigamos a presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. por meio de imuno-histoquímica para detecção de lipofosfoglicano (LPG) em intestinos, ovários e glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* em cães. Neste estudo, foram utilizados 66 cães positivos e 33 negativos para *Leishmania* spp. pelo teste Imunoenzimático (ELISA), por exame citológico direto e pela Reação em cadeia da polimerase (PCR). Um total de 990 carrapatos foram colhidos desses 99 cães, sendo 10 por animal e estes foram dissecados, com posterior separação dos intestinos, ovários e glândulas salivares. Lâminas contendo os órgãos supramencionados foram confeccionadas para a execução da imuno-histoquímica (IHQ). Também foi efetuada a PCR em tempo real desses órgãos, bem como a quantificação da sua carga parasitária. Pela PCR em tempo real dos intestinos, ovários e glândulas salivares dos carrapatos, foram detectadas positivities de 93,94%, 46,97% e 27,27%, respectivamente. As cargas parasitárias médias no intestino foram de 9027,90 *Leishmania*/μL, nos ovários 411,66 *Leishmania*/μL e nas glândulas salivares 305,56 *Leishmania*/μL. Com relação as leituras das lâminas de IHQ, em 98,48% dos intestinos, 13,64% dos ovários e 7,58% das glândulas salivares houve imunomarcção positiva para *Leishmania* spp. Em virtude destes resultados evidenciados pela técnica de IHQ, com utilização do anticorpo primário lipofosfoglicano (LPG), nós consideramos a possibilidade da presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. em órgãos de *R. sanguineus*.

Palavras-chave: ixodídeos, leishmaniose, canino, imuno-histoquímica, PCR em tempo real

Considerations about the presence of promastigotes of *Leishmania* spp. in the intestines, ovaries, salivary glands and *Rhipicephalus sanguineus* in dogs

SUMMARY - In certain areas, are not found sand flies, recognized vectors of canine visceral leishmaniasis, but this disease occurs in humans and dogs. The DNA of *Leishmania* spp. has been detected in ticks, but its epidemiological role needs to be elucidated. We investigated the presence of promastigotes of *Leishmania* spp. by immunohistochemical (IHC) in intestines, ovaries and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs. In this study, we used 66 dogs positive and 33 negative for *Leishmania* spp. by immunoenzymatic (ELISA) test, by direct cytological examination and polymerase chain reaction (PCR). A total of 990 ticks were collected from these 99 dogs, 10 per animal and these were dissected, with further separation of the intestines, ovaries and salivary glands. Slides of the above organs were made for the implementation of immunohistochemistry. Also the real-time PCR was performed in these organs as well as the quantification of the parasite load. For real-time PCR of the guts, ovaries and salivary glands of ticks were detected positivities 93.94%, 46.97% and 27.27%, respectively. The average parasitic loads in the intestine were 9027.90 *Leishmania*/μL, the ovaries 411.66 *Leishmania*/μL and salivary glands 305.56 *Leishmania*/μL. Regarding the readings of IHC slides in 98.48% of the intestines, 13.64% of the ovaries and 7.58% of the salivary glands were positive for *Leishmania* spp. In view of these results shown by IHC technique, using the lipophosfoglicano primary antibody (LPG), we consider the possibility of the presence of promastigotes of *Leishmania* spp. in *R. sanguineus* organs.

Keywords: ticks, leishmaniasis, canine, immunohistochemistry, real-time PCR

1 Introdução

O cão é o principal reservatório urbano da leishmaniose visceral, zoonose de considerável relevância em saúde pública, transmitida por flebotomíneos (WHO, 2005), que apresenta expressiva morbidade e mortalidade em 98 países do mundo (WHO, 2014).

Em determinadas áreas, não são encontrados os flebotomíneos, reconhecidos vetores da doença, porém esta ocorre em humanos e cães (MICHALSKY et al., 2009). Deste modo, outros ectoparasitos, como pulgas e carrapatos, podem estar envolvidos na epidemiologia da enfermidade em questão.

O *Rhipicephalus sanguineus*, de distribuição cosmopolita, está estreitamente relacionado à espécie canina (DANTAS-TORRES, 2008). Por ser hematófago, este ácaro está predisposto a ingerir muitos tipos de microorganismos em seu repasto sanguíneo, mas ainda não foi estabelecido seu papel como transmissor da infecção por *Leishmania* (COURA-VITAL et al., 2014; COUTINHO; LINARDI, 2007; DANTAS-TORRES, 2010; DANTAS-TORRES et al., 2010a; DANTAS-TORRES et al., 2010b; DANTAS-TORRES, 2011; PAZ et al., 2010).

Nós investigamos a presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. pelo método de imuno-histoquímica em intestinos, ovários e glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* em cães.

2 Material e Métodos

Aprovação do comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, campus de Jaboticabal, processo número 011800/11.

Delineamento experimental

Inicialmente foi realizada uma triagem com o uso do exame citológico, para a visualização de formas amastigotas em linfonodos e/ou medulas ósseas de cães de áreas endêmicas e não endêmicas. Posteriormente o diagnóstico foi complementado por ELISA (LIMA et al., 2003) e PCR em tempo real de medula-óssea e linfonodo (PEROSSO et al., 2014).

Desta forma, 99 cães adultos, sem raça definida, sendo que 65 eram machos e 34 fêmeas. Dos 66 animais positivos, 33 foram provenientes dos Centros de Controle de Zoonoses dos Municípios de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS) e 33 de Araçatuba, São Paulo (SP), ambas áreas endêmicas para leishmaniose visceral canina. Os 33 cães negativos para esta infecção eram mantidos no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal, CPPAR, UNESP, Jaboticabal, São Paulo (SP), considerada área não endêmica.

Colheitas e Dissecções dos carrapatos

Um total de 990 carrapatos foram colhidos, sendo 10 por animal e estes foram dissecados. Inicialmente foram lavados em solução salina tamponada com pH 7,4 e álcool, secos em papel toalha e fixados em placa

de petri contendo parafina, para serem dissecados com lâmina de bisturi número 11. De cada carrapato, foi separado o intestino, ovário e glândula salivar, onde no início foram mantidos em pool em três microtubos contendo solução salina tamponada, para a extração de DNA, sendo um microtubo para cada um dos órgãos supramencionados. Após o término da dissecação, metade da quantidade de cada órgão foi transferida para outro microtubo contendo formalina tamponada 10% para posterior realização da Imuno-histoquímica. A dissecação foi realizada atentando-se para a não ruptura dos órgãos, a fim de se evitar a contaminação, sendo que os rompidos eram descartados (DANTAS-TORRES et al., 2010a; EDWARDS et al., 2009).

Reações de Imuno-histoquímica para detecção de LPG

Amostras de ovários, glândulas salivares e intestinos dos carrapatos foram fixadas em formol e emblocadas em parafina, sendo submetidas a microtomia para a obtenção de cortes histológicos de 3 μ m (micrometros), que foram estendidas em lâminas silanizadas, destinadas aos procedimentos da técnica imuno-histoquímica. Os cortes foram desparafinados, rehidratados e submetidos à recuperação de antígenos sob calor úmido, sendo imersos em solução de ácido cítrico 10 mM/pH 6,0 em panela de pressão, por três minutos. Após resfriamento da solução, as lâminas foram lavadas em água destilada corrente e levadas ao bloqueio de peroxidase endógena em solução de água oxigenada 20 volumes, a 37 °C por 30 minutos. Ao final desta etapa, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente, água destilada e solução salina tamponada com fosfatos (PBS).

A seguir, as seções foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-*Leishmania* LPG (lipofosfoglicano), a 4°C por 18 horas,

diluído a 1:10.000 em solução diluente (soroalbumina bovina a 1% em PBS). Após esta etapa, os cortes foram lavados em PBS para prosseguimento da reação com anticorpo secundário (kit Spring- Reveal HRP), a 37 °C por 30 minutos. Após nova etapa de lavagens em PBS, for aplicado, às seções, o polímero conjugado com peroxidase (kit Spring- Reveal HRP). Seguiu-se etapa de lavagens em PBS e as reações foram reveladas com substrato cromogênico Diaminobenzidina (Sigma Aldrich) 100 mg% e peróxido de hidrogênio 0,1% em PBS. Após revelação, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e submetidas a contra-coloração (leve) com Hematoxilina de Harris e, em seguida, montagem com lamínula e meio permanente Entellan (Merch) para microscopia.

Extração de DNA dos órgãos dos carrapatos

As amostras de DNA foram extraídas (SANGIONI et al., 2005) e armazenadas no freezer a - 80°C.

PCR em tempo real de carrapatos

Para este teste foram utilizados os primers ITS1-F e ITS1-R (PEROSSO et al., 2014). A PCR foi realizada com um volume total de 20 µl, sendo 1,0 µL de cada primer (10 pmol) , 1,0 µl de DNA, 7,0 µL de água ultra pura e 10 µL do mix Quantifast Syber Green (Qiagen®, USA) . As PCRs foram realizadas em termociclador¹. As amostras, em duplicata, foram incubadas a 50°C por 2 minutos (min), 95°C por mais 2 min e então por 40 ciclos de amplificação (95°C por 15 segundos (s) , seguido de 60°C por 30 s).

¹ CFX96TM Real-Time System, Bio-Rad®, Hercules, CA, Estados Unidos da América

O protocolo da curva de melt foi de 95°C por 15 s, 60°C por 15 s seguidos de 20 min até se alcançar 95°C por 15 s. Água livre de nucleases foi utilizada como controle negativo da reação.

Quantificação da carga parasitária

Para quantificação da carga parasitária, foi utilizada a PCR em tempo real com os primers ITS1-F e ITS1-R. A curva padrão para quantificação foi realizada em diluições seriadas em nove diferentes concentrações de culturas de promastigotas de *Leishmania infantum* (PEROSSO et al., 2014).

A especificidade do primer foi testada utilizando o programa computacional Primer-Blast, que não indicou similaridades nucleotídicas com *Trypanosoma cruzi*, *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp.

Análise estatística

A análise estatística utilizada foi o Teste de McNemar para comparar a proporção de positividade para *Leishmania* entre os órgãos dos carrapatos e o Teste de Friedman para comparar a carga parasitária dos mesmos.

3 Resultados

Os 330 carrapatos do grupo controle, apresentaram resultados negativos tanto na PCR como na IHQ.

Com relação as leituras das lâminas de IHQ, em 98,48% dos intestinos, 13,64% dos ovários e 7,58% das glândulas salivares foram observadas imunomarcações positivas para *Leishmania* spp. (Figura 1).

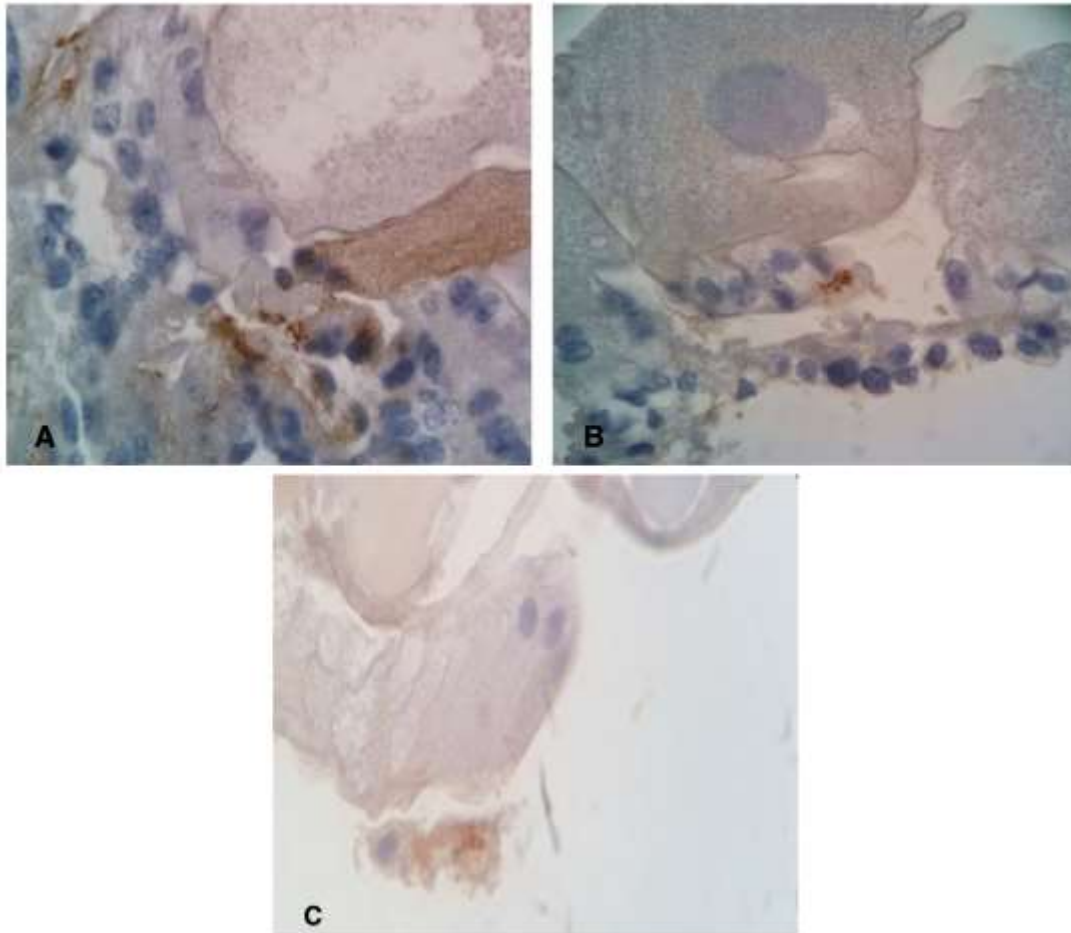


FIGURA 1- Fotomicrografias representativas de imunomarcações positivas de formas promastigotas de *Leishmania* spp. em órgãos de teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus*. **A:** Intestino. **B:** Ovário. **C:** Glândula Salivar. Imunoperoxidase revelada com diaminobenzina (DAB). Aumento objetiva 100x.

Tanto pela IHQ como pela PCR, os intestinos diferiram significativamente dos dois outros órgãos, e por sua vez estes últimos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,001$) entre si.

Em relação aos resultados da PCR em tempo real dos intestinos, ovários e glândulas salivares dos carrapatos, foram verificadas 93,94%, 46,97% e 27,27% de positividade, respectivamente. As cargas parasitárias

médias no intestino foram de 9027,90 *Leishmania*/ μ L e nos ovários 411,6 *Leishmania*/ μ L apresentando diferença significativa ($p < 0,001$). Nas glândulas salivares foram quantificados 305,56 *Leishmania*/ μ L sendo também diferente estatisticamente ($p < 0,001$) quando comparado aos intestinos, porém não obtendo esta diferença ($p > 0,001$) em relação aos ovários analisados.

Estas reações apresentaram eficiência variando de 76,8 a 96,6%, correlação de 0,997 a 0,999 e slope de -3.407 a -4.039.

Nos intestinos, foi observada a ocorrência de 98,48% por meio da IHQ e 93,94% pela PCR, não sendo constatada diferença significativa ($p > 0,05$). A detecção do DNA do parasito pela PCR foi de 46,97% em ovários e 27,27% em glândulas salivares, sendo superior ($p < 0,05$) à observada por meio da IHQ que foi 13,64% e 7,58%, respectivamente.

4 Discussão

Devido ao encontro de imunomarcações positivas pela técnica de IHQ, com utilização do anticorpo primário LPG, nós consideramos a possibilidade da presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. em órgãos de *R. sanguineus*. Esta macromolécula está presente na superfície do glicocálice da promastigota (ASSIS et al., 2012; FORESTIER; BOONS, 2014; MCCONVILLE; BLACKWELL, 1991; MOODY et al., 1993; NADERER et al., 2004) e toda as informações a respeito da estrutura da mesma tem sido obtida a partir destas formas evolutivas (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Estudos evidenciaram especificamente em relação a *Leishmania donovani*, que suas amastigotas aparentemente não sintetizam LPG (MCCONVILLE;

BLACKWELL, 1991). A forma promastigota de todos os parasitos do gênero *Leishmania* sintetizam este lipofosfoglicano, sendo seu principal glicoconjugado, que reveste toda sua superfície parasitária incluindo o flagelo (TURCO; DESCOTEAUX, 1992).

Nós conseguimos constatar molecularmente a ocorrência de *Leishmania* spp. em intestinos, ovários e glândulas salivares dos artrópodes em questão. A detecção de DNA parasitário pela PCR foi descrita anteriormente (CAMPOS; COSTA, 2014; COLOMBO et al., 2011; COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2006; DANTAS-TORRES et al., 2010a; MORAIS et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2012; TROTTA et al., 2012), mas nestas pesquisas, não foi executada a IHQ para a investigação da presença de promastigotas deste protozoário em órgãos do referido ectoparasito.

A dissecação dos órgãos dos artrópodes envolvidos em nosso estudo, foi por si só uma tarefa meticulosa a ser efetuada, demandando especial critério em virtude da fragilidade dos tecidos destes parasitos, bem como por seu tamanho diminuto exigindo habilidade na utilização do estereomicroscópio.

Pesquisas anteriores investigaram a ocorrência da infecção por *Leishmania* em carrapatos não dissecados, o que impossibilita tecer comparações com os resultados obtidos no presente estudo, em que foi efetuada a separação dos órgãos. No entanto, deve ser citado o ensaio em que foi detectada positividade em dois pools de glândulas salivares de 22 ixodídeos de cães sorologicamente positivos provenientes da Itália (DANTAS-TORRES et al., 2010a). Com base nesta argumentação, não discutimos os

resultados da quantificação da carga parasitária de todos os órgãos nos artrópodes estudados.

Este foi o primeiro trabalho onde foram utilizadas amostras individualmente colhidas de intestinos, ovários e glândulas salivares de carrapatos para se pesquisar a presença de *Leishmania* spp. com o uso da ferramentas molecular associada à investigação imuno-histoquímica.

Importante ressaltar que nos carrapatos foi encontrada maior positividade nos intestinos do que nos ovários e nas glândulas salivares, tanto pela PCR como pela IHQ. Particularmente a disseminação transovariana do parasito foi demonstrada pela detecção do mesmo pela PCR em tempo real em ovos e larvas de fêmeas dos carrapatos infectados experimentalmente (DANTAS-TORRES et al., 2010b).

A presença deste protozoário nestes ectoparasitos é esperada, já que os mesmos se alimentam do sangue do hospedeiro. Neste estudo houve o cuidado de se minimizar este efeito por meio da dissecação do carrapato no dia da colheita. Possivelmente, o tempo para o processamento e a dissecação dos artrópodes pode interferir nos resultados correspondentes à carga parasitária, uma vez que no caso do flebotomíneo a competência vetorial depende da habilidade dos parasitos sobreviverem à ação das proteases intestinais (KAMHAWI, 2006).

A susceptibilidade para a infecção dos carrapatos por *L. chagasi* foi comprovada, utilizando inoculação por via peritoneal e oral em hamsters (COUTINHO et al., 2005). Este achado assume particular importância quando se considera a possibilidade de caninos eventualmente ingerirem ectoparasitos, porém essa questão necessita ainda ser melhor esclarecida.

Para se confirmar o verdadeiro papel do *R. sanguineus* como um vetor da infecção por *L. chagasi*, é necessário estabelecer a capacidade deste suportar o crescimento, a multiplicação e a transmissão transestadial do referido protozoário (PAZ et al., 2010).

5 Conclusão

Por termos observado imunomarcações positivas pela técnica de IHQ, com utilização do anticorpo primário LPG, detectamos a presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. em órgãos de *R. sanguineus*.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processos: 2011/51113-4 e 2012/00266-8), pelo apoio financeiro concedido à pesquisa.

REFERÊNCIAS

ASSIS, R. R.; IBRAIN, I. C.; NOGUEIRA, P. M.; SOARES, R. P.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1820, p. 1354-1365, 2012.

CAMPOS, J. H. F.; COSTA, F. A. L. Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 56, n. 4, p. 297-300, 2014.

COLOMBO, F. A.; ODORIZZI, R. M. F. N.; LAURENTI, M. D.; GALATI, E. A. B.; CANAVEZ, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitol. Res.**, v. 109, p. 267-274, 2011.

COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; LEAL, G. G. A.; MOREIRA, N. D.; OLIVEIRA, L. A. M.; MACHADO, E. M. M.; MORAIS, M. H. F.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, A. A.; REIS, A. B. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral Leishmaniasis control program in Brazil and a new Proposal for Diagnosis. **Plos One**, v. 9, n.3, 2014.

COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 128, p. 149-155, 2005.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet. Parasitol.**, v. 147, p. 320-325, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Phlebotomidae) transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog? **Vet. Parasitol.**, v. 136, p. 379-380, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitol. Vectors**, v. 128, p.149-155, 2010.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806); from taxonomy to control. **Vet. Parasitol.**, v. 152, p. 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends Parasitol.**, v. 27, p. 155-159, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; MARTINS, T. F.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; LIMA, S. B.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. **Exp. Parasitol.**, v.125, p. 184-185, 2010b.

DANTAS-TORRES, F.; LORUSSO, V.; TESTINI, G.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; STANNECK, D.; MENCKE, N.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; ALVES, L. C.; OTRANTO D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitol. Res.** v.106, p. 857-860, 2010a.

DIAS, E. S.; REGINA-SILVA, S.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PAZ, G. F.; MICHALSKY, E. M.; ARAÚJO, S. C.; VALADÃO, J. L.; DE OLIVEIRA LARA-SILVA, F.; DE OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; FORTES-DIAS, C. L. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban área of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 176, n. 2-3, p. 101-111, 2010.

EDWARDS, K. T.; GODDARD, J.; VARELA-STOKES, A. S. Examination of the Internal Morphology of the Ixodid Tick, *Amblyomma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a “How-to” Pictorial Dissection Guide. **Midsouth Entomol.**, v. 2, p. 28-39, 2009.

FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F.; NASCIMENTO, L. D.; ABRANTES, T. R.; MOUTA-CONFORT, E.; PASSOS, S. R. L.; SCHUBACH, T. M. P. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.52, n. 4, p. 193-196, 2010.

FORESTIER, C. L.; GAO, Q.; BOONS, G. J. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? **Frontiers Cell. Infect. Microbiol.**, v. 4, n. 193, p. 1-7, 2015.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol.**, v. 22, p. 439-445, 2006.

LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F. A.; LUVIZZOTO, M. C. R.; FEITOSA, M. M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 485-489, 2003.

McCONVILLE, M.J.; BLACKWELL, J.M. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 15170-15179, 1991.

MICHALSKY, E. M.; FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; LARA E SILVA, F. O.; LOUREIRO, A. M.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 56-61, 2009.

MOODY, S. F.; HANDMAN, E.; McCONVILLE, M. J.; BACIC, A. The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 18457-18466, 1993.

MORAIS, R. C. S.; GONÇALVES, S. C.; COSTA, P. L.; SILVA, K. G.; SILVA, F. J.; SILVA, R. P.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; DANTAS-TORRES, F.; PAIVA-CAVALCANTI, M. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 59, p. 473-481, 2013.

NADERER, T.; VINCE, J. E.; McCONVILLE, M. J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Current Mol. Med.**, v. 4, p. 649-665, p. 2004.

OTRANTO, D.; PARADIES, P.; CAPRARIIS, D.; STANNECK, D.; TESTINI, G.; GRIMM, F.; DEPLAZES, P.; CAPELLI, G. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in na área where leishmaniasis is endemic. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, p. 337-343, 2009.

PAZ, G. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MICHALSKY, E. M.; LIMA, A. C. V. M. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; BARATA, R. A.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v. 106, p. 523-528, 2010.

PEROSSO, J.; SILVA, K. L. O.; FERREIRA, S. I. S.; AVANÇO, S. V.; SANTOS, P. S. P.; EUGÊNIO, F. R.; ALMEIDA, B. F. M.; LIMA, V. M. F. Alteration of FAS and s FAS ligand expression during canine visceral leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 205, p. 417-423, 2014.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; MÁRCIO, A. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 265-270, 2005.

SANTOS, J. M. L.; DANTAS-TORRES, F.; MATTOS, M. R. F.; LINO, F. R. L.; ANDRADE, L. S. S.; SOUZA, R. C. A.; BRITO, F. L. C.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; SIMÕES-MATTOS, L. Prevalência de anticorpos anti- *Leishmania* spp. em cães de Garanhuns, agreste de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, p. 41-45, 2010.

SOLANO-GALLEGO, L.; ROSSI, L.; SCROCCARO, A. M.; MONTARSI, F.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T.; TROTTA, M. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. **Parasit. Vectors**, v. 5, p. 98, 2012.

TROTTA, M.; NICETTO, M.; FOGLIAZZA, A.; MONTARSI, F.; CALDIN, M.; FURLANELLO, T.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 3, p. 293-296, 2012.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 65-94, 1992.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of control tropical disease. **Leishmaniasis control**. Geographical distribution. 2005. WHO/CTD. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/html/leisgeo.html>>. Acesso em 30 de abr. 2015.

WHO. World Health Organization, 2014. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/706/response-more/en/index.html>> Acesso em 03 maio 2015.