

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E
SAÚDE PÚBLICA NOS TRÓPICOS

FABIANA DA SILVA CARNEIRO CHAGAS

**SOROEPIDEMIOLOGIA DE *LEISHMANIA INFANTUM* EM EQUINOS DE
ARAGUAÍNA, TOCANTINS**

ARAGUAÍNA – TO
2017

FABIANA DA SILVA CARNEIRO CHAGAS

**SOROEPIDEMIOLOGIA DE *LEISHMANIA INFANTUM* EM EQUINOS DE
ARAGUAÍNA, TOCANTINS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Sanidade Animal e Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Marco Augusto Giannoccaro da Silva – Doutor em Medicina Veterinária

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Helcileia Dias Santos – Doutora em Ciências Veterinárias

ARAGUAÍNA – TO
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- C433s Chagas, Fabiana da Silva Carneiro .
Soroepidemiologia de *Leishmania infantum* em equinos de Araguaína,
Tocantins.. / Fabiana da Silva Carneiro Chagas. – Araguaína, TO, 2017.
36 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação em Sanidade
Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2017.
- Orientador: Marco Augusto Giannoccaro da Silva
Coorientadora : Helcileia Dias Santos
1. Sanidade Animal. 2. Saúde Pública. 3. Clínica Médica de Equídeos. 4.
Leishmaniose equina. I. Título
- CDD 636.089**

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

FABIANA DA SILVA CARNEIRO CHAGAS

SOROEPIDEMIOLOGIA DE *LEISHMANIA INFANTUM* EM EQUINOS DE
ARAGUAÍNA, TOCANTINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Sanidade Animal e Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Marco Augusto Giannoccaro da Silva – Doutor em Medicina Veterinária

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Helcileia Dias Santos – Doutora em Ciências Veterinárias

DATA DE APROVAÇÃO: 16/08/17.

BANCA EXAMINADORA:



PROF. DR. MARCO AUGUSTO GIANNOCCARO DA SILVA
Doutor em Medicina Veterinária
Programa de Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos



PROF^a. DR^a. KATYANE DE SOUSA ALMEIDA
Doutora em Medicina Veterinária
Programa de Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos



PROF^a. DR^a. MARIA DE JESÚS VELOSO SOARES
Doutora em Medicina Veterinária
Universidade Federal do Tocantins

Dedico aos meus pais, ao meu irmão, ao meu esposo e ao meu orientador, pelo apoio e incentivo, e a todos os profissionais que se preocupam com a saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a força maior, vinda do Pai e a proteção de Nossa Senhora de Aparecida a mim dispensados durante esses dois últimos anos de caminhada. Aos meus pais, Iramar e Francisco, que são meu principal alicerce e minha base, por todas as oportunidades que me proporcionaram. Meu irmão Fabricio, minha cunhada Luana, pelo apoio e auxílio, e minha sobrinha Heloisa, pelos bons momentos de distração que muitas vezes me aliviaram do estresse. Ao meu esposo Sergio, pela paciência, companheirismo e apoio, essenciais nesta jornada.

Ao meu incansável, paciente e dedicado orientador, professor Marco. À minha co-orientadora, professora Helcileia. Aos demais professores do programa, e em especial, Katyane, Michel, Fabiano, Ana Kelen, Silvia, Bruna e Erika. Aos técnicos de laboratório de Parasitologia, Taiã e Samara e, Cristiane, do laboratório de Microbiologia de Alimentos. À Adriana, Cristiane e Patricia que também me auxiliaram. Aos meus colegas de turma: Isaura, Alessandro, Helane, Juliana, Maria Cirlene e Osmar.

Às minhas amigas que sempre estiveram ao meu lado e me auxiliaram em algumas etapas desta pesquisa: Greicy e Jeissy. Aos proprietários dos animais pela atenção e que permitiram a realização das coletas. Aos meus chefes e colegas de trabalho da ADAPEC. E à todas as pessoas que de alguma forma me apoiaram.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Leishmania infantum (chagasi) é transmitida por flebotomíneos e causa a leishmaniose visceral (LV), considerada uma zoonose de grande importância para a saúde pública. O diagnóstico da LV vem enfrentando grandes desafios. Afim de se descobrir testes com alta sensibilidade e especificidade, principalmente quando trata-se de equinos, já que para estes animais ainda não existem testes padronizados. Este trabalho tem por objetivo identificar a infecção por *Leishmania infantum* de equinos no município de Araguaína – TO. Para isto foram coletadas amostras de sangue de 165 equinos, e testados por meio do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e do Teste de Aglutinação Direta (DAT). Foram testados soros de 165 equinos no teste ELISA, onde 29 animais (17,6%) foram reagentes ao antígeno e 10 (6,1%) indeterminados. Na diluição de corte (1:200) do DAT testaram-se todos os positivos na primeira diluição de triagem (1:40) e todos os reagentes e indeterminados no ELISA, em um total de 61 amostras, encontrando dois equinos positivos (3,3%). Conclui-se a existência de infecção por *Leishmania infantum* dos equinos de Araguaína-TO.

PALAVRAS-CHAVES: Diagnóstico, leishmaniose, zoonose, cavalos.

ABSTRACT

Leishmania infantum (chagasi) is transmitted by sandflies and causes visceral leishmaniasis (VL), considered a zoonosis of great importance for public health. The diagnosis of VL has been facing great challenges. In order to discover tests with high sensitivity and specificity, especially when it comes to equines, since for these animals there are still no standardized tests. This work aims to identify the infection by *Leishmania infantum* of horses in the municipality of Araguaína - TO. For this purpose, blood samples of 165 horses were collected and tested through the Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) and Direct Agglutination Test (DAT). Serum of 165 horses were tested in the ELISA, where 29 animals (17.6%) were antigen-reactive and 10 (6.1%) were undetermined. In the DAT cut-off (1: 200) all positives in the first dilution of screening (1:40) and all the undetermined reagents in the ELISA were tested in a total of 61 samples, with two positive equines (3,3%). It is concluded the existence of infection by *Leishmania infantum* of horses of Araguaína-TO.

KEYWORDS: Diagnosis, leishmaniasis, zoonosis, horses.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO	10
2.2. VETOR	11
2.3. HOSPEDEIROS/RESERVATÓRIOS.....	11
2.4. RELAÇÃO ENTRE HOSPEDEIRO E A LEISHMANIOSE VISCERAL	12
2.5. FORMA DE TRANSMISSÃO	13
2.6. DIAGNÓSTICO.....	14
2.7. A LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVO GERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
4. CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO	18
RESUMO	19
ABSTRACT.....	19
INTRODUÇÃO	19
MATERIAL E MÉTODOS	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	28
5. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades infecciosas causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) que possuem como principal forma de transmissão a picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (BATES, 2007; DESJEUX, 1996).

Possuem uma vasta distribuição geográfica e são consideradas de alta complexidade, pois diversos fatores (biológicos, ambientais, ecológicos e sociais) influenciam na sua transmissão e controle (FERREIRA, 2012). Por estarem presentes nos cinco continentes e em 98 países (ALVAR et al., 2012; WHO, 2010), foram consideradas zoonoses de grande relevância pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005 (BRASIL, 2005).

Várias espécies de *Leishmania* podem infectar o homem (LAINSON; SHAW, 1998) e, por isso, diversos quadros clínicos podem ser desencadeados, com manifestações em pele, mucosas e/ou órgãos internos (FERREIRA, 2012). Dentre eles, podemos destacar a Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida no Brasil como calazar, que é considerada a manifestação mais grave e comumente fatal nos casos não tratados (WHO, 2010; CORTES, 2008; MURRAY et al., 2005).

Leishmania infantum é o agente causador da LV e o vetor responsável pela disseminação deste agente no Brasil é a fêmea de dípteros da família Psychodidae, das espécies *Lutzomyia longipalpis*, conhecido popularmente como mosquito-palha, birigui ou tatuquiras (BRASIL, 2006) e *Lutzomyia cruzi* (ESCOBAR, 2015; SANTOS et al., 1998).

Dentre os hospedeiros, o cão é o principal reservatório doméstico e a mais importante fonte de infecção, já que o número de casos em cães é notadamente mais expressivo que no homem (BRASIL, 2006). Cerqueira et al. (2003) iniciaram a discussão sobre a participação também dos equinos na cadeia epidemiológica da leishmaniose, uma vez que possuem grande volume sanguíneo e por percorrerem diversas localidades endêmicas, através das muitas atividades as quais são submetidos.

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose em equinos ainda é difícil, pois não existem testes padronizados especificamente para a espécie, como existem para cães e humanos (ESCOBAR, 2015). Casos e estudos epidemiológicos de infecção em equinos por *Leishmania* sp. vêm sendo descritos em diversas localidades no Brasil, como em alguns municípios da região Nordeste (BRITO et al., 2012), em Araçatuba – SP (FEITOSA et al., 2012) e em Uberlândia – MG (OLIVEIRA et al., 2017), bem como em outros países, como Portugal (ROLÃO et al., 2005), Israel (AHARONSON-RAZ et al., 2015) e Estados Unidos

(RAMOS-VARA et al., 1996). Esses trabalhos utilizaram técnicas distintas para o diagnóstico e geralmente com Kits comerciais padronizados para outra espécie, geralmente a canina.

Em Araguaína, nenhum trabalho foi conduzido nesse sentido, embora, segundo registros da Agência de Defesa Agropecuária (ADAPEC/TO) e do Laboratório de Saúde Pública de Araguaína (LSPA/LACEN) em 2015, respectivamente, apontarem 5214 equinos registrados no órgão e 133 novos casos de LV humana. Os animais vivem na área urbana e rural da cidade e são utilizados em práticas diversas, como tração de carroças, cavalgadas, reprodução e atividades esportivas. Cabe dar destaque nessa última atividade, que a principal modalidade praticada é a vaquejada e que, frequentemente, os animais viajam para competições intra e interestaduais, podendo ser disseminadores de diversas enfermidades quando não diagnosticadas, inclusive a leishmaniose.

Frente ao exposto, este trabalho contemplou a avaliação de equinos no município de Araguaína – TO (07° 11' 28" S/48° 12' 26" W) por meio das técnicas de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Teste de Aglutinação Direta (DAT), bem como correlacionou alguns fatores de risco com os resultados encontrados.

2. CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AGENTE ETIOLÓGICO

Protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, incluídos no complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* são os agentes causadores da leishmaniose visceral (CORTES, 2008; GONTIJO; MELO, 2004). No Brasil, *Leishmania infantum (Leishmania chagasi)* é o principal agente envolvido (MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000). São considerados parasitas intracelulares obrigatórios, parasitando células do sistema fagocítico mononuclear (BRASIL, 2006) e reproduzem-se por meio de divisão binária, exceto na fase metacíclica, quando param de se reproduzir e locomovem-se para o esôfago, faringe e probóscida, para então infectar o hospedeiro (ESCOBAR, 2015).

Apresentam duas formas, a promastigota, quando no interior do tubo digestivo do flebotomíneo, e amastigota, quando no organismo do hospedeiro ou do reservatório. A forma promastigota possui cerca de 10 a 20µm de comprimento, 1,5 a 3,0µm de largura e um flagelo que tem a função de permitir a locomoção pelo intestino do vetor. Em um processo que perdura de 8 a 20 dias, esta forma passa ainda por duas fases: a fase promastigota procíclica, que possui forma alongada e flagelo mais curto, e a promastigota metacíclica com forma curta

e arredondada e flagelo mais longo, sendo essa a forma que infectará o hospedeiro. Já a forma amastigota tem o formato ovóide ou arredondado e não apresenta flagelo aparente (ESCOBAR, 2015).

2.2. VETOR

Os vetores responsáveis pela transmissão da doença são os flebotomíneos da família Psychodidae, espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo essa última encontrada em estudo realizado no Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2006; ESCOBAR, 2015; SANTOS et al., 1998).

Os flebotomíneos são pequenos insetos que possuem de 1 a 3mm de comprimento, que apresentam pelos no corpo, coloração que varia de castanho claro a cor de palha e usam como fonte energética os carboidratos. As fêmeas por sua vez ainda necessitam de sangue para a maturação dos ovos. As larvas se desenvolvem em locais úmidos, com bastante matéria orgânica e pouca luz (BRASIL, 2006).

Esses insetos são considerados holometábolos, ou seja, desenvolvem-se por meio de metamorfose que se completa em torno de 30 a 40 dias e que compreende a passagem pelas fases de ovo, larva, pupa, até chegar à fase adulta (BRASIL, 2006; ESCOBAR, 2015)

São ativos ao entardecer e à noite, e durante o dia permanecem inativos, em locais úmidos e protegidos do sol, vento e predadores, (BRASIL, 2006; ESCOBAR, 2015). Percorrem distâncias curtas em cada voo, daí a necessidade de manterem-se próximos dos hospedeiros (CORTES, 2008).

Inicialmente, eram encontrados em ambientes rurais, porém a partir da década de 80 migraram para a zona urbana e desde então estão em constante migração e adaptação, pois são encontrados desde ambientes de criação de animais como chiqueiros, galinheiros, paióis e canis, como no interior das residências em grandes centros urbanos (BRASIL, 2006). As principais causas apontadas para isso são os impactos antrópicos sobre o meio ambiente, resultantes de guerras, migrações, globalização e aquecimento global. Ocorrência de casos de leishmaniose em regiões não endêmicas tem sido recorrente, mostrando sua franca expansão (SHAW, 2007).

2.3. HOSPEDEIROS/RESERVATÓRIOS

Dentre os hospedeiros, o cão é o principal reservatório doméstico de *L. infantum* e a mais importante fonte de infecção, tanto em áreas rurais como urbanas (BRASIL, 2006; GOMES et al., 2007). Já no âmbito dos animais silvestres, as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e o marsupial (*Didelphis albiventris*) são tidos como os principais reservatórios (BRASIL, 2006).

O cão ganhou este destaque, segundo Palatnik-de-Sousa et al. (2001), devido ao alto grau de parasitismo na pele do animal infectado e também à grande susceptibilidade dos mesmos a doença. Esses fatores facilitam a infecção de vetores em áreas endêmicas e tornam o cão o protagonista na manutenção do ciclo da doença (OLIVA et al., 2006; QUINNELL et al., 1997).

Por essa razão, sob condições favoráveis de transmissão, ou seja, elevada densidade populacional do vetor e de cães, a infecção pode se propagar extensivamente e a uma velocidade imensurável na população canina (OLIVA et al., 2006; QUINNELL et al., 1997).

Cerqueira et al. (2003) iniciaram a discussão sobre a participação também dos equinos na cadeia epidemiológica da leishmaniose, uma vez que possuem grande volume sanguíneo e percorrem diversas localidades endêmicas devido às diversas atividades as quais são submetidos, o que atrai muitos insetos e facilitaria a infecção e propagação da enfermidade, respectivamente. Esses autores concluíram que os equinos contribuem certamente para a proliferação dos vetores, aumentando a reprodução dos mesmos, a densidade e elevando, conseqüentemente, o risco de transmissão do agente etiológico.

2.4. RELAÇÃO ENTRE HOSPEDEIRO E A LEISHMANIOSE VISCERAL

Muito tem se debatido sobre a relação da leishmaniose visceral canina (LVC) e o risco de ocorrência da leishmaniose visceral humana (LVH). Trabalhos realizados por alguns autores (COURTENAY et al., 2002; DIETZE et al., 1997; MILES et al., 1999) foram precisos em minimizar essa relação, pois demonstraram que a eutanásia de cães soropositivos em regiões endêmicas do Brasil, teve um baixo impacto na redução do número de casos de LV humana. Segundo Lemos et al. (2008), mais de dois milhões de cães foram examinados entre os anos de 2002 e 2007 no Brasil e em torno de 160.000 foram eutanasiados, não se observando, porém, a redução da incidência de casos humanos a níveis consideráveis. Este fato demonstra a necessidade de se reavaliar as medidas de controle da LV, as políticas de combate à doença no Brasil (BRAGA et al. 1998; MOREIRA et al. 2004; ROSÁRIO et al.

2005), e realizar um levantamento em outras espécies para identificar o papel de cada uma na cadeia epidemiológica.

Dentre as possíveis causas levantadas pelos autores sobre a ineficiência do controle da LV, foram destacadas as limitações dos testes diagnósticos sorológicos empregados em larga escala nos inquéritos caninos, a morosidade entre a coleta das amostras dos cães, a análise das mesmas e a eutanásia dos cães infectados (COURTENAY et al., 2002; MOREIRA et al., 2004; VIEIRA; COELHO, 1998) e, a rápida reposição de cães susceptíveis pela sociedade (MOREIRA et al., 2004)

De forma contrária, pesquisadores (ASHFORD et al., 1998; NUNES et al., 2010) encontraram associação entre a eutanásia de cães e a diminuição da incidência de LV humana, desde que realizada rapidamente e associada a outras medidas, como o controle do vetor e o tratamento de pessoas infectadas (ASHFORD et al., 1998; BRAGA et al., 1998).

A importância epidemiológica dos cães vem sendo reforçada, uma vez que há evidências de que a LVC é um fator de risco para LVH (BEVILACQUA et al., 2001). Porém, deve-se lembrar que outras espécies de mamíferos também já foram descritas como hospedeiras (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), como os felinos (MAIA; CAMPINO, 2011; SCHUBACH et al., 2004) e os equinos (BARBOSA-SANTOS et al., 1994; MÜLLER et al., 2009) e, os registros nestas espécies tem aumentado no mundo todo (SOARES et al., 2013).

Soares et al. (2013) confirmaram a presença da *L. infantum e brasiliensis* em equinos de Belo Horizonte, o que permitiu destacarem a possível participação dessa espécie na cadeia epidemiológica desse parasita e concluírem sobre a importância de se realizar estudos epidemiológicos com o intuito de se determinar o real papel dos cavalos na leishmaniose, esclarecendo também a característica clínica da doença na espécie bem como a importância dos equinos como reservatório de diferentes espécies parasitas em áreas urbanas endêmicas.

2.5. FORMA DE TRANSMISSÃO

A transmissão da leishmaniose acontece por meio do repasto sanguíneo, quando a fêmea do flebotomíneo infectada pica um hospedeiro susceptível para maturação dos seus ovos, transmitindo concomitantemente a forma promastigota. A infecção do vetor ocorre quando o mesmo ingere a forma amastigota presente no reservatório (CORTES, 2008; GONTIJO; MELO, 2004).

No organismo do hospedeiro, a promastigota é fagocitada pelos macrófagos e neste momento perde seu flagelo, tornando-se amastigota. No interior da célula, se reproduzem causando o rompimento deste macrófago e a infecção de novas células (CORTES, 2008).

A LV é transmitida enquanto houver a presença do protozoário na pele ou sangue periférico. Nos cães, a transmissão direta entre eles, sem intermédio aparente de um vetor, vem sendo investigada e confirmada em alguns casos (FERREIRA, 2012). A transmissão transplacentária (SILVA et al., 2009a; ROSYPAL et al., 2005), venérea (SILVA et al., 2009b) e via transfusão sanguínea (FREITAS et al., 2006) já foram descritas. No entanto, essas vias alternativas têm pouco valor na história natural e na epidemiologia da LV canina e necessitam de estudos mais aprofundados (FERREIRA, 2012)

2.6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leishmaniose é complexo e envolve desde o diagnóstico clínico até o uso de inúmeros testes, tais como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), o Teste de Aglutinação Direta (DAT) e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) (GONTIJO; MELO, 2004). Os dois primeiros são recomendados pelo Ministério da Saúde para o inquérito epidemiológico canino (BRASIL, 2006). Sendo assim, entende-se que existem três grupos de exames para o diagnóstico de LV, além do diagnóstico clínico: o parasitológico, o imunológico ou sorológico e o molecular (DOTTA; LOT; ZAPPA, 2009; SOARES, 2012).

Em relação ao diagnóstico clínico em cães, pode-se afirmar que é difícil realizar o mesmo, pois esses animais quando infectados apresentam sinais que são comuns a outras enfermidades como a brucelose, toxoplasmose e babesiose (DOTTA; LOT; ZAPPA, 2009). Não há sinais patognomônicos e pode-se observar linfadenomegalia, hiporexia, coagulopatias, anemia, icterícia, onicogribose, atrofia da musculatura, emagrecimento progressivo, alopecia, alterações hepáticas, alterações renais, lesões ulcerativas na região nasal, lesões perioculares, lesões em ponta de orelha, descamações cutâneas e dermatose ulcerativa (SILVA, 2007).

Os sinais clínicos já relatados em equinos são lesões cutâneas sem padrões característicos definidos, e não apresentam sinais sistêmicos como demonstrados em cães (KOEHLER et al., 2002; MÜLLER et. al., 2009). Entretanto, equinos expostos à regiões endêmicas podem estar infectados por *Leishmania infantum* mesmo sem nenhuma

sintomatologia clínica e, ainda apresentar resposta humoral para o protozoário (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006).

Os testes bioquímicos podem ser realizados para acompanhamento da evolução da doença, porém não são utilizados como meios diagnósticos por apresentarem resultados inespecíficos. Sendo assim, os testes sorológicos são importantes meios diagnósticos confirmatórios, além de serem menos invasivos que os testes parasitológicos (CÓRTEZ et al., 2007).

Por meio de punção de órgãos como linfonodos, baço e da medula óssea é possível a realização do diagnóstico parasitológico a fim de visualizar o parasito em esfregaços com corantes básicos, como Giemsa, Panótico e Wright (NEVES, 1991). Consegue-se especificidade de 100%, porém a sensibilidade pode variar, já que os protozoários não se distribuem homogeneamente pelos tecidos (GONTIJO; MELO, 2004). A sensibilidade é dependente do grau de parasitemia do indivíduo, tempo dispendido entre a confecção e a leitura da lâmina e qual o tipo de material obtido, girando em torno de 80% nos cães que apresentam sinais e inferior nos animais assintomáticos (BRASIL, 2006).

Gontijo; Melo (2004) afirmaram que pode-se obter sensibilidade de até 98% quando utilizado aspirado do baço, porém este é um procedimento complicado, por ser muito invasivo e poder levar a quadros de hemorragia. Souza et al. (2013) recomendaram a punção aspirativa da medula óssea em substituição a punção esplênica, justificando ser mais seguro. Nesta avaliação, ao menos duzentos campos no esfregaço da lâmina corada precisam ser analisados antes que se considere um resultado como negativo.

Diferentes estudos evidenciaram altos índices de sensibilidade e especificidade para a RIFI em áreas endêmicas para a LV (MAIA et al., 2009; MANCIANTI et al., 1995; METTLER et al., 2005). Este teste pode apresentar sensibilidade variando de 90 a 100% e especificidade de cerca de 80% para amostras de soro, sendo esta especificidade prejudicada pela possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outras enfermidades causadas por tripanossomatídeos, como por exemplo a doença de Chagas, leishmaniose tegumentar (SOUZA et al., 2013), malária, esquistossomose e tuberculose (GONTIJO; MELO, 2004). Para resultados positivos admite-se como ponto de corte a diluição 1:80, e nos casos de positividade em 1:40, o teste deve ser repetido com nova amostra em um prazo de 30 dias (BRASIL, 2006).

Uma das vantagens da RIFI é que não necessita de tanta infraestrutura, sendo necessário um microscópio de fluorescência e o treinamento de pessoal para realizá-la. Por isso, esta técnica tem sido muito empregada como teste sorológico de eleição para o

diagnóstico da leishmaniose visceral canina em diversos municípios brasileiros (BRASIL, 2011b).

Por sua vez o teste ELISA vem sendo empregado para a detecção de anticorpos nos casos em que se deseja realizar levantamento soroepidemiológico com rapidez, praticidade e de forma pouco onerosa (GONTIJO; MELO, 2004). Com resultados apresentando diluições fixas ou ainda somente demonstrando-se reagente ou não, o ELISA tem sua resposta expressa em unidades de absorvância a um raio de luz (BRASIL, 2006). Trata-se de um teste com um pouco mais de sensibilidade e um pouco menos de especificidade que a RIFI. Devido a sua sensibilidade é possível detectar títulos baixos de anticorpos, porém a precisão na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos é baixa (GONTIJO; MELO, 2004).

No teste de aglutinação direta (DAT), estudos demonstraram sensibilidade de 91 a 100% e especificidade que varia de 72 a 100% (GONTIJO; MELO, 2004). Esta é uma técnica de fácil execução, embora haja a necessidade de padronização e de controle de qualidade do antígeno (SOUZA et al., 2013). Harith et al. (1987) afirma tratar-se de um teste que além de ter a facilidade de realização é ainda econômico, por estes motivos recomenda-o para a finalidade de pesquisas soroepidemiológicas sobre a leishmaniose visceral.

Por fim, na PCR, vários tipos de tecido podem ser utilizados para esse teste: aspirados de baço, de medula óssea, de linfonodos, sangue total, camada de leucócitos e cultura e sangue coletado em papel-filtro (GONTIJO; MELO, 2004). Nesse teste, o nível de parasitemia do hospedeiro interfere no resultado obtido, o que diminui sua sensibilidade (SOUZA et al., 2013). A PCR ainda pode sofrer influência de aspectos como a área endêmica; o tipo de amostra; o alvo do DNA utilizado para amplificação e o modo de extração do DNA (BRASIL, 2006).

Além da finalidade de diagnóstico, a PCR vêm sendo utilizada com outros fins, como acompanhamento do tratamento e estudos epidemiológicos. Trata-se de uma técnica com boa sensibilidade, independente da capacidade imunológica ou do histórico clínico do paciente. Porém, vê-se a necessidade de adaptações tornando-o mais simples e com melhor custo operacional, afim de se utilizar em larga escala, pois ainda é um método mais comum em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de rotina clínica (GONTIJO; MELO, 2004).

2.7. A LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

O primeiro registro da LV no Brasil data de 1934, quando identificou-se formas amastigotas em cortes histológicos de fígado de pacientes que vieram a óbito sob a suspeita de

febre amarela (PENNA, 1934). Nesta época, a LV tinha caráter essencialmente rural, porém nos anos 80 houve uma importante modificação neste perfil, uma vez que a doença atingiu a periferia de grandes cidades (GONTIJO; MELO, 2004).

Antes desta expansão, os casos de LV estavam restritos praticamente ao Nordeste brasileiro, que detinha 90% dos casos (BRASIL, 2011a). Últimos dados publicados em 2015 pelo Ministério da Saúde, apontam a região Nordeste ainda com o maior número de casos, porém representando 54,91%, o que demonstra uma maior distribuição da LV no país (BRASIL, 2015).

Os Estados do Tocantins, Mato Grosso do Sul, Pará, Minas Gerais e São Paulo contribuíram na década de 90 para expansão da LV (BRASIL, 2011a), que foi confirmada nos anos 2000, sendo que em 2009 mais de 1600 municípios brasileiros (compreendendo 27 Estados) tiveram casos autóctones registrados, chegando a ter média anual de 1,9 casos para cada 100.000 habitantes (BRASIL, 2011a; MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

O programa de controle da LV no Brasil teve início nos anos 50 e visava desfazer os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão da doença. No entanto, os procedimentos adotados foram questionados, uma vez que não havia evidências de redução da incidência de LV no país. Frente a isso, o Ministério da Saúde e a Fundação Nacional da Saúde montaram um comitê para reavaliar o programa e dar um melhor direcionamento ao mesmo (COSTA; VIEIRA, 2001).

As estratégias adotadas pelo comitê foram e vem sendo respaldadas em alguns pontos, sendo: dados publicados na literatura especializada, a falta de padronização dos métodos diagnósticos para a LV humana e canina, divergência entre a eutanásia de cães soropositivos e a prevalência da infecção humana, a necessidade de se comprovar a existência de outros reservatórios e de outras formas de transmissão em que não há a participação do vetor (FERREIRA, 2012).

O Ministério da Saúde em 2015 disponibilizou dados sobre número de casos confirmados de LV humana, levantados entre os anos de 1990 e 2015, e estes apontaram um aumento significativo nesse número. Nesse levantamento, a região Norte ocupava o terceiro lugar, sendo que o estado do Tocantins era o segundo em ocorrência dentro dessa região. É importante salientar sobre esses dados, que no ano de 1990, o Tocantins teve apenas sete casos registrados. Já em 2015, esse número chegou a 185 (BRASIL, 2015) o que representa a franca expansão da enfermidade no Estado e a necessidade de se rever os protocolos de controle, os meios diagnósticos e se verificar a existência de outros reservatórios.

De acordo com dados enviados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Araguaína ao Ministério Público Estadual, em 2010, Araguaína foi o município brasileiro com maior registro de LV humana (SOARES, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de infecção por *Leishmania infantum* em equinos do município de Araguaína – TO.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Pesquisar anticorpos anti-*Leishmania infantum* pela técnica sorológica ELISA nos equinos do município.
- Avaliar a presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum* pela técnica DAT.
- Realizar inquérito epidemiológico a fim de detectar possíveis fatores de risco.

4. CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico apresentado a seguir demonstra os resultados encontrados nesta pesquisa. A formatação segue as normas da Revista Ciência Animal. Os tópicos Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se descritos a seguir.

SOROEPIDEMIOLOGIA DE *LEISHMANIA INFANTUM* EM EQUINOS DE ARAGUAÍNA, TOCANTINS

RESUMO

Objetivou-se com a presente pesquisa avaliar a ocorrência de *Leishmania infantum* em equídeos do município de Araguaína, Tocantins, região Norte do Brasil. Amostras de soro foram obtidas de 165 equinos clinicamente saudáveis, mantidos em diversas regiões da cidade, incluindo-se a zona urbana e rural, para se avaliar a presença de anticorpos contra *L. infantum* pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) e teste de aglutinação direta (DAT). Além disto realizou-se inquérito epidemiológico visando detectar possíveis fatores de risco (raça, idade, gênero e local de moradia) associados com a presença de anticorpos contra *L. infantum*. A soroprevalência contra *L. infantum* no ELISA foi de 17,6% (29/165) e no DAT (1:200) de 3,3% (2/61). Nenhuma das variáveis analisadas apresentou risco significativo na soroprevalência da *L. infantum* e não houve concordância entre os métodos diagnóstico utilizados pela análise de concordância Kappa.

Palavras-Chave: cavalo, DAT, ELISA, Leishmaniose.

SOROEPIDEMIOLOGY OF *LEISHMANIA INFANTUM* IN EQUINES FROM ARAGUAÍNA, TOCANTINS

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the occurrence of *Leishmania infantum* in equines from Araguaína, Tocantins, North region of Brazil. Serum samples from 164 clinically healthy equine kept in several regions of the city, including the urban and rural areas, were assessed for the presence of antibodies against *L. infantum* by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and direct agglutination test (DAT). Additionally, an epidemiological survey was done to evaluate the possible risk factors (age, gender, activity and place of residence) associated with the presence of antibodies against *L. infantum*. The seroprevalence against *L. infantum* in ELISA was 17.6% (29/165) and in DAT (1: 200) was 3.3% (2/61). None of the analyzed variables presented a significant risk in the seroprevalence of *L. infantum* and there was no agreement between the diagnostic methods used by the Kappa concordance analysis.

Key words: horse, DAT, ELISA, Leishmaniasis.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma importante zoonose, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, tendo, no ciclo urbano, os canídeos, roedores e seres humanos como as principais espécies afetadas. Contudo, outras espécies de mamíferos já foram alcançadas como hospedeiras de *Leishmania* (BRANDAO-FILHO et al., 2003), sendo que relatos em animais domésticos só vem crescendo em todo o mundo (SOARES et al., 2013), incluindo-se nos equinos (BARBOSA-SANTOS et al., 1994). A identificação de casos clínicos de

leishmaniose em animais domésticos, como cães e cavalos, está se tornando cada vez mais comum na América do Sul (BARBOSA-SANTOS et al., 1994) e do Norte (RAMOS-VARA et al., 1996). Contudo, embora tenha havido a identificação desses casos, o papel dos equídeos na transmissão da leishmaniose não foi totalmente esclarecido (TOLEZZANO, 1994).

Devido à sua localização geográfica no continente sul americano (zona tropical), o Brasil possui condições ambientais favoráveis que beneficiam a adaptação de várias espécies de artrópodes (DANTAS-TORRES, 2009). Consequentemente, as populações humanas e animais estão expostas a um grande número de enfermidades transmitidas por eles, dentre as quais inclui-se a leishmaniose visceral (LV), cujo principal vetor responsável pela disseminação é a fêmea de dípteros da família Psychodidae, das espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (ESCOBAR, 2015; SANTOS et al., 1998), conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui ou tatuquiras.

A LV é uma enfermidade infecciosa, de caráter crônico, que pode se apresentar na forma assintomática (silenciosa), considerada uma das sete mais importantes endemias mundiais e acomete aproximadamente 58.000 pessoas por ano (ALVAR et al., 2012; GONTIJO; MELO, 2004). Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão são responsáveis por 90% dos casos de LV do mundo, que acomete comumente as populações de baixa renda (GONTIJO; MELO, 2004).

World Health Organization (2010) destacou essa enfermidade como uma doença tropical negligenciada, que estava geralmente associada às zonas rurais e, devido às ações do homem (antropogênicas), houve a urbanização da mesma. Dentre essas ações, pode-se destacar a degradação ambiental, a migração rápida e intensa das populações rurais para as periferias urbanas, onde não há habitação adequada e saneamento básico e, a interação simultânea entre a mobilização de reservatórios silvestres e cães infectados (SILVA et al., 1997).

O agente etiológico da LV é um protozoário da família Trypanosomatidae, da espécie *Leishmania infantum (chagasi)* (BRASIL, 2006), que quando no interior do vetor se desenvolve e passa por duas fases, uma promastigota procíclica e uma metacíclica. Essa última, é a forma infectante transmitida ao hospedeiro por picada de flebótomos. Já no organismo do hospedeiro, ela se modifica para a forma amastigota, que é fagocitada pelos macrófagos, onde se multiplicam e adentram em novas células. Esta última forma é transmitida novamente ao vetor, iniciando um novo ciclo epidemiológico (ESCOBAR, 2015).

Além do homem, este protozoário tem como hospedeiros animais domésticos como cães (principal reservatório em áreas urbanas), gatos e equinos (SÁ; BERTOLIN, 2015), e

temos ainda a raposa (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e o marsupial (*Didelphis albiventris*) como principais reservatórios no ambiente silvestre (BRASIL, 2006).

O primeiro caso de leishmaniose em equinos foi relatado na Argentina por Mazza no ano de 1927 e somente em 1959 um caso foi descrito no Brasil por Alencar, que diagnosticou a enfermidade em um mular no Estado do Ceará (AGUILAR; RANGEL; DEANE, 1986). Desde então, trabalhos pontuais vêm sendo realizados no Brasil (BRITO et al., 2012; FEITOSA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017) e em outros países, como Israel (AHARONSON-RAZ et al., 2015), Portugal (ROLÃO et al., 2005) e Estados Unidos (RAMOS-VARA et al., 1996) com o intuito de se verificar a enfermidade nessa espécie.

Diversos métodos de diagnóstico são empregados para o diagnóstico da LV e, embora já se tenham muitos avanços nas pesquisas, nenhum dos testes garantem 100% de sensibilidade e de especificidade (LIMA et al., 2013). A fim de obter-se um padrão para o diagnóstico da LV equina, que ainda é inexistente, várias técnicas já empregadas na LV humana e canina vêm sendo testadas com os equinos (ESCOBAR, 2015), porém como não há kits comerciais para essa espécie, o uso de kits padronizados para cães e humanos podem fornecer resultados duvidosos.

Embora existam muitos equinos nas áreas urbana e periurbana da cidade de Araguaína, onde estes são empregados na tração ou na prática esportiva, nenhum trabalho foi conduzido com leishmaniose em equinos. Por se tratar de um município endêmico para a LV humana e canina, possuir clima que favoreça a proliferação do vetor e não existir dados sobre a leishmaniose em equinos, objetivou-se com esse trabalho realizar um levantamento soropidemiológico da *Leishmania infantum* em equinos de Araguaína - TO, avaliar os possíveis efeitos da raça, idade, gênero e local que vivem em relação ao risco de ser infectado e verificar a concordância entre os dois testes sorológicos utilizados, DAT e ELISA.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se nesta pesquisa 165 equinos, de ambos os sexos, de diferentes raças e idade, das regiões urbana e rural do município de Araguaína - TO e clinicamente saudáveis. Buscava-se ao exame físico previamente realizado sinais como febre, anorexia, intolerância ao exercício e/ou lesões de pele. Somente os animais que não apresentavam nenhum desses sinais foram incluídos na pesquisa

Dados biológicos como idade, raça e gênero bem como as informações referentes à localização da propriedade eram anotados em fichas individuais e posteriormente tabulados.

Em relação a idade, os animais foram distribuídos em dois grupos, jovens (animais com até 3 anos e 11 meses de idade) e adultos (animais acima de 4 anos de idade).

Todos os animais da zona rural e urbana tinham contato com pelo menos um animal doméstico de outra espécie, sendo na grande maioria dos casos, cão e/ou gato.

Para realização desta pesquisa obteve-se a aprovação (n° 23101.00-006990/2016-57) do Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins (CEUA/UFT).

Obtenção e processamento das amostras sanguíneas

As amostras de sangue eram coletadas por meio da venopunção jugular, utilizando-se o sistema à vácuo e frascos sem anticoagulante. Imediatamente após a coleta, os frascos eram armazenados em caixa isotérmica com gelo reciclável até a chegada ao laboratório. Ato contínuo, as amostras eram submetidas a centrifugação para a obtenção do soro, que era armazenado em tubos do tipo *eppendorf* e congelados a -20°C até o momento da análise.

Análise das amostras (ELISA e DAT)

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania infantum* foi realizada por meio do teste de ELISA específico para equinos e do Teste de Aglutinação Direta (DAT) com promastigotas de *L. infantum*.

O protocolo para a realização do ensaio (ELISA) seguiu as recomendações do fabricante e consistiu em primeiramente diluir 50mL do PBS 20X em 950mL de água destilada e acrescentar 0,5ml de Tween 80. Ato contínuo, o controle positivo, negativo e amostras-teste foram diluídos a 1:400 em PBS-Tween 80 e adicionou-se 100 microlitros de cada diluição em orifícios sequenciais e específicos da microplaca. Incubou-se então a microplaca por uma hora em estufa a 37°C , em câmara úmida e em seguida a mesma foi lavada três vezes com PBS-Tween 80. Adicionou-se nesse momento 100 microlitros do conjugado (anti-IgG de equino) diluído e incubou-se por mais uma hora em estufa a 37°C , em câmara úmida. Repetiu-se os mesmos procedimentos de lavagem da microplaca citados anteriormente. Por fim, adicionou-se 100 microlitros por orifício da solução de substrato, envolveu-se a placa em papel alumínio e incubou-a em temperatura ambiente por 45 minutos. Adicionou-se 50 microlitros por orifício da solução de parada da reação e fez-se a leitura em leitor de microplacas de ELISA com filtro de 405 nm.

O índice de corte (IC) ou *cut-off* foi calculado pela densidade óptica do soro controle negativo multiplicada pelo fator 2,5. Para estabelecer as amostras reagentes, não reagentes e

indeterminadas, considerou-se 10% para mais ou menos do IC e implantou-se a zona cinzenta, como mostrado a seguir:

$$\text{n\~{a}o reagente} / \frac{(-10\%) (+10\%)}{\text{IC}} / \text{reagente}$$

indeterminada

Já o DAT foi realizado conforme descrito por Harith et al. (1986) com algumas adaptações. Iniciou-se com o cultivo de formas promastigotas de *L. infantum* em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, até atingir a fase estacionária de crescimento. Em seguida, os parasitos foram lavados cinco vezes (5.000 rpm, 5 min, 4°C) em solução de Locke's composta por 0,15 M de NaCl, 5,6 mM de KCl, 2,1 nM de CaCl₂, 2,3 nM de NaHCO₃ e 5,5mM de glicose. O sedimento foi ressuspensionado a 1/20 (peso/volume) em solução de Locke's contendo 0,4% de tripsina a 4°C e incubado durante 45 min a 37°C.

Os parasitos foram então novamente lavados quatro vezes (5.000 rpm, 5 min, 4°C) e ressuspensionados em formaldeído a 2% em solução de Locke's e a suspensão mantida a 4°C overnight. No dia seguinte, os parasitos foram lavados três vezes com solução fisiológica (5.000 RPM, 5 min, 4°C) e ressuspensionados em solução fisiológica contendo 0,02% (peso/volume) de corante Comassie Brilliant Blue (Sigma, Brazil), mantendo-se sob agitação moderada durante 90min. Foram, então, centrifugados e lavados três vezes com solução fisiológica (5.000 RPM, 5 min, 4°C). A concentração foi ajustada para 5x10⁷ promastigotas/ml, como realizado por Lopes et al. (2013), em solução fisiológica contendo 1% de formaldeído. As suspensões foram estocadas a 4°C em frascos escuros até o uso.

Os soros foram inicialmente diluídos a partir de 1:40, e em outra etapa diluídos em 1:100 e 1:200, em solução diluente (solução fisiológica contendo 1% de soro fetal bovino e 0,7% de 2mercaptoetanol) em microplacas com poços em V, que foram incubadas por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se igual volume da suspensão de antígeno. Como controle de aglutinação foi utilizada somente solução diluente. Soros controles positivos e negativos humanos foram incluídos na etapa de diluição 1:40, por falta de controles equinos no momento. E na diluição de 1:100 e 1:200 utilizou-se os mesmos controles positivos e negativos de equinos utilizados no ELISA.

Essas microplacas foram mantidas à temperatura ambiente, overnight. A avaliação do resultado foi realizada por análise visual, sendo consideradas negativas as amostras nas quais se observou a formação de um ponto no fundo da placa e positivas as amostras onde não houve a formação do ponto.

Realizou-se a triagem dos animais com o DAT na diluição de 1:40 e o ELISA. Em uma outra etapa, todos os animais positivos e indeterminados em ambos os testes foram testados novamente com o DAT na diluição 1:100 e 1:200. Por não existirem ainda testes padronizados para equinos, utilizou-se o ponto de corte como titulação de 1:200, a fim de maximizar a especificidade e sensibilidade do DAT, conforme descrito por Lopes et al., (2013).

Análise estatística

As análises foram obtidas com o auxílio dos softwares EpiInfo 3.5.4 (Center for Disease Control – CDC, Atlanta, EUA) e OpenEpi (DEAN; SULLIVAN; SOE, 2013).

Para descrição dos dados foram utilizadas estatísticas de frequência absoluta (n) e relativa (%). O teste do qui-quadrado foi aplicado para a avaliação da associação entre a soropositividade e as características individuais observadas nos animais e local de moradia. E, a intensidade da concordância entre os dois métodos diagnósticos utilizados foi avaliada pelo método Kappa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anticorpos anti-*Leishmania infantum* foram detectados em 17,6% (29/165) das amostras de soro equino avaliadas pelo método ELISA (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência absoluta (FA), relativa (FR) e Intervalo de Confiança (IC) das amostras de equinos obtidas entre os anos de 2016 e 2017 no município de Araguaína - TO, testadas para *Leishmania infantum* pelo teste Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

CLASSIFICAÇÃO/RESULTADO	FA (n)	FR (%)	IC (%)
INDETERMINADO	10	6,1	2,9-10,9
REAGENTE	29	17,6	12,1-24,3
NÃO REAGENTE	126	76,4	69,1-82,6
TOTAL	165	100	-

Essa soroprevalência foi maior do que a observada por Truppel et al., (2014) em equídeos do município do Paraná, que encontraram frequência de 11% (25/227), por Feitosa et al. (2012), em equinos de tração da cidade de Araçatuba-SP que obtiveram 14,59% (68/466) e por Cardoso; Mendão; Madeira de Carvalho (2012) em Portugal, avaliando gatos, que descreveram 2,85% (9/316). Porém, foi inferior a determinada por Mukhtar et al. (2000)

no Sudão, que verificaram a presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em 69% dos mueres avaliados para leishmaniose visceral. É importante dar enfoque ao fato de que o valor encontrado nesse estudo foi superior também ao descrito por AMARO (2016), no mesmo município, que registrou 16,2% de prevalência para leishmaniose visceral canina, pelo teste de ELISA, entre os anos de 2007 e 2014.

A presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum* indica que o sistema imune do animal teve contato prévio com o protozoário, ou seja, evidencia a presença do parasita e a transmissão do mesmo nas áreas de estudo (TRUPPEL et al., 2014). Tal fato permite inferir, assim como fez Aguillar et al. (1989); Feitosa et al. (2012); Kouam et al. (2010), que os equinos são capazes de se infectar, porém não é possível afirmar ainda qual o real papel da espécie na transmissão das leishmanioses, que pode ser de “apenas” servir como fonte de alimentação para os vetores ou participar de fato do ciclo epidemiológico da doença. Estudo desenvolvido na Espanha por De Colmenares et al. (1995), comprovou que o flebótomo (*Phlebotomus perniciosus*) se alimenta do sangue equino e, por isso, não se pode excluir o fato dos equinos participarem da cadeia epidemiológica da *L. infantum*.

Independente do papel que será atribuído a eles em futuro próximo, acredita-se que a espécie deve ser investigada, pois contribui de uma forma ou outra, seja pela propagação do vetor seja da enfermidade.

Embora estudos tenham sugerido que a resposta imune humoral dos equinos à *L. infantum* é fraca quando comparada a de caninos (FEITOSA et al., 2012; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006), alguns animais soropositivos da presente pesquisa apresentaram títulos no ELISA até duas vezes (ou um pouco mais) acima do ponto de corte da reação. Esse fato sugere que, assim como identificado nos cães, percebe-se uma titulação elevada, o que confirmaria a infecção (FEITOSA et al., 2012; PALTRINIERI et al., 2010). Por empregar-se a zona cinzenta que classifica a amostra como indeterminada, já elucidada no material e métodos, não há dúvidas quanto às amostras classificadas como reagentes. Todas as inseridas nesse grupo, tiveram titulação acima do ponto de corte.

Por outro lado, explica-se a higidez dos animais inseridos na presente pesquisa e reagente ao ELISA, ao fato da resposta imune celular ser eficaz na espécie analisada (FEITOSA et al., 2012; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006). Essa característica foi também observada em muitos cães e seres humanos saudáveis infectados por *L. infantum*, que apresentaram uma resposta imune específica, sem desenvolverem contudo, sintomas clinicamente identificáveis (ALVAR; CAÑAVATE; MOLINA, 2004).

Ao mesmo tempo que não há evidência direta de que o flebótomo transmita a *Leishmania* para os equinos, estudo aponta que o vetor não é espécie-específico (BONGIORNO et al., 2003), ou seja, em áreas endêmicas onde o equino coabita com cães, este ficará em exposição frequente a *L. infantum*, desenvolvendo conseqüentemente resposta imune humoral e celular, sem manifestar sinais (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006). Todos os animais utilizados na presente pesquisa viviam em área endêmica e coabitavam com outros hospedeiros da *L. infantum*, como o cão e/ou o gato.

Quanto ao DAT, anticorpos anti-*Leishmania infantum* foram detectados em 3,3% (2/61) (1:200) das amostras analisadas (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência absoluta (FA), relativa (FR) e Intervalo de Confiança (IC) das amostras de equinos obtidas entre os anos de 2016 e 2017 no município de Araguaína - TO, testadas para *Leishmania infantum* pelo Teste de Aglutinação Direta (DAT) em diferentes diluições.

RESULTADO/DILUIÇÃO	1:40	1:100	1:200
POSITIVO			
FA (n)	25	4	2
FR (%)	16,7	6,6	3,3
IC (%)	11,1-23,6	1,8-15,9	0,4-11,3
NEGATIVO			
FA (n)	125	57	59
FR (%)	83,3	93,4	96,7
IC (%)	76,4-88,9	84,1-98,2	88,7-99,6

Lopes et al. (2013) detectaram frequência relativa de positividade de 4% (7/173) em equinos para *L. infantum*, sendo que na diluição 1:200 esse número reduziu para 2,86% (5/173), abaixo do encontrado no estudo em tela. Aharonson-Raz et al. (2015) e Kouam et al. (2010) pesquisando em Israel equídeos, obtiveram soroprevalência de 1,4% e 0,3%, respectivamente.

Similarmente Cardoso; Mendão; Madeira de Carvalho (2012) observaram valores menores que 5% em cães e Cardoso et al. (2010) de 1,9% em gatos domésticos, ambos realizados na mesma região de Portugal.

Cardoso et al. (2010); Fernández-Bellon (2006); Lopes et al. (2013) e WHO (2010) explicam essa baixa soropositividade detectada no DAT ao fato de que em áreas endêmicas a prevalência de infecção subclínica em equinos é maior do que a clínica, assim como já observado em cães, gatos e humanos.

A Tabela 3 refere-se aos fatores de risco analisados. Pode-se averiguar que não houve associação significativa entre o sexo ($P=0.896$), idade ($P=0,695$), raça ($P=0.198$), local de moradia ($P=0,732$) e a soropositividade para leishmaniose visceral no teste de ELISA em equinos de Araguaína. Apesar da não correlação, na presente investigação identificou-se maior frequência em machos (21/154), adultos (102/154), da raça Quarto-de-Milha (12/154), da zona rural (19/154) de Araguaína-TO.

Tabela 3 – Risco relativo (RR) de equinos do município de Araguaína - TO soropositivos para *Leishmania infantum* no teste de ELISA.

Fatores de risco	FA ^a	FR (%) ^b	RR ^c	IC (95%) ^d	P
Sexo					
Macho	113	21 (18,6)	0,942	0,380-2,330	0,896
Fêmea	41	8 (19,5)	0,942	0,380-2,330	0,896
Idade					
Jovem	58	10 (17,2)	0,844	0,362-1,968	0,695
Adulto	96	19 (19,8)	0,844	0,362-1,968	0,695
Local de Moradia					
Zona urbana	49	10 (20,4)	1,161	0,494-2,727	0,732
Zona Rural	105	19 (18,1)	1,161	0,494-2,727	0,732

^aFrequência absoluta; ^bFrequência relativa; ^cRisco Relativo (Odds Ratio); ^dIntervalo de confiança

Aharonson-Raz et al. (2015) em Israel trabalhando com equinos e pelo DAT, Truppel et al. (2014) avaliando equídeos no Estado do Paraná pelo teste ELISA, Lopes et al. (2013) com cavalos pelo método de DAT em área endêmica de Portugal e Oliveira et al. (2017) analisando equídeos de Belo Horizonte pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) não encontraram também essa correlação.

Chama atenção o fato de não existir diferença entre a zona rural e urbana, demonstrando a expansão da leishmaniose para os grandes centros. Cardoso et al., (2010) também alertaram para tal fato em sua pesquisa. No entanto, a maior frequência foi na zona rural e isso provavelmente está relacionado à maior taxa de exposição a vetores nesse ambiente (Cardoso et al., 2010).

A medida Kappa de 0,029 revelou baixa concordância entre os dois testes, divergindo do exposto por Cardoso et al., (2010) que ao determinarem um valor kappa de 0,80, afirmaram a concordância substancial entre os dois testes (DAT e ELISA) no diagnóstico da leishmaniose visceral em gatos. Por isso, este resultado indica a necessidade de melhor avaliar

os métodos de diagnóstico sorológico a fim de se identificar o mais sensível e específico e, portanto, mais confiável para o diagnóstico da enfermidade em equinos.

CONCLUSÃO

A taxa de soroprevalência encontrada pelo método de ELISA em equinos da zona rural e urbana de Araguaína sugere que esses animais estavam expostos ao patógeno e que poderiam estar em risco de apresentar leishmaniose. Ainda, que fatores analisados não tem associação como fator de risco para a leishmaniose e, que são necessários mais estudos para avaliar os métodos diagnósticos da leishmaniose visceral equina. Devido à presença em áreas endêmicas destes animais positivos percebe-se a necessidade de mais estudos para definir o papel dos equinos no ciclo epidemiológico da LV, assim como padronizar testes diagnósticos para esta enfermidade.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F., DEANE, L. M. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, n.4, p. 471-472, Oct./Dec. 1986.

AGUILLAR, et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 1, p. 19-28, 1989.

AHARONSON-RAZ, et al. Low Seroprevalence of *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in the horse population in Israel. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 12, p. 726-731, 2015.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, v.7, n.5, p.1-12, 2012.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1–88. 2004.

AMARO, A.Y.G. **Situação epidemiológica da leishmaniose visceral humana e da infecção canina na zona urbana de Araguaína – TO, 2007 a 2014**. 70f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

BARBOSA-SANTOS, et al. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a Mare (*Equus caballus*) immunotherapy and chemotherapy assays. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol.89, n.2, p.217-220, abr./jun, 1994.

BONGIORNO, et al. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. **Acta Tropica**, v. 88, p. 109–116, 2003.

BRANDÃO-FILHO, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.97, p.291-296, 2003.

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

BRITO, et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2012

CARDOSO, L.; MENDÃO, C.; MADEIRA DE CARVALHO, L. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma spp.* and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal – a national serological study. **Parasites & Vectors**, v.5(62), 2012.

CARDOSO, et al. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. **Veterinary Parasitology**. v. 174, p. 37-42, 2010.

DANTAS – TORRES, F; Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**. v.2 (Suppl I), 2009.

DEAN, A.G.; SULLIVAN, K.M.; SOE, M.M.. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Healthh, Versão. www.OpenEpi.com, atualizado 06/04/2013.

DE COLMENARES, et al. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera:Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. **Journal of Medical Entomology**. v. 32, p. 229-233, 1995.

ESCOBAR, T. A. **Presença de Leishmania sp. em equinos de zona urbana de Uruguaiana, Rio Grande do Sul**. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2015.

FEITOSA, et al. Nota prévia: Estudo soropidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 500-502, 2012.

FERNÁNDEZ-BELLON, et al. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Veterinary Pathology**, v. 135, p. 181-185, 2006.

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

HARITH, et al. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, p.583-36, 1986.

KOUAM, et al. Seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1/2, p. 170–175, 2010.

LIMA, C.A. et al. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: uma revisão. **PUBVET**, Londrina, v.7, v. 25, Ed. 248, Art. 1641, Suplemento 1, 2013.

LOPES, et al. Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in horses from the north of Portugal. Short report. **Parasites & Vectors**, v. 6:178. 2013.

MUKHTAR, et al. Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 33–36, 2000.

OLIVEIRA, et al. Seroepidemiology of *Leishmania* spp. in equids from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.47: 05, e20160697, 2017.

PALTRINIERI, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

RAMOS-VARA, J.A, et al. Cutaneous leishmaniasis in two horses. **Veterinary Pathology**. v.33, p.731–734, 1996.

ROLÃO, et al. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. **Parasite**. v.12, p.183–186, 2005.

SÁ, R. A.; BERTOLIN, A. O. Diagnóstico situacional das condições ambientais nos três bairros de maior incidência para *leishmaniose visceral* em Araguaína, Tocantins. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 21, n. 1, p. 56-67, 2015.

SANTOS, et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12: p. 315-317, 1998.

SILVA, et al. Leishmaniose visceral (calazar) na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil: evolução e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p.359-68, 1997.

SOARES, et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Short communication. **Veterinary Parasitology**. v.197, p.665– 669, 2013.

TOLEZZANO, J. E. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p.427–434, 1994.

TRUPPEL, et al. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? **Plos One**. v.9, n.4, e.93731, 2014;

World Health Organization (WHO). **Control of the leishmaniases**, WHO Technical Report Series 949. Geneva: World Health Organization; 2010.

5. CONCLUSÃO

A partir deste estudo foi possível diagnosticar a presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em equinos do município de Araguaína – TO, o que significa que em algum momento estes animais tiveram contato com o protozoário. Devido à presença em áreas endêmicas destes animais positivos percebe-se a necessidade de mais estudos para definir o papel dos equinos no ciclo epidemiológico da LV, assim como padronizar testes diagnósticos para esta enfermidade.

REFERÊNCIAS

AHARONSON-RAZ, K. et al.. Low Seroprevalence of *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in the horse population in Israel. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, s. l., v.15, n.12, p. 726-31, 2015.

ALVAR, J. et al.. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, v.7, n.5, p.1-12, 2012.

ASHFORD, D. A. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, v. 59, p. 53-57, 1998.

BARBOSA-SANTOS, et al. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a Mare (*Equus caballus*) immunotherapy and chemotherapy assays. **Memórias Instituto Oswald Cruz**, Rio de Janeiro, vol.89, n.2, p.217-220, abr./jun, 1994.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.10, p.1097-1106, 2007.

BEVILACQUA, et al. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.1, 2001.

BRANDÃO-FILHO, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraí, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.97, p.291-296, 2003.

BRAGA, M. D. M. et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel de filtro. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 5, p. 419-424, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Epidemiologia. Nota Técnica. **Vacina Anti-Leishmaniose Visceral Canina – Leishmune®**, Brasília, 2005.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 2011a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica nº48/2011: **Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde**. Sec. Vig. Saúde, Brasília, 2011b.

BRASIL, Portal da Saúde – SUS. **Situação Epidemiológica / Dados**. 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-iv>>. Acesso em: 05 ago. 2017.

BRITO, et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.45, n.4, 2012.

CERQUEIRA, et al. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, n.6, Dec. 2003.

CORTÉS, et al. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, n.37, p.683-693. 2007.

CORTES, S. J. C. **Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal**. 2008. 163p. Tese (Doutorado em Ciência Biomédicas) - Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

COSTA, C.H.N.; VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle de leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, p.223-8, 2001.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal Infectious Diseases**, v.186, n.__, p.1314-1320, 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.417-423, 1996.

DIETZE, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v.25, p.1240-1242, 1997.

DOTTA, S.C.N.; LOT, R.F.E.; ZAPPA, V. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, n.12. jan. 2009.

ESCOBAR, T. A. **Presença de Leishmania sp. em equinos de zona urbana de Uruguaiana, Rio Grande do Sul**. 2015. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2015.

FEITOSA, et al. Estudo soroepidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 500-502, 2012.

FERREIRA, S. A. **Avaliação do potencial de amostras clínicas de coleta não invasiva para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina por PCR**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012

FREITAS, et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.159-67, 2006.

GOMES, et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.144, p. 234-241, 2007.

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

HARITH, et al. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with 1FAT and ELISA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.81, p.603- 606, 1987.

KOEHLER, et al. Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**. v.109, p.9–17, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* Species. In: **Microbiology Infections**. Ed. **Topleys & Wilson's**. 9th ed., chapter 13, p. 241-266, 1998.

LEMOS, et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. **Acta Tropica**, v.107, n.2, p.205-7, 2008.

MAIA, et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **Veterinary Journal**, v.179, n._, p.142-144, 2009.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis?. **Trends in parasitology**, v.27, n.8, p.341-344, 2011.

MAIA-ELKHOURY, A.N.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saude Pub.*, v.24, n.1, p.2941-2947, 2008.

MANCIANTI, et al. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.59, n.1, p.13-21, 1995.

MAURICIO, I.L., STOHARD, J.R., MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v.16, n.5, p. 188-189, 2000.

METTLER, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic- dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.5515- 5519, 2005.

MILES, et al. Canine Leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: CANINE Leishmaniasis: an update. Proceedings of International Canine leishmaniasis Forum Barcelona, Spain. (Ed. R. Killick-Kendrick), Wiesbaden: Hoeschst Roussel Vet., p. 46-53, 1999.

MOREIRA, et al. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Veterinary Parasitology**, v.122, n.4, p.245 – 252, 2004.

MÜLLER, et al. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. **Veterinary Parasitology**, v.166, p.346–351, 2009.

MURRAY, et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v.366, p.1561-1577, 2005.

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 8ª Ed. Ed. Atheneu. p. 55-73, 1991.

NUNES, et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**. v.170, p.131-133, 2010.

OLIVA, et al. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.4, p.1318-22, 2006

OLIVEIRA, et al. Seroepidemiology of *Leishmania* spp. in equids from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.47, n.5, 2017.

PALATNICK DE SOUZA, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, p.510-7, 2001.

PENNA, H.A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Bras Méd.*v.48, p.949-50, 1934.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.; DYE, C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. **Parasitology**, v.115, p.143-56, 1997.

RAMOS-VARA, et al. Cutaneous Leishmaniasis in Two Horses. **Veterinary Pathology**, s.l., v.33, p. 731-734, 1996.

ROLÃO, et al. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. **Parasite**, s.l., v.12, p.183-186, 2005.

ROSÁRIO, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n.100, p.197-203. 2005.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, London, v.2, p.1261-1261, 1903.

ROSYPAL, et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in a experimentally infected beagle. **Journal of Parasitology**, v.91, p.970-972, 2005.

SANTOS, et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12, p.315-317, 1998.

SCHUBACH, et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 165-167, 2004.

SHAW, J.J. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A minireview. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.541-547, 2007.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Tropical – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n.1, p.20, 2007.

SILVA, et al. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.166, p.159-162, 2009a.

SILVA, et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.55-59, 2009b.

SOARES, D. Aumento de casos de leishmaniose em Araguaína faz MPE reiterar pedido de urgência em ação judicial. **Ministério Público do Tocantins**. 2017. Disponível em: <<https://mpto.mp.br/web/portal/2017/05/12/aumento-de-casos-de-leishmaniose-em-araguaína-faz-mpe-reiterar-pedido-de-urgência-em-acao-judicial>>. Acesso em: 30 jul. 2017.

SOARES, I. R. **Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes para *Leishmania sp.* no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. 2012. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012. Disponível em:

<<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-95ZGQZ>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

SOARES, et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) 17 infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania 18 infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3, p. 19 665-669, 2013.

SOUZA, et al. Testes diagnósticos para leishmaniose visceral – Atualidade e perspectivas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano XI, n. 21, jul. 2013.

VIEIRA, J.B.; COELHO, G.E. Visceral leishmaniasis or kala-azar: the epidemiological and control aspects. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v.31 Supl. 2, p. 85-92, 1998.

World Health Organization (WHO). **Control of the leishmaniases**, WHO Technical Report Series 949. Geneva: World Health Organization; 2010.