

Трансмиссионный потенциал, кожная воспалительная реакция и паразитарная нагрузка у собак с клинической и бессимптомной формой висцерального лейшманиоза

B. L. A. Verçosa¹, C. M. Lemos¹, I. L. Mendonça¹, S. M. M. S. Silva¹,
S. M. de Carvalho¹, H. Goto² and F. A. L. Costa¹

ВВЕДЕНИЕ

Висцеральный лейшманиоз в Бразилии вызывается простейшим *Leishmania chagasi/infantum*, которое переносится москитами рода *Lutzomyia*. Собаки являются важным естественным резервуаром инфекции, и контроль за распространением висцерального лейшманиоза (ВЛ) у людей включает в себя уничтожение инфицированных собак. Однако, хотя собаки считаются важным звеном трансмиссивного цикла лейшманиоза, выявлению инфицированных собак, являющихся непосредственной угрозой трансмиссии, уделялось недостаточно внимания. Поскольку лечить инфицированных собак невозможно, при постановке диагноза ВЛ их усыпляют, что трудно выполнимо в высоко эндемичных регионах. Для контроля за распространением ВЛ в таких регионах очень важно установить критерии, которые упростили бы выявление резервуаров, представляющих непосредственный риск трансмиссии. Целью настоящего исследования стал поиск таких клинических критериев, подкрепленных патологоанато-

мическими данными, которые были бы характерны для собак, потенциально опасных в плане переноса лейшманиоза.

РЕЗУЛЬТАТЫ

К основным клиническим проявлениям висцерального лейшманиоза у собак из эндемичных регионов относятся онихогрифоз, кожные язвы, конъюнктивит, лимфаденопатия и потеря веса. Трансмиссионный потенциал (вероятность передачи паразита переносчику) этих собак был измерен с помощью ксенодиагностики посредством москитов *Lutzomyia longipalpis*. Шесть из девяти собак с клиническими проявлениями оказались заразными для *Lutzomyia longipalpis*, тогда как среди пяти собак с бессимптомным течением ни одна не оказалась заразной. Амастиготы лейшманий (безжгутиковая форма – Прим. ред.) присутствовали в коже всех собак с клинической формой, но отсутствовали у собак с бессимптомным течением. Наибольшая концентрация паразитов наблюдалась

в ухе и в области когтей, самая низкая – в коже живота. Воспалительный инфильтрат был наиболее выраженным на ушах и в области когтей как при клинической, так и при бессимптомной форме. У собак с клинической формой ВЛ, у которых амастигот лейшманиоза обнаруживалось мало или не было вообще, воспалительный инфильтрат состоял в основном из лимфоцитов и макрофагов. При высоких концентрациях паразитов помимо лимфоцитов и макрофагов наблюдалось большое количество нейтрофилов.

ВЫВОДЫ

Для собак, представляющих непосредственный риск трансмиссии лейшманиоза в эндемичных регионах, характерны такие клинические проявления, как онихогрифоз, кожные язвы, конъюнктивит, лимфаденопатия и потеря веса. Лимфаденопатия, в частности, была достоверным клиническим критерием, так как имела четкую связь с положительной ксенодиагностикой.

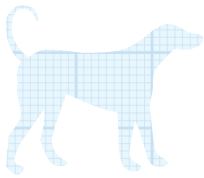
ВВЕДЕНИЕ

Висцеральный лейшманиоз в Бразилии вызывается простейшим *Leishmania chagasi* (в Европе принято название *L. infantum* – Прим. ред.), которое переносится москитами *Lutzomyia longipalpis* [1]. Собака считается основным домашним естественным резервуаром лейшманиоза, потому что носит большое количество паразитов в коже, что способствует легкой передаче лейшманиоза москитам [2–4]. В связи с этим именно на собак направлены меры по обеспечению контроля за передачей лейшманиоза человеку, и важнейшей из них становится выявление инфицированных собак, которые представляют непосредственный риск передачи паразита, – вопрос, заслуживающий тщательного изучения. В настоящем исследовании мы проанализировали клинические проявления как критерии, которые могут свидетельствовать о непосредственном риске трансмиссии.

Хотя от 67% до 80% животных в эндемичных регионах контактируют с паразитом, что подтверждается или присутствием антител к лейшманиозу, или наличием специфического клеточного иммунного ответа, или выявлением относящихся к лейшманиозу продуктов методом ПЦР, многие из этих животных не имеют клинических проявлений [5–7]. К тому же у некоторых собак наблюдаются симптомы, встречающиеся при других заболеваниях, что размывает диагностику ВЛ [8, 9]. Поскольку лечить инфицированных собак невозможно, при установлении диагноза ВЛ их усыпляют, что особенно трудно выполнимо именно в высоко эндемичных регионах. Известно, что только некоторые из инфицированных собак эффективно передают заболевание, что степень заселения кожи паразитами (паразитарная нагрузка) различается в зависимости от фазы инфекции и, похоже, она не коррелирует с трансмиссионным

¹ Отделение Клиники ветеринарной хирургии Центра аграрных наук Федерального университета Пиауи, Терезина, Бразилия

² Кафедра профилактической медицины медицинского факультета Института тропической медицины Сан-Паулу Университета Сан-Паулу, Сан-Паулу, Бразилия



ПАРАЗИТОЛОГИЯ

потенциалом [4, 10, 11]. Данные относительно трансмиссионного потенциала собак с клинической и бессимптомной формами противоречивы, возможно, в связи с разными видами лейшманий и географическими различиями. Исследование, проведенное в Испании, не выявило никакой корреляции, тогда как бразильские и колумбийские исследователи выявили положительную корреляцию между наличием симптомов и инфекционностью [4, 12, 13]. В эксперименте с собаками, зараженными *L. chagasi* или *L. donovani*, переносчик чаще инфицировался при укусах собак с более поздней стадией заболевания [14]. Исходя из этого, целью настоящего исследования было определение клинических критериев, подкрепленных патологоанатомическими данными, которые характерны для собак, потенциально способных передать паразита переносчику в эндемичных регионах Бразилии. Мы изучили клинические проявления, кожный воспалительный процесс, паразитарную нагрузку и, с помощью ксенодиагностики, трансмиссионный потенциал собак с висцеральным лейшманиозом.

Методы

Подбор животных и диагностика ВЛ

В исследование были включены 28 собак, как домашних, так и бродячих, из эндемичного региона Терезины, штат Пиауи, Бразилия. Взрослые кобели и суки разного возраста и породы, выбранные случайным образом, прошли серологическое обследование на лейшманиоз (что является обязательным в эндемичных по лейшманиозу районах) в рамках эпидемиологического исследования, выполненного Центром по контролю над зоонозными инфекциями. Диагноз ВЛ подтверждался позитивным результатом исследования на антилейшманиозные антитела в со-

четании с выявлением паразита. Для выявления антилейшманиозных антител в сыворотке использовалась реакция непрямой иммуофлюоресценции или иммуоферментный анализ. Для обнаружения лейшманий мы изучали мазки кожи, селезенки и подколенных лимфатических узлов, окрашенные по Романовскому–Гимзе, или выполняли посев материала из костного мозга грудины, селезенки и/или подколенных лимфатических узлов (или все одновременно) на среду NNN (SIGMA-ALDRICH). Животные были распределены в три группы: I – 12 инфицированных собак с клиническими симптомами заболевания, II – 11 инфицированных собак без клинических симптомов, III (группа контроля) – пять серологически и паразитологически негативных собак. Собаки считались имеющими клиническую форму, если присутствовал хотя бы один из следующих признаков: онихогрифоз, изъязвления кожи, потеря веса, местная или генерализованная лимфаденопатия, диарея, эпистаксис (носовое кровотечение – *Прим. ред.*), конъюнктивит, анорексия и лихорадка. Бессимптомные собаки не имели клинических проявлений ВЛ, но были признаны инфицированными по результатам серологического и паразитологического исследований. Критерии, использованные для разделения собак с клинической и бессимптомной формой, были основаны на классификации, предложенной Pozio с соавт. [15].

Была проведена диагностика анемии, чтобы адекватно оценить цвет слизистых при вскрытии. Слизистые глаз, пасти и/или крайней плоти и влагаллища у инфицированных собак были значительно интенсивнее окрашены, чем у неинфицированных. Бледные слизистые расценивались как анемия, принимая в расчет возможность трупного гипостаза.

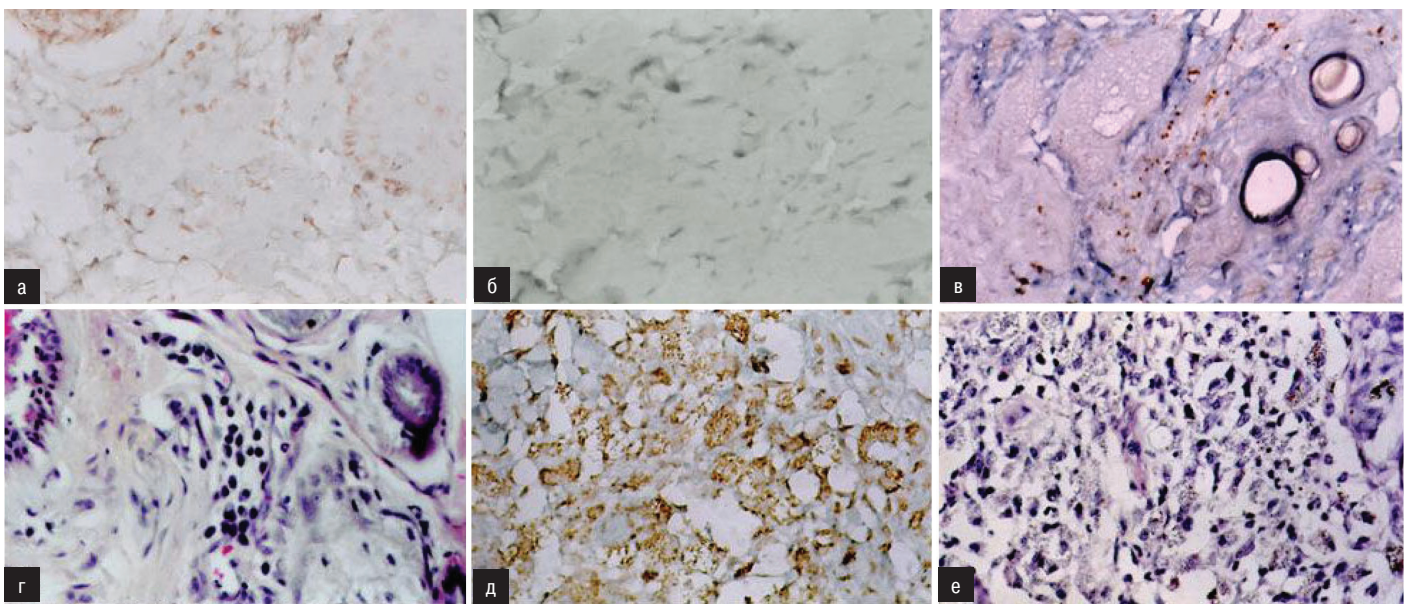


Рис. 1. Кожа. Собаки, заразившиеся *L. chagasi* естественным путем (а, в, г, д, е), и неинфицированная собака (б).

а) отсутствие амастигот в коже уха бессимптомной собаки; б) отсутствие амастигот в коже уха контрольной собаки; в) наличие нескольких амастигот в коже с минимальным воспалительным инфильтратом; г) минимальный воспалительный инфильтрат, состоящий из лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов; д) наличие множества паразитов в коже с выраженным воспалением; е) выраженный воспалительный инфильтрат, состоящий из макрофагов и нейтрофилов. Иммунопероксидазное окрашивание (а, б, в, д). Окрашивание гематоксилин-эозином (г, е). Увеличение: $\times 140$.

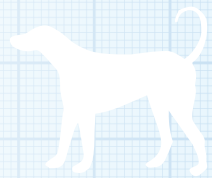


Рис. 2. Кожа. Собаки, заразившиеся *L. chagasi* естественным путем.

а) полуколичественный анализ паразитарной нагрузки (средние значения и 25–75-центильный интервал) собак с клиническим и бессимптомным течением ВЛ и контрольных собак; * $p < 0,05$ (критерии Краскела–Уоллиса и Стьюдента–Ньюмена–Келса); б) полуколичественный анализ воспалительного инфильтрата в коже (средние значения и 25–75-центильный интервал) собак с клиническим и бессимптомным течением ВЛ и контрольных собак; * $p < 0,05$ (критерии Краскела–Уоллиса и Данна). в) корреляция между наличием амастигот и воспалительным инфильтратом у собак с клинической формой ВЛ. $P < 0,05$ (корреляция Спирмена). N – число животных в группе.

Ксенодиагностика

У девяти собак с симптомами и у пяти бессимптомных собак перед их усыплением для сбора образцов ткани была проведена ксенодиагностика. Вкратце, собаки были анестезированы 1% ацепромазином (0,25 мг/кг; Асерган, Univet), и 60 самок москитов *Lutzomyia longipalpis* были допущены к кормлению на коже уха в течение 45 минут. Через пять дней после кормления москиты были рассечены, и средняя кишка была извлечена с целью обнаружения промастигот.

Цитологическое и гистопатологическое исследования кожи

Все животные получили седацию 1% ацепромазином (0,01 мл/кг) с ксилазином (2 мг/кг; Rompum, Bayer) и анестезию 2,5% тиопенталом натрия (0,5 мг/кг). Образцы кожи забирали билатерально со следующих мест: морда, веко, ухо, запястья, область когтей передних конечностей, спина, область когтей задних конечностей, плюсны, хвост, живот и мошонка. Срезы были окрашены по Романовскому–Гимзе, а образцы тканей зафиксированы в формалине и пропитаны парафином для гистопатологического и иммуногистохимического исследований. После сбора образцов собаки были убиты повышенной дозой тиопентала натрия. Все зараженные лейшманией собаки были рутинно усыплены в Центре по контролю за зоонозными инфекциями с целью ограничения распространения ВЛ. Неинфицированные контрольные животные были бродячими собаками, пойманными и усыпленными с целью ограничения распространения бешенства. Все манипуляции с собаками были проведены в соответствии с Бразильским руководством по уходу за лабораторными животными и их использованию (Projeto de lei 3.964/97), а все использованные протоколы экспериментов были одобрены Этическим комитетом Федерального университета Пиауи.

Гистопатологические изменения кожи изучались во всех образцах из 22 разных участков кожи, и их выраженность была оценена полуколичественно вслепую двумя независимыми исследователями по шкале от 0 до 4; средние значения вычислялись после оценки и сравнения всех образцов.

Оценка паразитарной нагрузки

Паразитарная нагрузка устанавливалась по цитологическим препаратам, окрашенным по Романовскому–Гимзе, и срезам тканей, окрашенным иммунопероксидазой, из 22 различных мест с каждого животного в поле 50×100 квадратов с сеткой 10 мм^2 . Иммуногистохимическое определение антигена к лейшмании производилось по описанной прежде методике с применением поликлональных антител к *L. amazonensis*, полученных в Лаборатории сероэпидемиологии и иммунобиологии Института тропических болезней Университета Сан-Паулу [16]. Вкратце, антитела были получены из мышей линии BALB/с, зараженных амастиготами *L. amazonensis*, а затем опробованы на зафиксированных в формалине и пропитанных парафином препаратах печени хомяка, зараженного *L. chagasi* (позитивный контроль). Специфичность была подтверждена на тех же препаратах с использованием сыворотки, адсорбированной с промастиготами *L. amazonensis*: реакция была отрицательной. Сыворотка была разведена в фосфатно-солевом буфере в объемной концентрации 1:1600 и оставлена реагировать в течение ночи при 4°C во влажной атмосфере.

Образцы были оценены с использованием чувствительной пероксидазной системы EnVision+ (Dako Corporation, Карпинтерия, США) согласно протоколам, предоставленным изготовителем.

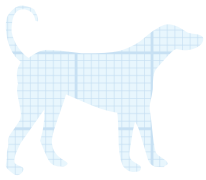
Статистическая обработка

Данные были проанализированы с использованием корреляции Спирмена или точного непараметрического критерия Фишера и критерия Краскела–Уоллиса. Параметры со значимыми различиями впоследствии были проанализированы с помощью критериев Стьюдента–Ньюмана–Келса или Данна для множественного сравнения групп. Значимыми мы считали результаты с $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У всех собак, кроме контрольной группы, висцеральный лейшманиоз был подтвержден серологически и паразитологически.

Выявление собак с ВЛ в эндемичных районах затруднено, потому что клинические проявления сильно варьируют и зачастую похожи на симптомы других заболеваний [8, 9]. По ре-



• ПАРАЗИТОЛОГИЯ

зультатам нашего исследования обнаружилось, что наиболее частыми проявлениями были онихогрифоз (83,3%), кожные язвы (83,3%), конъюнктивит (75%), локальная или генерализованная лимфаденопатия (66,6%) и потеря веса (58,3%). Поскольку у собак, имевших эти симптомы в том или ином количестве и сочетании, диагноз ВЛ был подтвержден, мы считаем их клиническими критериями висцерального лейшманиоза. Однако в группе из 35 собак, которых мы исследовали ранее, две из 16 собак с одним или двумя симптомами оказались паразитологически негативными. В связи с этим мы полагаем, что только один или два симптома несущественны, но три уже позволяют заподозрить наличие ВЛ, а пять веско указывают на этот диагноз. Такие клинические критерии позволяют быстро выявлять собак с висцеральным лейшманиозом в эндемичных регионах.

Для анализа трансмиссионного потенциала исследованных собак выполнялась ксенодиагностика. Ухо для этих целей было выбрано потому, что на нем отмечалась наиболее высокая концентрация паразитов. Из 12 собак с клиническими проявлениями ксенодиагностика проводилась у девяти. Шесть из них передали паразита *L. longipalpis*, тогда как среди бессимптомных собак ни одна не была заразна для москита. Эти данные позволяют предположить, что собаки с клиническими проявлениями представляют реальную угрозу трансмиссии ($p = 0,0310$, точный критерий Фишера), что подтверждается схожими результатами других исследований с использованием *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia youngi* и *Phlebotomus perniciosus* [4, 11]. Более раннее исследование показало, что у потенциально заразных собак имеется по крайней мере один из основных клинических симптомов [13]. Больше того, в двух других исследованиях бессимптомные собаки также оказались неспособны передавать лейшманию москитам. В одном отсутствие паразитов в коже было подтверждено ПЦР, в другом – иммуногистохимией [4, 10]. С другой стороны, бессимптомные собаки из эндемичных районов Испании эффективно передавали *L. infantum* москиту *Phlebotomus perniciosus* [12]. Разница в данных, полученных исследователями в Средиземноморье и Южной Америке, может быть связана с различными штаммами лейшмании и разными видами переносчиков. В частности, известно, что *Phlebotomus perniciosus* – более эффективный переносчик висцеротропной лейшмании, чем *Lutzomyia longipalpis* [4].

Паразитарная нагрузка в коже оценивалась в 22 различных участках тела собак с ВЛ. Наибольшее обсеменение паразитами наблюдалось на ухе и в области когтей, а наименьшая концентрация отмечалась в коже живота. Образцы окрашивались разными методами. У собак с клиническими проявлениями амастиготы обнаруживались по крайней мере в одном из участков, и их наличие всегда сочеталось с воспалительным процессом. У бессимптомных (рис. 1а) и контрольных собак (рис. 1б) ни в одном участке амастигот не наблюдалось. Паразитарная нагрузка у собак с симптомами была выше, чем у бессимптомных ($P < 0,05$, критерии Краскела–Уоллиса и Стьюдента–Ньюмана–Келса) (рис. 2а).

Среди 12 собак с симптомами у 10 наблюдалось изъязвление кожи. Однако воспалительный инфильтрат в коже отмечался у всех собак, даже бессимптомных, но был более выражен у собак с клиническими проявлениями, чем у бессим-

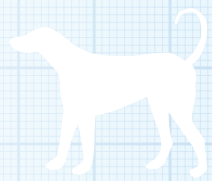
птомных и контрольных собак ($p = 0,006$, критерии Краскела–Уоллиса и Стьюдента–Ньюмана–Келса) (рис. 2б). Ранее описаны похожие результаты у собак, инфицированных *L. infantum* [10]. Хотя воспаление кожи это распространенная находка у собак из-за укусов москитов, травм и других паразитов, наши данные демонстрируют минимальную интенсивность воспалительного инфильтрата в отсутствие амастигот в коже бессимптомных и контрольных собак и корреляцию между числом амастигот и выраженностью воспаления ($R = 0,64$; $P < 0,05$, корреляция Спирмена) (рис. 2с). Это позволяет предположить, что у собак с клиническими проявлениями язвы с высокой вероятностью связаны с ВЛ [17–19].

При наличии небольшого количества или отсутствии амастигот (рис. 1в) у собак с клиническим течением лейшманиоза воспалительный инфильтрат состоял в основном из лимфоцитов и макрофагов (рис. 1г). При высокой концентрации паразитов (рис. 1д) в инфильтрате также были представлены лимфоциты и макрофаги, но в основном он состоял из нейтрофилов (рис. 1е). У двух собак воспалительный паттерн был представлен мноморфным макрофагальным инфильтратом с большим количеством паразитов (рис. 1д), как в исследовании dos Santos с соавт. [17]. Выраженный воспалительный инфильтрат, состоящий из лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов, связан с высокой паразитарной нагрузкой и отличается от гистопатологической картины, наблюдаемой при каждом лейшманиозе. Для последнего характерно нарушение клеточного иммунитета, при котором в инфильтрате преобладают наполненные лейшманиями макрофаги, а лимфоциты малочисленны [20]. У бессимптомных собак воспалительный инфильтрат состоял в основном из макрофагов и лимфоцитов; похожая картина наблюдалась у контрольных собак. Характеристики воспалительного инфильтрата у собак с клиническими проявлениями с низкой паразитарной нагрузкой и отсутствие амастигот у бессимптомных собак позволяют предположить, что эти животные иммунокомпетентны и, следовательно, могут длительно контролировать инфекцию.

У десяти собак с клиническим и у четырех с бессимптомным течением по крайней мере в одном участке также наблюдался гранулематозный инфильтрат. Поскольку наличие гранулем было связано с низкой или отсутствующей паразитарной нагрузкой в коже четырех бессимптомных собак, оно, видимо, связано с защитным механизмом в ткани. Роль гранулематозной реакции в защите от лейшманиозной инфекции была хорошо изучена на мышах линии BALB/c и на хомяке, зараженных *Leishmania donovani* [21–23]. Защита от инфекции с помощью гранулематозной реакции зависит от цитокинов, вырабатываемых клетками воспаления, в основном от интерферона- γ и ИЛ-2 [24].

Такой критерий воспалительного процесса, как наличие нейтрофилов, похоже, характерен для высокой паразитарной нагрузки. Этот критерий можно использовать для быстрой диагностики, забирая для исследования образцы кожи уха.

Хотя наличие лейшманий в коже собак с ВЛ представляет важным для передачи паразита москиту, окончательно не ясно, передаются ли паразиты из кожи или капиллярной крови в процессе кровососания. Если последнее, то наличие паразитов в коже и более выраженное воспаление просто служат индикатором, что паразиты попадают в кожу в большом



количестве через капиллярный кровоток. Результаты настоящего исследования не проясняют эту ситуацию, но позволяют предположить, что такая гипотеза весьма вероятна, поскольку у собак с клиническими проявлениями ксенодиагностика была положительной при наличии лимфаденопатии и/или спленомегалии, т. е. симптомов, вероятно связанных с высокой паразитемией, способствующей легкой передаче паразита насекомому. Исследование, показывающее отсутствие корреляции между наличием продуктов лейшмании в коже и трансмиссионным потенциалом, также подтверждает эту гипотезу [4].

Выводы

Результаты настоящего исследования, в котором анализировались клинические проявления, кожный воспалительный процесс, паразитарная нагрузка в коже и потенциал передачи паразита переносчику (ксенодиагностика), выявили критерии, которые позволяют идентифицировать собак, представляющих непосредственный риск передачи лейшманий в эндемичных регионах. Эти клинические проявления легко обнаружимы, включая наличие нейтрофилов в воспалительном инфильтрате в коже. Пять клинических признаков, которые, будучи обнаружены вместе, весомо указывают на ВЛ, включают аномалию когтей, кожные язвы, конъюнктивит, лимфаденопатию и потерю веса. Лимфаденопатия, в частности, была достоверным клиническим критерием, так как имела четкая связь с положительной ксенодиагностикой. Направление животных с такими клиническими проявлениями на серологическое и паразитологическое исследования ускорит выявление особей, представляющих потенциальный риск трансмиссии, внося весомый вклад в контроль над распространением ВЛ в эндемичных регионах.

Вклад авторов

В. Л. А. V. участвовала в сборе образцов, проведении анализов, обработке данных и подготовке рукописи. Н. Г. участвовала в развитии исследования, включая анализ данных и ревизию манускрипта. С. М. L. участвовала в сборе образцов, проведении анализов и обработке данных. I. L. M., S. M. M. S. S. и S. M. C. участвовали в обсуждении проекта, технической поддержке и подготовке рукописи. F. A. L. C. была автором идеи исследования и координировала всю деятельность других авторов на всех этапах. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Благодарности

Авторы хотят поблагодарить господина Manoel de Jesus Gomes da Silva за его технический вклад в подготовку гистопатологических и иммуногистохимических препаратов. +

BMC Veterinary Research 2008, 4:45 <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/4/45>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lainson R., Shaw J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In The leishmaniasis in biology and medicine, Volume 1. Edited by Peters W. E., Lillick-Kendrick R. London: Academic Press Inc; 1987:2-118.
2. Deane L. M., Deane M. P.: Leishmaniose visceral urbana (no cao e no homem) em Sobral, Ceara. O Hosp, 1955, 47:75-87.
3. Dietze R., Barros G. B., Teixeira L., Harris J., Michelson K., Falqueto A., Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brasil. Clin Infect Dis, 1997, 25:1240-1242.
4. Travi B. L., Tabares C. J., Cadena H., Ferro C., Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. Am J Trop Med Hyg, 2001, 64(3-4):119-124.
5. Berrahal F., Mary C., Roze M., Berenger A., Escoffier K., Lamoroux D., Dunan S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. Am J Trop Med Hyg, 1996, 55:273-277.
6. Cabral M., O'Grady J. E., Gomes S., Sousa J. C., Thompson H., Alexander J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. Vet Parasitol, 1998, 76:173-180.
7. Solano-Gallego L., Morell P., Arboix M., Alberola J., Ferrer L. Prevalence of Leishmania infantum Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. J Clin Microbiol, 2001, 39:560-563.
8. Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. Moving towards a solution. Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum, 2002; Sevilla, Spain, 2002:7-14.
9. Bryden S. L., White S. D., Dunston S. M., Burrows A. K., Olivry T. Clinical, histopathological and immunological characteristics of exfoliative cutaneous lupus erythematosus in 25 German short-haired pointers. Vet Dermatol, 2005, 16:239-52.
10. Solano-Gallego L., Fernandes-Bellon H., Morell P., Fondevila D., Alberola J., Ramis A., Ferrer L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum infected dogs. J Comparative Pathol, 2004, 130:7-12.
11. Guarga J. L., Moreno J., Lucientes J., Gracia M. J., Peribanez M. A., Alvar J., Castillo J. A. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. Res Vet Sci, 2000, 69:249-253.
12. Molina R., Amela C., Nieto J., San-Andres M., Gonzalez F., Castillo J. A., Lucientes J., Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with Leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus. Am J Trop Med Hyg, 1994, 88:491-493.
13. Almeida M. A. O., Jesus E. E. V., Sousa-Atta M. L. B., Alves L. C., Berne M. E. A., Atta A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with Leishmania chagasi. Vet Parasitol, 2005, 127:227-232.
14. Keenan C. M., Hendriks L. D., Leigtner L., Johnson A. J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. Vet Pathol, 1984, 21:74-79.
15. Pozio E., Grandoni L., Bettini J., Gramiccia M. Leishmaniasis in Tus cany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). Acta Tropica 1981, 38:383-393.
16. Costa F. A. L., Goto H., Saldanha L. C. B., Silva S. M. M. S., Sinhorini I. L., Silva T. C., Guerra J. L. Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis. Vet Pathol, 2003, 40:677-684.
17. Dos-Santos W. L. C., David J., Badaro R., De-Freitas L. A. R. Association between skin parasitism and granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. Parasitol Res, 2004, 92(2):89-94.
18. Mozos E., Perez J., Day M. J., Lucena R., Ginel P. J. Leishmaniasis and generalized dermodicoses in three dogs: a clinical and immunohistochemical study. Comp Pathol, 1999, 120:257-268.
19. Tarantino C., Rossi G., Kramer L. H., Perruci S., Cringoli G., Macchione G. Leishmania infantum and Neospora caninum simultaneous skin infection in a Young dog in Italy. Vet Parasitol, 2001, 102:77-83.
20. Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis. Int J Dermatol, 1979, 18:362-368.
21. Murray H. W. Tissue granuloma structure – function in experimental visceral leishmaniasis. Int J Exp Pathol, 2001, 82:249-267.
22. Lemos de Sousa V., Ascensao J. S., Sampaio P. T. V., Rodrigues de Freitas L.A. Different Leishmania species determine distinct profiles of immune and histopathological response in CBA mice. Microb Infect, 2000, 15:1807-1815.
23. Laurenti M. D., Sotto M. N., Corbett C. E. P., Matta V. L. R., Duarte M. I. S. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. Int J Exp Pathol, 1990, 71(6):791-797.
24. Murray H. W., Squires K. E., Miralles C. D., Stoeckle M. Y., Granger A. M., Granelli-Piperno A., Bogdan C. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. J Immunol, 1992, 148:1858-63.

© 2008 Ver osa et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.