

LEISHMANIOSE CANINA

Novos Conceitos de Epidemiologia e Imunopatologia e seus Reflexos no Controlo da Leishmaniose Visceral Humana*

P. ABRANCHES, L. CAMPINO, G. M. SANTOS-GOMES

Centro de Malária e outras Doenças Tropicais. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Lisboa.

RESUMO

A Leishmaniose visceral é uma zoonose na maior parte das regiões onde ocorre e o cão é o seu mais importante reservatório, sendo o principal responsável pela persistência da infecção nas regiões Paleártica e Neotropical. A leishmaniose canina é uma infecção crónica, viscerocutânea, com pior prognóstico do que a doença humana. Actualmente sabe-se que, tal como acontece com a infecção humana, existem casos de parasitismo assintomático. Estudos feitos por xenodiagnóstico mostraram que a infecção do insecto vector pode ocorrer nas fases iniciais do doença, ao contrário do que se pensava alguns anos atrás. O animal reage com produção de grandes quantidades de anticorpos que não são protectores. A resistência está relacionada com a imunidade celular, encontrando-se respostas do tipo Th 1 em cães assintomáticos, por vezes sem anticorpos, o que indica que nos inquéritos parasitológicos feitos por pesquisa de anticorpos, a prevalência real da infecção pode estar subvalorizada.

SUMMARY

Canine Leishmaniasis New Concepts of Epidemiology and Immunopathology: Their Impact in the Control of Human Visceral Leishmaniasis

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis in most regions where it occurs. Dogs are the most important reservoir of the disease and are mainly responsible for the persistence of VL in the Palearctic and Neotropical regions. Canine leishmaniasis (CaL) is a viscerocutaneous, chronic infection with a worse prognosis than human disease. We now know that, as in man, there are some cases of asymptomatic infection. Former studies indicated that dog cutaneous parasitism becomes infectious to the insect vector in later periods of the disease, but recent studies performed by xenodiagnosis have shown that it is possible that transmission might occur earlier. The infected animal reacts with a great production of antibodies and depression of cellular immunity. Antibodies are not protective and resistance is related with active cellular immunity. The presence of Th 1 response in asymptomatic animals, sometimes without humoral response, means that the prevalence of CaL, found in epidemiological surveys by searching for antibodies, may be underestimated.

*Trabalho apoiado pelo programa INCO-DC, contrato IC 18-CT95-0023

A leishmaniose visceral (LV), ou kala-azar, é uma zoonose em todas as regiões em que *Leishmania (L.) infantum* é a espécie responsável pela infecção e é uma antroponose nas áreas de influência de *L. (L.) donovani*. Apenas na África Oriental, em que a situação é muito complexa, não há claramente uma distinção entre zoonose e antroponose ligada às espécies em causa¹. O cão é o mais importante reservatório da LV zoonótica e é o principal responsável pela sua persistência nas regiões Paleártica e Neotropical. Mais uma vez a África Oriental é uma excepção, pois aqui, mesmo nas áreas de zoonose, o cão não é reservatório ou a sua importância é mínima².

Quando o nosso objectivo é controlar a LV humana numa zona endémica em que o reservatório é o cão, este animal deverá ser o alvo da vacina e por esta razão usado como modelo experimental. Com efeito, já se verificou, em certas áreas endémicas, o quase completo desaparecimento da LV humana após redução a um valor mínimo, da incidência da leishmaniose canina (LCa), por destruição do reservatório canino³.

A tarefa de controlar a infecção humana nas áreas de antroponose é muito mais árdua já que o homem é o próprio reservatório, como acontece no subcontinente indiano, e uma vacina preparada para ser aplicada ao homem requiere exigências maiores do que as que têm como objectivo a indução de resistência à infecção num animal.

Neste texto vamos-nos ocupar exclusivamente dos problemas ligados à leishmaniose canina.

EPIDEMIOLOGIA

Os conceitos que acabamos de expor levam-nos a duas condicionantes:

1 - A primeira refere-se à conveniência da utilização, na experimentação laboratorial, da espécie em causa, *L. infantum* e não de *L. donovani* que é responsável pelo kala-azar nas áreas de antroponose;

2 - A segunda refere-se ao facto de poder haver grandes diferenças na susceptibilidade à infecção entre as diversas raças caninas e mesmo de animal para animal, reflectindo, provavelmente, as características genéticas e o estado nutricional e imunológico do hospedeiro. Na nossa experiência o Pastor Alemão e o Doberman são as raças que parecem mais susceptíveis⁴, enquanto que, na experiência de Ranque et al.⁵ essas raças são o Pastor Alemão (mais uma vez) e o Boxer. Deveríamos assim utilizar, em experimentação, no que diz respeito à raça, uma amostra que fosse representativa da população que se pretende vacinar. Em Portugal, por exemplo, teríamos de usar o cão misto que constitui cerca de 77 % da população canina do país, o que, no

entanto, não é permitido por lei.

Leishmania infantum zimodeme MON-1 é o mais comum agente da LV humana e da LCa mas enquanto no homem é relativamente frequente o achado de outros zimodemes de *L. infantum*, quase sempre associados com formas clínicas cutâneas ou viscerais no imunodeprimido⁶, no cão o aparecimento de outros zimodemes é bastante mais raro. As excepções são o zimodeme MON-72 que se tem observado com muita frequência em Campania, Itália, tanto em casos de leishmaniose cutânea humana como de LCa⁷ e ainda os zimodemes MON-34 e MON-77, ambos encontrados em Cabília, Argélia⁸. Este último também foi isolado na Catalunha, Espanha num cão simultaneamente parasitado pelo zimodeme MON-1A.

Isto significa que o cão é o reservatório de *L. infantum* zimodeme MON-1 e talvez, em Campania, Itália, do zimodeme MON-72, não se sabendo quais são os reservatórios dos restantes zimodemes de *L. infantum*.

O cão é considerado um bom reservatório do parasita responsável pela LV uma vez que se verifica haver sobreposição do habitat do homem e do cão e frequente contacto com flebótomos zoo-antropofílicos; a forma de parasitismo, viscerocutânea, associada a elevadas taxas de infecção, é favorável à transmissão pela picada do insecto; além disso a LCa é uma doença de evolução crónica, pelo que nas áreas endémicas em que a transmissão não é contínua a infecção do cão pode persistir de uma época de transmissão até à seguinte.

IMUNOPATOLOGIA

A LCa tem algumas semelhanças com a LV humana mas sob o ponto de vista clínico/epidemiológico há três diferenças fundamentais: a cronicidade que inclui um período prè-patente prolongado, o parasitismo viscerocutâneo (o que torna incorrecta a designação de LV quando referente ao cão) e o seu pior prognóstico.

Os animais infectados reagem com produção de anticorpos e depressão da imunidade celular¹⁰⁻¹². Os anticorpos aparecem precocemente no sangue circulante e são produzidos em grande quantidade⁴. Em condições experimentais Lanotte et al.¹³ encontraram anticorpos quatro dias após a infecção e na nossa experiência alguns dos animais inoculados mostraram anticorpos doze dias após a infecção (resultados não publicados). Os anticorpos podem atingir títulos muito elevados, em geral superiores aos que se encontram na leishmaniose humana; os títulos máximos que observamos com a reacção de imunofluorescência indirecta, no cão, foi de 1/8.192, tanto na infecção natural como na experimental, mas ou-

tros autores, como Lanotte et al.¹³ encontraram títulos muito mais elevados, de 1/81.920.

Os anticorpos não são protectores, eles aumentam durante a progressão da infecção e estabilizam ou diminuem quando a resistência aparece, a qual está relacionada com a imunidade celular activa^{14,15}. Este facto pode ser provado pela presença de respostas proliferativas das células T aos antígenos específicos em cães assintomáticos com resposta imunológica do tipo Th 1. Nestes animais verifica-se uma elevada produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ , em comparação com cães com sintomas de doença, nos quais, em geral, a proliferação linfocitária antígeno-específica está deprimida, como foi verificado por Pinelli et al.^{12,16}. Também foi observado que nos animais assintomáticos com resposta de tipo Th 1 se verificava um aumento da população de linfócitos T citotóxicos específicos antileishmania¹⁶. Nestes estudos experimentais verificou-se que, *in vivo*, os macrófagos activados produziam óxido nítrico, molécula que está envolvida na actividade antileishmania destas células. A caracterização das citocinas produzidas na resposta de tipo Th 2, na leishmaniose canina, tem-se revelado mais difícil¹⁶. A resposta linfoproliferativa em cães assintomáticos tem sido observada em animais nos quais não se encontram anticorpos, indicando que a prevalência da LCa obtida nos inquéritos epidemiológicos pelas técnicas de pesquisa e quantificação de anticorpos pode estar subvalorizada¹⁷.

Deste modo verifica-se que a resposta imunológica na leishmaniose canina não é muito diferente da que se observa na leishmaniose visceral humana; as diferenças situam-se ao nível da duração da doença (quando esta se instala) e na má resposta ao tratamento, na LCa. Em ambos os casos as razões são obscuras.

Estes novos conhecimentos põem fim, a nosso ver, a um período empírico de ensaio sobre vacinas contra a leishmaniose canina, em que se verificou que os animais inoculados com produtos vacinais revelaram maior susceptibilidade à infecção por *L. infantum* do que o grupo controlo de não vacinados¹⁸. Sabendo-se, actualmente, que um de dois tipos de resposta imunológica, Th 1 (favorável à resistência) ou Th 2 (desfavorável à resistência), podem ser desencadeados no cão parasitado, qualquer produto candidato a vacina não pode ser utilizado num ensaio de protecção sem prévia determinação do tipo de resposta imunológica celular que desencadeia.

NOVOS CONCEITOS SOBRE INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA E TRANSMISSÃO

Na actualidade colocam-se alguns problemas da máxima importância, sob o ponto de vista ecológico, ainda

não totalmente esclarecidos e que são os seguintes:

1 - Haverá um número significativo de animais com infecção assintomática e que não evoluem para a doença, podendo por isso ser considerados como portadores sãos?

2 - Poderá o cão assintomático ser infectante para o flebótomo?

Até há pouco tempo pensava-se que quase todas as situações de infecção latente seriam pré-clínicas, evoluindo, mais tarde ou mais cedo, para a doença¹³. Por outro lado pensava-se que os flebotomos só se infectariam em taxas significativas quando se alimentassem em animais com sinais clínicos^{13,19}.

No entanto, estudos recentes parecem apontar para respostas positivas a ambas as perguntas.

A existência de um longo período assintomático na leishmaniose canina é um facto assente e em quase todos os inquéritos epidemiológicos se encontram elevadas taxas de animais com valores significativos de anticorpos, sem qualquer sintomatologia aparente. Num inquérito que realizámos em 1.823 cães de uma área endémica situada na Região Metropolitana de Lisboa a percentagem observada de animais sem sintomatologia clínica mas com títulos significativos de anticorpos pela reacção de imunofluorescência indirecta, foi de 53.8%⁴. Por outro lado, Berrahal et al.²⁰, em 30 cães aparentemente saudáveis, da região endémica de Marselha, encontraram anticorpos antileishmania, pela técnica de western-blot, em 66% dos casos.

Para justificar a resposta à segunda pergunta citam-se, a título de exemplo, duas experiências. Molina et al.²¹, por meio do xenodiagnóstico obtiveram três resultados positivos em cinco cães em fase assintomática do seu parasitismo. Berrahal et al.²⁰, utilizando a técnica de PCR obtiveram nove testes positivos em amostras de pele de 14 animais aparentemente sãos, vivendo numa zona endémica. Na nossa experiência, tanto na infecção natural⁴ como na experimental¹⁰, a presença de amastigotas na pele de cães com leishmaniose constituiu uma raridade, contrastando com a relativa frequência do seu achado nos gânglios linfáticos e medula óssea. A utilização da técnica de PCR poderá fornecer novos dados e assim clarificar estes conceitos.

Os resultados aqui referidos parecem indicar, portanto, que deverá haver, nas áreas endémicas de leishmaniose canina, um número significativo de portadores sãos que não evoluem para a doença mas que serão, eventualmente, transmissores do parasita ao insecto vector. Podemos, então, inferir da existência de:

1 - Elevadas taxas de cães assintomáticos com títulos

significativos de anticorpos, encontradas em inquéritos epidemiológicos, sobretudo quando se começaram a usar técnicas particularmente sensíveis, como o western-blot;

2 - Situações de proliferação linfocitária antigénio-específica em animais assintomáticos, sem produção ou com valores muito baixos de anticorpos;

3- Provas da presença do parasita na pele de animais assintomáticos, por xenodiagnóstico ou quando se utilizam técnicas de biologia molecular.

Se a maior parte dos animais assintomáticos com títulos significativos de anticorpos, evoluisse para a doença, então as taxas de animais doentes encontrados em zona endémica teriam de ser muito mais elevadas do que as que habitualmente se encontram. Prova-se, assim, a existência de taxas elevadas de cães portadores sãos, em zona endémica, contribuindo, pelo menos parcialmente, para a transmissão. Deste modo, o risco de transmissão de *L. infantum* ao homem, nas áreas de zoonose canina onde existam vectores zoo-antropofílicos, é, provavelmente, maior do que se pensava até há pouco tempo. O que acontece é que na maior parte dos casos em que há transmissão ao homem a infecção mantém-se assintomática²²⁻²⁴. Isto está provado em várias regiões do mundo onde se tem verificado, em situações de imunodeficiência - não atribuíveis a contaminação através de seringas e agulhas infectadas, própria dos utilizadores de drogas injectáveis - reactivações tardias de LV adquirida na infância, em indivíduos vivendo fora de zonas endémicas²⁵⁻²⁷. Em Portugal também deverão ser frequentes as infecções assintomáticas na região do Alto-Douro, mais propriamente no concelho de Alijó, onde encontramos 11% de indivíduos, parte deles adultos, com títulos baixos de anticorpos antileishmania, sem qualquer sintomatologia de leishmaniose, nem história de infecção em criança, o que significa contactos anteriores com o parasita²⁴. Com efeito, segundo Kellina²⁸, o achado de títulos baixos de anticorpos, em zona endémica, tem significado epidemiológico, indicando contactos com *Leishmania*.

O espontâneo desenvolvimento de resistência em cães infectados é um acontecimento encorajador para a continuação de estudos sobre vacinas contra a leishmaniose canina, vacinas que indirectamente poderão contribuir para o controlo da leishmaniose visceral humana.

BIBLIOGRAFIA

- DEDET JP: Epidémiologie mondiale de la leishmaniose viscérale. *Méd Mal Infect* 1994; 24: 562-565.
- ASHFORD RW, BETTINI S: Ecology and epidemiology: Old World. In: Peters W, Killick-Kendrick R eds. *The leishmaniases in Biology and Medicine*. London: Academic Press 1987:366-413.
- HOARE CA: Reservoir hosts and natural foci of human protozoal infections. *Acta Trop* 1962; 19:281-317.
- ABRANCHES P, SILVA-PEREIRA MCD, CONCEIÇÃO-SILVA FM, SANTOS-GOMES GM, JANZ JG: Canine Leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 1991; 77:557-561.
- RANQUE J, QUILICI M, DUNAN S: Les Leishmanioses du Sud-Est de la France. Écologie-Épidémiologie- Prophylaxie. *Acta Trop* 1975; 32:371-380.
- PRATLONG F, DEDET J P, MARTY P, et al.: Human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J Inf Dis* 1995; 172: 323-326.
- MAROLI M, GRAMICCIA M, GRADONI L, TROIANI M, ASCIONE R: Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* with MON-72 zymodeme of *Leishmania infantum* in Campania region of Italy. *Acta Trop* 1994; 57:333-335.
- HARRAT Z, PRATLONG F, BELAZZOUG S, et al.: *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90:625-629.
- PRATLONG F, PORTUS M, RISPAIL P, MORENO G, BASTIEN P, RIOUX JA: Présence simultanée chez le chien de deux zymodèmes du complexe *Leishmania infantum*. *Ann Par Hum Comp* 1989; 64:312-314.
- ABRANCHES P, SANTOS-GOMES G, RACHAMIM N, CAMPINO L, SCHNUR LF, JAFFE CL: An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1991; 13:537-550.
- MARTÍNEZ-MORENO A, MARTÍNEZ-CRUZ MS, BLANCO A, HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ S: Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 1993; 51:49-59.
- PINELLI H, KILLICK-KENDRICK R, WAGENAAR J, BERNARDINA W, REAL G., RUITENBERG J: Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Inf Immunol* 1994; 62:229-235.
- LANOTTE G, RIOUX JA, PERIERES J, VOLLHARDT Y: Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann Par Hum Comp* 1979; 54: 277-295.
- LIEW FY, O'DONNELL CA: Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 1993; 32:161- 259.
- KILLICK-KENDRICK R, KILLICK-KENDRICK M, PINELLI E., et al: A Laboratory Model of Canine Leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite* 1994; 1:311-318.
- PINELLI E, GONZALO R, BOOG C et al.: *Leishmania infantum* specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol* 1995; 25:1594-1600.
- CABRAL M, O'GRADY, ALEXANDER J: Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs in Oporto, Portugal. *Par Immunol* 1992; 14:531-539.
- DUNAN S, FROMMEL D, MONJOUR L et al.: Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Par Immunol* 1989; 11:397.
- RIOUX JA, LANOTTE G, CROSET H, DEDET JP: Écologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 5. Pouvoir infestant comparé des diverses formes de Leishmaniose canine vis-à-vis de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann Par Hum Comp* 1972; 47:413-419.
- BERRAHAL F, MARY C, ROZE M, et al.: Canine Leishmaniasis: Identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55:273-277.
- MOLINA R, AMELA C, NIETO J, et al.: Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88:491-493.
- BADARÓ R, JONES TC, LORENÇO R, et al.: A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Inf Dis* 1986; 154:639-649.

23. ALVAR J, GUTIERREZ-SOLAR B, MOLINA R, et al.: Prevalence of *Leishmania* infection among AIDS patients. *Lancet* 1992; 339:1427.
24. ABRANCHES P, SAMPAIO-SILVA ML, SANTOS-GOMES GM, et al.: Kala-Azar in Portugal. VII. Epidemiological survey in Alijo (Endemic Region of Alto-Douro). *Res Rev Parasitol* 1993; 52:121-124.
25. BADARÓ R, CARVALHO EM, ROCHA H, QUEIROZ AC, JONES TC: *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet* 1986; 1:647-649.
26. DATRY A, SIMILOWSKI T, JAIS P et al.: AIDS- associated leishmaniasis: an unusual gastroduodenal presentation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84:239-240.
27. CABIÉ A, MATHERON S, LEPRÈTRE A, BOUCHAUD O, DELUOL AM, COULAUD JP: Leishmaniose viscérale au cours de l'infection par le VIH. Une infection opportuniste à part entière. *Presse Méd* 1992; 21:1658-1662.
28. KELLINA OI: Problem and current lines in investigations on the epidemiology of leishmaniasis and its control in the U.S.S.R. *Bull Soc Path Exot* 1981; 74:306-318.