JULIO CESAR PEREIRA SPADA

**EQUINOS COMO HOSPEDEIROS DE *LEISHMANIA* SPP. E
ESTUDO DA FAUNA DE FLEBOTOMÍNEOS NOS MUNICÍPIOS DE
ANDRADINA E ILHA SOLTEIRA, ESTADO DE SÃO PAULO**

São Paulo

2019

JULIO CESAR PEREIRA SPADA

**Equinos como hospedeiros de *Leishmania* spp. e estudo da
fauna de flebotomíneos nos municípios de Andradina e Ilha
Solteira, estado de São Paulo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses

Orientador:

Prof.^a Dr.^a Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3785
FMVZ

Spada, Julio Cesar Pereira
Equinos como hospedeiros de *Leishmania* spp. e estudo da fauna de flebotomíneos nos municípios de Andradina e Ilha Solteira, estado de São Paulo / Julio Cesar Pereira Spada. – 2019.
101 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

Coorientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida Starcke Buzetti.

1. ELISA. 2. Leishmaniose. 3. *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis*. 4. PCR. 5. RIFI. I.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação Clínica, Laboratorial e Xenodiagnóstico de Equinos Naturalmente Infectados por *Leishmania infantum*", protocolada sob o CEUA nº 1380220517 (ID 003927), sob a responsabilidade de **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e equipe; Julio Cesar Pereira Spada** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/08/2017.

We certify that the proposal "Clinical, Laboratory and Xenodiagnostic Evaluation of Horses Naturally Infected by *Leishmania infantum*", utilizing 200 Equines (males and females), 20000 Equines (males and females), protocol number CEUA 1380220517 (ID 003927), under the responsibility of **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira and team; Julio Cesar Pereira Spada** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/03/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2017** a **12/2020**

Área: **Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 120 meses**

N: **200**

Linhagem: **Sem distinção de raça**

Peso: **180 a 1000 kg**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **A29**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 360 dias**

N: **20000**

Linhagem: **Lu. longipalpis**

Peso: **1 a 2 g**

Local do experimento: Partes dos experimentos dar-se-ão em campo no momento das coleta de amostras biológicas (municípios de Ilha Solteira e Andradina), após, o material biológico coletado seguirá para o laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP), onde parte das amostras serão congeladas e outra parte utilizada para testes específicos do projeto como por exemplo RIFIs e parte para o laboratório clínico da Fundação Educacional de Andradina para exames bioquímicos e hematológicos. As últimas etapas dos experimentos serão na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) localizada em Pirassununga.

São Paulo, 09 de abril de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FORMULÁRIO DE ALTERAÇÃO DE DADOS

CPF: 03639610628 » 03639610628 Finalidade: Pesquisa » Pesquisa

Título da proposta (Português): Avaliação Clínica, Laboratorial e Xenodiagnóstico de Equinos Naturalmente Infectados por Leishmania infantum » Equinos como hospedeiros de Leishmania spp. e estudo da fauna de flebotomíneos nos municípios de Andradina e Ilha Solteira, estado de São Paulo

Título da proposta (Inglês): Clinical, Laboratory and Xenodiagnostic Evaluation of Horses Naturally Infected by Leishmania infantum » Equines as hosts of Leishmania spp. and the study of sand flies fauna in the municipalities of Andradina and Ilha Solteira, state of São Paulo.

Responsável: Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira » Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

Celular: 19-997656477 » 19-997656477 e-mail: tricia@usp.br » tricia@usp.br

CV. Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5061616950314737> » <http://lattes.cnpq.br/5061616950314737>

Área: Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses » Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses Campus: FMVZ - campus Pirassununga » FMVZ - campus Pirassununga

Experiência: Sim : Sanos » Sim : 5anos Treinamento: Não » Não

Vínculo: Professor doutor » Professor doutor

Obj. Acadêmico: Doutorado » Doutorado Patente: Não » Não

Patrocínio: Ausente » Ausente Patrocinador: »

Chefe de Depto: José Soares Ferreira Neto » José Soares Ferreira Neto e-mail: vpsfmvz@usp.br » vpsfmvz@usp.br

Resumo: Gostaríamos de solicitar o aumento no número de cavalos de 200 à 235 animais, bem como a alteração do título, pelo motivo de estarmos retirando do projeto a realização do xenodiagnóstico. As demais análises serão mantidas e nenhum outro procedimento será realizado com os animais.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SPADA, Julio Cesar Pereira

Título: Equinos como hospedeiros de *Leishmania* spp. e estudo da fauna de flebotomíneos nos municípios de Andradina e Ilha Solteira, estado de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe **Sueli de Fátima Pereira Spada** (*in memoriam*), que teve como sonho estudar e se graduar, porém por ironia do destino não foi possível realiza-lo, abdicando dele pelo enorme amor por sua família. Ela sempre esteve comigo, me apoiando e me dando forças. Não foi fácil chegar aqui sem você, mas tenho certeza que de onde estiver está cuidando de mim, me consolando, me guiando e amparando, e com toda certeza está feliz por mais essa etapa que está chegando ao fim. A Senhora sempre estará no meu coração. Obrigado por tudo. TE AMO ETERNAMENTE!

Ao meu pai **Carlos Cesar Spada**, homem forte e correto, que me espelho sempre. Pessoa de fibra, antigamente um simples pai, hoje pai e mãe. Pessoa que não mede esforços pelo bem dos filhos, principalmente pela educação, sempre nos lembrando que será a maior herança que nos deixará. Obrigado por ser meu esteio e nunca me deixar desistir. Quando o caminho parece difícil me pega pela mão, quando não nos braços, e me faz seguir em frente. Te devo uma vida inteira. TE AMO!

À minha irmã **Fernanda Pereira Spada**, minha amiga, confidente e companheira, por sempre estar me apoiando em todos os momentos, fazendo da minha vida muito mais completa e divertida. Obrigado por sempre estar ao meu lado. Como o Pai, você está sempre me levantando e não me deixando desistir nunca. Juntos já fizemos a promessa de pegar todas as pedras que encontrarmos em nosso caminho e construir um castelo. Me lembro daquela menininha chorona e de tudo que sofremos juntos, e hoje tenho orgulho imenso da grande médica veterinária que se tornou. TE AMO GORDA! Sempre estarei aqui por você.

Ao **Diogo Tiago da Silva**, meu melhor amigo e irmão, que o mestrado me deu, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Por não medir forças em me ajudar, mesmo que deixando seus afazeres de lado. Obrigado pelas risadas, pela amizade, pelas besteiras, pelas viagens que fizemos até Pirassununga, pelos bons e principalmente os maus momentos. Você mais que ninguém sabe como foi difícil chegar até aqui, porém como você meu amigo estou vencendo mais essa etapa e aceito até mesmo um pós doc.

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira**, grande profissional e exemplo de ser humano, cujo coração é enorme. Sou grato por tudo e feliz por ter sido seu orientado. Poucos são os orientadores, que literalmente orientam e ao mesmo tempo são mães. Mães são assim, orientam sempre e quando necessário puxam a orelha, afinal os puxões são necessários e nos faz amadurecer! Serei Sempre Grato.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, por ter me guiado e permitido chegar até aqui, por nunca ter me abandonado e sempre me amparado nos momentos difíceis. Assim, junto a você, aprendi que tudo fica mais fácil e que sempre me dá muito mais do que sou merecedor.

Meus singelos agradecimentos a todas as pessoas e instituições descritas abaixo, que sem elas não seria possível o desenvolvimento do presente trabalho:

À instituição FAPESP (Processo nº 2016/08018-4), que ajudou a financiar o projeto de pesquisa, sem ela não teríamos tal qualidade e quantidade de dados analisados.

À minha irmã, Fernanda Pereira Spada pela amizade, apoio emocional bem como nas coletas de amostras biológicas e coletas de flebotomíneos. Obrigado por nunca me deixar desistir.

Ao meu pai, Carlos Cesar Spada, por sempre estar ao meu lado e junto com minha irmã não me deixar desistir.

Ao Prof.º Me. Diogo Tiago da Silva (Firmeza), por estar comigo em todas as etapas do desenvolvimento da pesquisa, desde as coletas de material biológico até as análises estatísticas. Obrigado por estar comigo em todos os momentos.

À Maria Luana Alves (Bebe), juntamente ao Diogo, por estar comigo em todas as etapas do desenvolvimento da pesquisa. Obrigado por estar comigo em todos os momentos. Não esquecerei jamais as nossas “presepadinhas”.

Ao Prof.º Dr Fábio dos Santos Nogueira, meu mestre e amigo, pelo apoio ao projeto, amizade e conselhos, bem como por acreditar em mim e em meu potencial. Sem você tudo teria sido mais difícil. Serei sempre grato!

À Fundação Educacional de Andradina, seus gestores, coordenadores e diretores, por sempre me apoiar e dar suporte para o desenvolvimento da pesquisa, oferecendo suas instalações físicas e laboratórios.

Aos alunos do curso de medicina veterinária da Fundação Educacional de Andradina, pela ajuda nas coletas de material biológico. Em especial agradeço, Robson Dourado, Henrique Acunha Urzulin, Mariana de Souza Venholi, Mariana Lopes Luvezuti e Henrique Antonio de Freitas pelas ajudas na coleta de flebotomíneos.

À supervisora do Hospital Veterinário da Fundação Educacional de Andradina, Prof.^a Ma. Ana Paula Peres Lopes Romariz e supervisora do laboratório clínico do hospital Cícera Galdina da Silva Brito, pelas análises hematológicas.

Ao Henrique César de Jesus Ferreira, amigo/irmão que o doutorado propiciou. Obrigado por todas as vezes que me disponibilizou e disponibiliza um cantinho. Sem você fazer as disciplinas seria muito difícil. Levarei nossa amizade pela eternidade.

À Prof.^a. Dr.^a. Wilma Aparecida Starke Buzetti pelo apoio a pesquisa, cedendo o espaço físico do seu laboratório e equipamentos para o desenvolvimento da mesma na Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Ilha Solteira, SP.

À estagiarias do laboratório LIP AIS, Nathália Frigo de Almeida Paula, Vanessa Capeletti Bernardes, Carla e Denise pela ajuda nas coletas de material biológico e análises sorológicas.

Aos amigos que o doutorado propiciou, Ana Flávia Rocha da Silva, Alex Kazuo Yamaguchi, Geovanna Vioti e Nuno Wolfgang Balbini Pereira, obrigado pela amizade e pela colaboração com a pesquisa.

À Julia Cristina Benassi, pela amizade e pelos conhecimentos adquiridos. Sempre que falar em PCR lembrarei de você. Serei sempre grato.

Ao João Augusto Franco Leonel, pela amizade e pela colaboração com as análises dos dados, em especial pela identificação dos flebotomíneos. Obrigado pelas estadias quando fossem necessários.

Ao Prof.^o Dr Rodrigo Martins Soares, pela colaboração a pesquisa, sempre estando pronto para auxiliar, quando solicitado.

À Dr.^a Neli Cristina Belmiro dos Santos, pelo fornecimento dos dados climáticos referente ao município de Andradina.

Ao Prof.^o Me. Rodrigo de Oliveira Medeiros, pela amizade e conselhos. Obrigado por sempre estar ao meu lado, principalmente me apoiando e quando necessário para “puxar minhas olhas”. Obrigado Miguxo, você faz parte de mais essa etapa concluída em minha vida.

A todos os proprietários e tutores dos cavalos, que nos receberam e participaram do projeto, nos autorizando coletar o material biológico de seus animais e instalar as armadilhas para a captura dos flebotomíneos durante o período de estudo.

Aos cavalos que foram de suma importância para a pesquisa, meu respeito e gratidão

Á todos agradeço e dedico este trabalho.

“Nunca se deve consentir em rastejar quando se sente um impulso para voar. “

- Helen Adams Keller

RESUMO

SPADA, J. C. P. **Equinos como hospedeiros de *Leishmania* spp. e estudo da fauna de flebotomíneos nos municípios de Andradina e Ilha Solteira, estado de São Paulo**. 2019. 101f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Objetivou-se a detecção de DNA e anticorpos anti-*Leishmania* spp. em equinos e levantamento da fauna de flebotomíneos nos municípios de Andradina e Ilha Solteira, São Paulo. Para isso, 235 equinos provenientes de Andradina, Araçatuba, Bauru e Ilha Solteira passaram por exames clínicos e laboratoriais. Os flebotomíneos foram coletados de janeiro de 2017 a dezembro de 2018, por meio de armadilha do tipo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) onde 6 armadilhas foram instaladas em Andradina e 6 em Ilha Solteira. As coletas foram realizadas mensalmente durante três dias consecutivos. Nos equinos, pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) foi constatada soropositividade de 60,6% (137/226) e pela técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), soropositividade de 89,4% (202/226). Pela PCR convencional (cPCR) utilizando o *primer* 13A/13B avaliando amostras do sangue (cPCR-SG), constatou-se 3,4% (8/235) de positivos, já na avaliação do suabe conjuntival (cPCR-SC), 2,5% (6/235) foram positivos. Não foram encontrados animais positivos avaliados pelo cPCR utilizando o *primer* LIT5R/L5-8S (ITS-1). Na correlação de animais positivos com os achados hematológicos e bioquímicos, houve correlação no aumento da concentração plasmática de globulinas e diminuição de albuminas no grupo de animais positivos. Já na correlação entre a soropositividade dos cavalos e contato com cães com leishmaniose visceral e soropositividade compresença de lesão dermatológica não encontramos correlação. Em relação aos flebotomíneos, a densidade total foi de 64 machos e 50 fêmeas capturados em Ilha Solteira e 32 machos e 16 fêmeas em Andradina. Quando realizada a caracterização da espécie, em Andradina foram identificadas 6 espécies distintas de flebotomíneos e Ilha Solteira 11 espécies, dentre todas se destacando a maior densidade de *Lu. (Lu) longipalpis*, 43,75% e 28,10% em ambos os municípios respectivamente. Os resultados da presente pesquisa alertam para a presença de equinos infectados em áreas endêmicas, bem como da presença ativa de vetores incriminados na transmissão das leishmanioses nos locais estudados.

Palavras-chave: 1. ELISA. 2. Leishmaniose. 3. *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*. 4. PCR. 5. RIFI.

ABSTRACT

SPADA, J. C. P. **Equines as hosts of *Leishmania* spp. and the study of sand flies fauna in the municipalities of Andradina and Ilha Solteira, state of São Paulo.** 2019. 101f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The aim of this study was to detect DNA and anti-*Leishmania* sp. in equines and a fauna survey of sand flies in the municipalities of Andradina and Ilha Solteira, state of São Paulo. For this, 235 horses from Andradina, Araçatuba, Bauru and Ilha Solteira underwent clinical and laboratory tests,. Sandflies were collected from January 2017 to December 2018 by means of a CDC (Center for Disease Control and Prevention) trap, where 6 traps were installed in Andradina and 6 in Ilha Solteira. Collections were performed monthly for three consecutive days. By ELISA, a seropositivity of 60.6% (137/226) was detected and by Indirect Immunofluorescence Reaction (IFAT), 89.4% (202/226). By conventional PCR (cPCR) using primers 13A / 13B ,3.4% (8/235) blood samples were positives (cPCR-SG), and (6/235) were positives in conjunctival swab (cPCR-SC). No positive animals were found by cPCR using primers LIT5R / L5-8S (ITS-1). Regarding the comparison of hematological and biochemical findings between positive and negatives animals, there was correlation in the increase of plasma globulin concentration and decrease of albumins in the group of positive animals. The correlation between horses seropositivity and contact with dogs with visceral leishmaniasis and seropositivity with presence of dermatological lesions, no correlation was found. Regarding to sand flies, the total density was 64 males and 50 females caught in Ilha Solteira and 32 males and 16 females in Andradina. When characterization of the species was carried out, six species of sandflies were identified in Andradina and Ilha Solteira 11 species, among them the highest density of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis*, 43.75% and 28.10% in both municipalities, respectively. The results of the present study point out the presence of infected horses in endemic areas as well as an active presence of vectors incriminated in the transmission of leishmaniasis in the studied areas.

Keywords: 1. ELISA. 2. IFAT. 3. Leishmaniasis. 4. *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis*. 5. PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem ilustrando a localização geográfica das 6 armadilhas luminosas CDC para captura flebotomíneos, no município de Ilha Solteira, estado de São Paulo.....45
- Figura 2 - Imagem ilustrando a localização geográfica das 6 armadilhas luminosas CDC para captura flebotomíneos, no município de Andradina, estado de São Paulo.....46
- Figura 3 - Imagem ilustrando a localização das armadilhas luminosas CDC para captura flebotomíneos, bem como as características das propriedades onde foram alocadas as armadilhas, como grande presença de lixo, vegetação e animais como cães e galinhas.....47
- Figura 4 - A: égua apresentando dermatite na região da face com alopecia e presenças de áreas crostosas. B: égua apresentando magreza (escore 2) e ferida traumática causada pela tração de lixo. C: égua durante trabalho, evidenciando escore 3. D: cavalo com extrema magreza (escore 0), podendo ser evidenciado alopecia em face.52
- Figura 5 - Número de cavalos positivos ao ELISA indireto de acordo com os níveis ELISA (NE) e o ponto de corte ≥ 3 (N= 226).....54
- Figura 6 - Número de cavalos positivos ao RIFI de acordo com titulação realizada onde <40 são os animais negativos. (N= 226).55
- Figura 7 - Número total de cavalos positivos isoladamente no ELISA indireto ou na RIFI (ELISA + RIFI), somente para ELISA, somente para RIFI e simultâneos para ELISA x RIFI (N= 226 cavalos).61
- Figura 8 - Contagem mensal de Flebotomíneos capturados no município de Andradina, durante o período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018, comparados com dados de temperatura média mensal ($^{\circ}\text{C}$) e precipitação pluviométrica (mm). Dados climáticos obtidos do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO).66
- Figura 9 - Contagem mensal de Flebotomíneos capturados no município de Ilha Solteira, durante o período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018, comparados com dados de temperatura média mensal ($^{\circ}\text{C}$) e precipitação pluviométrica (mm). Dados climáticos obtidos da Estação Meteorológica da Área de Hidráulica e Irrigação da UNESP-Campus de Ilha Solteira.67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da análise dos 6 soros de referência negativa, provenientes de cavalos de Mariapoles, São Paulo.	53
Tabela 2 - Níveis ELISA (NE) relacionados à primeira amostragem (N=226 cavalos)	53
Tabela 3 - Número (N) e porcentagem (%) de cavalos positivos e negativos para detecção de anticorpos anti-Leishmania de acordo com os métodos sorológicos utilizados (ELISA indireto ou RIFI).	55
Tabela 4 - Número (N) e porcentagem (%) de cavalos positivos e negativos para detecção de DNA de Leishmania spp. de acordo com os métodos moleculares utilizados (cPCR-SC e cPCR-SC).....	56
Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão da atividade sérica bioquímica analisada em cavalos com sorologia positiva (GI-cavalos) e negativa (GC-cavalos) para Leishmania spp.	57
Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão da atividade sérica bioquímica analisada em dois grupos contendo 6 cavalos positivos (GP-cavalos) e 6 cavalos negativos (GN-cavalos), tanto na RIFI, ELISA, quanto no cPCR-SC simultaneamente para detecção de anticorpos anti-Leishmania spp. e DNA.....	58
Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão da avaliação hematológica em cavalos com sorologia positiva (GI-cavalos) e negativa (GC-cavalos) para Leishmania spp.	59
Tabela 8 - Valores médios e desvio padrão da pesquisa hematológica em dois grupos contendo 6 cavalos positivos (GP-cavalos) e 6 cavalos negativos (GN-cavalo), tanto na RIFI, ELISA, quanto no cPCR-SC simultaneamente para detecção de anticorpos anti-Leishmania spp. e DNA.....	60
Tabela 9 - Análise comparativa (dois a dois) dos métodos de diagnóstico para Leishmania sp em cavalos (número/porcentagem; N°./%): ELISA indireto; RIFI; ELISA, RIFI, 13A/13B-SG, 13A/13B-SC, ITS1-SG e ITS1-SC, realizado em um total 226 cavalos.	62
Tabela 10 - Relação de flebotomíneos (machos e fêmeas) capturados ao longo de 24 meses nas 6 propriedades localizadas no município de Ilha Solteira, SP, período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018.....	64

Tabela 11 - Relação de flebotomíneos (machos e fêmeas) capturados ao longo de 24 meses nas 6 propriedades localizadas no município de Andradina, SP, período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018.....	65
Tabela 12 - Relação de flebotomíneos (machos e fêmeas) identificados conforme a espécie ao longo de 24 meses nas 6 propriedades localizadas no município de Andradina, SP, período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018.	68
Tabela 13 - Relação de flebotomíneos (machos e fêmeas) identificados conforme a espécie ao longo de 24 meses nas 6 propriedades localizadas no município de Ilha Solteira, SP, período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018.	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2. 1 LEISHMANIOSES	21
2. 2 VETORES.....	23
2. 3 CICLO BIOLÓGICO	25
2. 4 HOSPEDEIROS	26
2. 5 LEISHMANIOSE NA ESPÉCIE EQUINA	27
2. 6 DIAGNÓSTICO.....	29
2.6.1. Diagnóstico Clínico.....	29
2. 6. 2 Diagnóstico Imunológico	30
2. 6. 3 Exame Molecular.....	32
2. 7 CASOS DE LEISHMANIOSE NA REGIÃO DE ESTUDO	32
2. 8 MEDIDAS PREVENTIVAS.....	34
3 JUSTIFICATIVA.....	35
4 OBJETIVOS.....	36
4. 1 OBJETIVO GERAL	36
4. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS	37
5. 1 ÁREAS DE ESTUDO	37
5. 2 AMOSTRAGEM DE ANIMAIS.....	37
5. 3 AVALIAÇÃO FÍSICA	38
5. 4 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	38
5. 5 HEMOGRAMA COMPLETO	39
5. 6 REALIZAÇÃO DE BIOQUÍMICA SÉRICA	39
5. 7 EXAMES SOROLÓGICOS	40
5. 7. 1 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)	40
5. 7. 2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	41
5. 8 EXAMES MOLECULARES	42
5. 8. 1 Extração do DNA.....	42
5. 8. 2 Controles Positivos e Negativos.....	42
5. 8. 3 PCR convencional (c-PCR) para detecção de <i>Leishmania</i> spp.	42

5. 8. 4 c-PCR da região de ITS1- rDNA	43
5. 8. 5 Eletroforese	43
5. 8. 6 Controle endógeno da extração	43
5. 9 EXAME PARASITOLÓGICO DIRETO	44
5. 9. 1 Punção Biópsia Aspirativa (PBA)	44
5. 10 CULTURA CELULAR.....	44
5. 10. 1 Cultura de Aspirado de Linfonodo	44
4. 11 LEVANTAMENTO DE FLEBOTOMÍNEOS	45
5. 12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5. 12 ASPECTOS ÉTICOS	49
6 RESULTADOS.....	50
6. 1 ANAMNESE E AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS.....	50
6. 2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	52
6. 2. 1 ELISA indireto e RIFI.....	52
6. 2. 2 cPCR para detecção de <i>Leishmania</i> spp.	55
6. 2. 3 PBA 56	
6. 2. 4 Cultura Celular	56
6. 3 ANÁLISES LABORATORIAIS CORRELACIONADAS A POSITIVIDADE DOS CAVALOS	56
6. 4 ANAMNESE E AVALIAÇÃO CLÍNICA CORRELACIONADAS A POSITIVIDADE DOS CAVALOS.....	60
6. 5 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS	60
6. 6 LEVANTAMENTO DE FLEBOTOMÍNEOS	63
7 DISCUSSÃO	70
8 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICES	96
APÊNDICE A – Ficha Individual e termo de consentimento livre e esclarecimento ..	96
APÊNDICE B – Meio de cultura LIT (<i>Liver Infusion Tryptose</i>) - (250 ml)	99

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários pertencentes ao filo Sarcomastigophora, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). O gênero *Leishmania* é constituído por 30 espécies que infectam vertebrados de diferentes ordens, principalmente de répteis e mamíferos e que são transmitidas por vários invertebrados hematófagos da família Psychodidae (LAINSON, 1983).

Elas apresentam uma ampla distribuição global e a maioria dos casos ocorrem na África, Ásia e Américas, integrando o grupo de doenças tropicais negligenciadas, uma vez que ocorrem nos países mais pobres e atingem as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde, sendo considerada um grave problema de saúde pública e estando listada entre as seis endemias prioritárias em todo o mundo (OPAS, 2019; ZUBEN; DONALÍSIO, 2016; WHO, 2017).

Nas Américas, as leishmanioses estão presentes em 18 países e a forma clínica mais comum é a leishmaniose tegumentar (LT), enquanto a leishmaniose visceral (LV) é a forma mais severa e quase sempre fatal, se não tratada. Além disso, a leishmaniose mucosa/mucocutânea (LMC) possui uma evolução crônica podendo causar deformidades e sequelas. Em 2017, 49.959 casos de LT e LMC foram reportados à Organização Pan-Americana da Saúde (SisLeish – OPAS/OMS), onde 17.526 casos foram reportados pelo Brasil e no período de 2001-2007, foram reportados 59.769 casos de LV, sendo o Brasil o país que mais reportou casos (57.582) (OPAS, 2019).

A LV foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em 1934, quando formas amastigotas de *Leishmania* foram encontradas em cortes histológicos de fígado de pacientes que morreram de suspeita de febre amarela (PENNA, 1934), já a leishmaniose tegumentar americana (LTA) foi confirmada um pouco antes, em 1909 por Lindenberg, que encontrou seus parasitos em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado de São Paulo (LINDEMBERG, 1909).

No Brasil, responsável pela LT, já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.)*

shawi foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017) e pela LV, a espécie *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) (KUHLS et al., 2011).

A principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é pela picada de fêmeas infectadas de dípteros hematófagos da família Psychodidae pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, no Velho e no Novo Mundo, respectivamente (RANGEL; LAINSON, 2003; BATES, 2007). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LT são: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia intermedia*, *Psychodopygus wellcomei* e *Migonemyia migonei* (BRASIL, 2017; GALATI, 2018) e duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da LV: *Lu. (Lu.) longipalpis* e *Lu. (Lu.) cruzi* (BRASIL, 2014).

Em seu padrão de transmissão zoonótico, as leishmanioses, possuem diversos tipos de hospedeiros silvestres (raposa, gambá, roedores) e domésticos (cão, gato), além do homem (QUINNELL; COURTENAY, 2009).

O papel dos cavalos como reservatórios não foi definitivamente confirmado (SOARES et al., 2013), porém, existem estudos evidenciando que equídeos podem ser infectados por diferentes espécies de *Leishmania* e são fontes alimentares preferenciais para flebotomíneos (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae. Apresentam ciclo digenético e, nos hospedeiros vertebrados, é intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear (BATES, 2007). Desencadeia um complexo de doenças com variada sintomatologia e diversidade epidemiológica (DESJEUX, 2004). Os principais vetores são do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (RANGEL; LAINSON, 2003). São consideradas primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antroponose (BRASIL, 2014).

Segundo Lynn; McMaster (2008), a espécie *Leishmania* spp. apresenta duas categorias, a visceral ou tegumentar, com amplo espectro de manifestações clínicas que vai desde cura espontânea, essas na forma tegumentar, à doença fatal na infecção visceral (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Em 2017, foram notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS), 22.145 novos casos, onde desse número, 20.792 casos eram provenientes de sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017). Atualmente as leishmanioses, estão integradas no grupo de doenças infecciosas negligenciadas, ocorrendo nos países mais pobres e atingindo assim as populações mais vulneráveis, sendo aquelas que não dispõem de acesso a serviços de saúde, apresentando ampla distribuição global, com maior número de casos na África, Ásia e Américas (OPAS, 2019).

Segundo a OPAS (2019), nas américas, podemos evidenciar a presença das leishmanioses em 18 países, sendo a LT a mais comum e LV a mais severa, vindo a ser fatal quando não tratada. Também podemos citar a LMC, doença que tem evolução crônica podendo causar deformidades e sequelas, dentre elas, 90% dos casos ocorrem no Estado da Bolívia, Brasil e Peru.

A epidemiologia da LT na Região das Américas é complexa, com variações intra e interespecíficas nos ciclos de transmissão, hospedeiros reservatórios, vetores de flebotomíneos, manifestações clínicas e resposta à terapia, e múltiplas espécies de *Leishmania* circulantes na mesma área geográfica (WHO, 2017).

Há relatos que a LV em humanos tenha sido descrita pela primeira vez na Grécia, em 1835, quando Roser chamou atenção para uma afecção denominada ponos (que quer dizer, em grego, “dor”) que acometia crianças da ilha de Spétsai, a sudeste de Peloponnèse, cuja característica principal era uma esplenomegalia dolorosa (JARRY, 1999). Já a primeira descrição da LT, ocorreu no início do século XX, em 1903, em Massachusetts, nos Estados Unidos, onde James Homer Wright observou formas de protozoários em amostras retiradas de úlcera cutânea de uma criança da Armênia acometida pelo botão do oriente e, na ocasião, propôs o nome de *Welcozoma tropicum* ao parasito, mais tarde renomeado por *Leishmania tropica* (WRIGHT, 1903).

Primeiro caso de leishmaniose relatado no Brasil, foi a de LT em 1909, onde Lindemberg, encontrou parasitos da doença em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado de São Paulo (LINDEMBERG, 1909). Já o primeiro caso no Brasil da LV foi descrito por Migone em 1913. O paciente era um imigrante italiano que vivera muitos anos em Santos, S.P. e após viajar para Mato Grosso, adoeceu, tendo sido diagnosticada a doença no Paraguai (ALENCAR, 1977). Penna (1934), foi o primeiro a diagnosticar a LV no Brasil, quando ao analisar cortes histológicos de fígado de pacientes que morreram com febre amarela provenientes de vários estados do Brasil, encontrou formas amastigotas de *Leishmania* em 41 casos dentre 40.000 viscerotomias examinadas.

Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios, em praticamente todas as regiões do Brasil. Destaca-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Aracatuba (SP), Santarem (PA), Corumba (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camacari (BA), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2014). Os processos de urbanização desordenada, resultando em condições precárias de saneamento; com obras de construção civil, como rodovias e ferrovias e processos migratórios, que facilitam o deslocamento não só de humanos mais também de animais infectados; e principalmente, com a adaptação do vetor a novos

ambientes, além de outros fatores antrópicos, estão relacionados com a expansão da doença (CARDIM et al., 2016).

A LV em humanos é uma doença crônica, sistêmica e quando não tratada pode ser fatal (MARSDEN, 1986). Dada sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (BRASIL, 2014). A população com menor poder aquisitivo é a mais vulnerável à doença. Apesar de existirem métodos diagnósticos e tratamentos específicos, grande número de pessoas carece de condições para acessar esses procedimentos (GONTIJO; MELO, 2004).

2. 2 VETORES

O principal vetor da leishmaniose são insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da LV, sendo a *Lu. (Lu.) longipalpis* que se adapta facilmente a diversos ambientes e temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos (BRASIL, 2014; SILVA, 2010). *Lu. (Lu.) cruzi* tem sido incriminada na transmissão no Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2014; SANTOS et al., 1998). As principais espécies envolvidas na transmissão da LT são: *Bichromomyia flaviscutellata*, *Nyssomyia whitmani*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia intermedia*, *Psychodopygus wellcomei* e *Migonemyia migonei* (BRASIL, 2017; GALATI, 2018).

A atividade dos flebotomíneos é crepuscular e noturna. No intra e peridomicílio, a *Lu. (L.) longipalpis* é encontrada, principalmente, próximas a uma fonte de alimento. Durante o dia, estes insetos ficam em repouso, em lugares sombreados e úmidos, protegidos do vento e de predadores naturais. A identificação de uma espécie vetora e a determinação da taxa de infecção natural do vetor pelo agente etiológico, sobretudo nas regiões endêmicas, são de fundamental importância na entomologia médica (OLIVEIRA-PERERA et al., 2006).

Esses insetos são pequenos, medindo de 1 a 3 mm de comprimento. Possuem o corpo revestido por pelos e são de coloração clara (castanho claro ou cor de palha). São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Estes insetos na fase adulta

estão adaptados a diversos ambientes, porém na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética e as fêmeas alimentam-se também de sangue para o desenvolvimento dos ovos (BRASIL, 2014). Para identificação de machos e fêmeas são consideradas estruturas internas e externas que resistem ao processo de clarificação e permitem a identificação da espécie. Geralmente, para a identificação de fêmeas são considerados os seguintes caracteres, coloração do tórax dentes do cibário e espermoteca, enquanto que nos machos, a coloração do tórax e genitália são os principais caracteres (GALATI, 2018).

Seu ciclo de vida envolve uma fase de ovo, quatro estágios larvários, seguindo de pupa e o estágio final de adulto alado, permitindo classificá-los como holometábolos (MONTEIRO, 2012). Tanto os machos quanto as fêmeas se alimentam de fontes de açúcar para produzir energia e manter a homeostasia (AZEVEDO et al., 2011), no entanto, as fêmeas necessitam realizar repasto sanguíneo, apresentando hábitos ecléticos podendo realizar o mesmo em várias espécies distintas de animais vertebrados, inclusive em humanos, onde o sangue ingerido tem a função de possibilitar a maturação de seus ovos, (BRASIL, 2014; MONTEIRO, 2012). Em áreas urbanas, o cão parece ser a principal fonte de alimentação no ambiente doméstico (BRASIL, 2014). A oviposição ocorre cerca de cinco a sete dias após o repasto sanguíneo em micro-habitats terrestres, ricos em matéria orgânica (BRAZIL; BRAZIL, 2003; ALEXANDER, 2000).

O desenvolvimento do ovo ao inseto adulto decorre num período de aproximadamente 30 a 40 dias de acordo com a temperatura. A longevidade das fêmeas é estimada em média de 20 dias (BRASIL, 2014).

A importância do vetor na epidemiologia da leishmaniose é o fator que impulsiona os estudos dos flebotomíneos, responsáveis pela transmissão dos protozoários de hospedeiros reservatórios susceptíveis (SARAIVA et al., 2006). Dessa forma, Camargo-Neves et al. (2001) consideraram a necessidade de correlacionar densidade vetorial com os aspectos ambientais, tais como presença de vegetação, raízes, troncos de árvores e matéria orgânica no solo, representando possíveis abrigos e criadouros para o vetor. Além disso, as habitações humanas de má qualidade em locais inadequados, a construção desordenada de abrigos de animais domésticos no ambiente peridomiciliar e a carência de condições mínimas de

saneamento básico foram condições consideradas comuns em áreas rurais e periféricas de centros urbanos (MUNIZ et al., 2006) propícias para a criação manutenção dos criadouros dos vetores. Por outro lado, outros fatores, como temperatura, umidade e pluviometria podem também influenciar a população de flebotomíneos, dependendo da área analisada. Assim, Macedo et al. (2008) verificaram que os flebotomíneos apresentaram uma distribuição sazonal associada aos índices pluviométricos e de umidade, com aumento de densidade no período chuvoso do ano.

2. 3 CICLO BIOLÓGICO

O parasito é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae. Segundo Ross (1903), o gênero *Leishmania*, tem ciclo digenético (heteroxênico), apresentando duas formas principais, a promastigota, flagelada e encontrada no tubo digestório do inseto vetor e a amastigota, sem flagelo livre, intracelular obrigatória das células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero (GONTIJO; CARVALHO, 2003; LYNN; MCMASTER, 2008).

O inseto vetor se infecta ao ingerir formas amastigotas presentes nas células mononucleadas do hospedeiro mamífero. Essas formas parasitárias transformam-se em promastigotas procíclicas que possuem moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície, permitindo a interação com lectinas intestinais e consequente adesão ao epitélio do tubo digestório, impedindo sua eliminação junto ao alimento. Tais formas evolutivas reproduzem-se no trato digestório dos flebotomíneos e passam pelo processo de metaciclogênese, transformando-se em promastigotas metacíclicas entre oito e vinte horas (OLIVER et al., 2005). O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (BRASIL, 2014)

As promastigotas metacíclicas são a forma infectante para o hospedeiro mamífero. São finas, curtas, altamente ativas e com flagelo medindo mais que a metade do comprimento do corpo (RANGEL; LAINSON, 2003). Já não se reproduzem, sofrendo alterações bioquímicas na superfície, que resultam na perda de capacidade de adesão ao epitélio. Estas formas migram através da válvula do estomodeu para o esôfago, faringe e probóscida, havendo a transmissão no próximo repasto sanguíneo (SACKS; KAMHAWI, 2001). São então fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear e no interior das mesmas se diferenciam em amastigotas, forma

arredondada sem flagelo livre, dentro dos fagolisossomas e são capazes de proliferar estabelecendo a infecção (GOTO; LINDOSO, 2010).

Baseando-se no local em que o parasito se desenvolve no tubo digestório do inseto vetor, o gênero *Leishmania* é subdividido em dois subgêneros. As espécies que se desenvolvem restritamente no trato alimentar anterior até a junção do intestino médio com o posterior, fazem parte do subgênero *Leishmania*, enquanto as espécies que se desenvolvem tanto no intestino médio quanto no posterior correspondem ao subgênero *Viannia* (GRIMALDI JR; TESH, 1993), encontrado apenas no Novo Mundo (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

2. 4 HOSPEDEIROS

Mais de 40 espécies de mamíferos de várias ordens são conhecidas como sendo hospedeiros de *Leishmania* spp. em diferentes ciclos de transmissão. Poucas espécies são consideradas como reservatório principal no ciclo de transmissão natural (GRIMALDI JR; TESH, 1993).

De acordo com ASHFORD (1997), a implicação de um hospedeiro como reservatório é complexa, pois, este é específico ao contexto epizoológico, local e sua classificação como tal depende de variáveis pouco estudadas, exemplo a abundância e distribuição do hospedeiro e capacidade de infectar o vetor.

Os principais reservatórios da *L. infantum* no ambiente doméstico são os cães domésticos, devido ao alto grau de parasitismo na pele e à grande susceptibilidade à infecção (HARHAY et al., 2011). Estudos têm evidenciado que a LVC é um fator de risco para a LV humana (PARANHOS-SILVA et al., 1998). Todavia, o parasita pode se manter abrigado naturalmente também em animais silvestres, como os carnívoros das espécies *Lycalopex vetulus* (raposa-do-mato) e *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) e nos gambás da espécie *Didelphis albiventris*. Além destes, equídeos e roedores também têm sido identificados como possíveis reservatórios. Os gatos são suscetíveis tanto para a LV quanto para a LT e alguns autores descrevem que o hábito eclético da espécie felina, bem como a zoofilia dos vetores, seriam fatores favoráveis para que os felinos também pudessem ser reservatórios (CAMARGO et al., 2007; SERRANO et al., 2008; ZORZETTO, 2008).

Estudos demonstram a participação de marsupiais do gênero *Didelphis* na manutenção do parasito devido sua habilidade de viver em diferentes habitats

permitindo um elo entre o ciclo silvestre e doméstico da doença. *D. albiventris* e *D. marsupialis* (SHERLOCK et al., 1988) e *D. aurita* (CARREIRA et al., 2012) já foram encontrados parasitados no Brasil.

Quanto à *L. braziliensis*, já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, endentados e canídeos silvestres (ARIAS; NAIFF, 1981; BRANDÃO FILHO et al., 2003; LAINSON, 2010).

Na procura pelos principais reservatórios, alguns estudos têm focado pequenos mamíferos. No Brasil, foram encontradas evidências de infecção natural de *L. (V.) braziliensis* em várias espécies de roedores dos gêneros *Oryzomys* (LAINSON et al., 1981), *Akodon* e *Holochilus* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), *Proechimys* e *Rhipidomys* (LAINSON; SHAW, 1973), *Nectomys*, *Bolomys* e *Rattus* (BRANDÃO-FILHO et al., 1994), e o marsupial *Didelphis* sp. (LAINSON; SHAW, 1973).

2. 5 LEISHMANIOSE NA ESPÉCIE EQUINA

Nos equídeos os primeiros casos de infecção por *L. infantum* foram detectados na Europa, apresentando-se clinicamente com lesões cutâneas. Os casos de LV equina foram relatados na Espanha (SOLANO-GALLEGO et al., 2003), em Portugal (ROLÃO et al., 2005) e na Alemanha (KOEHLER et al., 2002). Tais relatos apontam para a possibilidade dos equídeos albergarem o agente causador da LV também nas Américas. CERQUEIRA (2001) detectou equídeos positivos em áreas endêmicas para LV no Estado da Bahia, por meio de técnicas sorológicas. Segundo Cerqueira et al. (2003), embora os equídeos infectados experimentalmente realizem soroconversão e mantenham formas amastigotas do parasita no fígado, estes não desenvolvem sinais clínicos e nem são infectivos ao flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, quando submetidos ao xenodiagnóstico.

O primeiro caso de leishmaniose em equinos na América Latina foi relatado na Argentina por Mazza no ano de 1927, já no Brasil, a LTA em equídeos tem sido relatada desde os anos 50. Há casos nos Estados do Ceará (ALENCAR, 1959), da Bahia (VEXENAT et al., 1986), do Rio de Janeiro (AGUILAR et al., 1986; BARBOSA-SANTOS et al., 1994), do Espírito Santo (FALQUETO et al., 1987), de São Paulo

(YOSHIDA et al., 1988), de Pernambuco (BRANDÃO-FILHO et al., 2003) e do Paraná (VEDOVELLO-FILHO et al., 2008).

Duarte et al. (2000), no Estado do Rio de Janeiro, detectaram 11,6% (29/250) de cavalos reativos pela técnica de ELISA. Cerqueira (2001) estudando o papel dos equídeos na LV em áreas endêmicas nos municípios de Jequié e Jacobina no Estado da Bahia, encontraram positividade de 40% pela técnica do TRALd, 19,32% pela técnica do ELISA e 13,7% pelo Dot-blot. Segundo Villalobos et al. (2010), pela técnica da RIFI e considerando a titulação 1:40, encontraram 40% (40/100) de cavalos positivos na Região de Bauru, endêmica para LV.

Fernández-Bellon et al. (2006) e Feitosa et al. (2013) detectaram sororreatividade ao protozoário da LV em 14,3% (16/112) e 14,59% (68/466), respectivamente, dos cavalos avaliados provenientes de áreas endêmicas para a doença. *Leishmania infantum* também tem sido relatada como agente causador de leishmaniose cutânea em cavalos em países europeus, tais como Portugal (ROLÃO et al., 2005) e Alemanha (KOEHLER et al., 2002).

Avaliando 54 amostras de equinos provenientes dos municípios de Ilha Solteira-SP e Bragança Paulista-SP, Benvença (2013) verificou positividade em 36 amostras na PCR de suabe conjuntival e 54 amostras na PCR de sangue e soroconversão pela RIFI em um animal. Avaliando os mesmos animais pela qPCR, Benassi (2015) verificou que 7 amostras se encontravam positivas pela qPCR para detecção de *L. infantum* em suabe conjuntival.

Dentre os casos citados não há padrão clínico característico, onde equinos domésticos sofrem ocasionalmente de lesões cutâneas únicas ou múltiplas, mas provavelmente, representam um hospedeiro acidental da doença (GRAMICCIA, 2011).

Segundo MÜLLER et al. (2009), as lesões da leishmaniose em equinos são pápulas ou nódulos solitários ou múltiplos, que estão presentes na cabeça, orelha, escroto, pernas e pescoço.

De acordo com Feitosa et al., 2012, em estudo realizado na cidade de Araçatuba-SP indicou que a espécie equina em contato com áreas endêmicas para leishmaniose, atrai flebotomíneos transmissores da doença. E salienta a necessidade de estudos mais acurados sobre o papel dos equinos, de forma a auxiliar nas medidas de controle da doença.

2. 6 DIAGNÓSTICO

2.6.1. Diagnóstico Clínico

O diagnóstico da LV tanto em humanos quanto em cães pode ser realizado por critérios clínicos e laboratoriais. As suspeitas clínicas em humanos e cães baseiam-se em sinais e sintomas além dos dados epidemiológicos. O diagnóstico clínico, sobretudo no cão, é de grande complexidade uma vez que muitos cães infectados não apresentam sinais clínicos evidentes, outros apresentam autocura e o período de incubação pode ser longo, com desenvolvimento da doença após longo período (REIS et al., 2006). Não há sinais clínicos patognomônicos para a LV canina e as características consideradas típicas no animal doente podem se confundir com as de outras enfermidades como ehrliquiose, babesiose, rickettsiose e neoplasia cutânea (BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002).

Quanto à LTA, em humanos, o diagnóstico clínico é baseado nas características das lesões, associadas ao histórico e à anamnese, nos quais os dados epidemiológicos são de grande importância (GONTIJO; CARVALHO, 2003; COSTA et al., 2009; MELLO et al., 2011). A suspeita comumente ocorre ao serem identificadas lesões compatíveis com as manifestações da doença em pacientes que moram ou viajaram para regiões endêmicas (MELLO et al., 2011). Ainda em seres humanos pode desenvolver um amplo espectro de lesões e suas manifestações são comumente confundidas com as de outras doenças, como infecções bacterianas, neoplasias, hanseníases, lúpus eritematosos, trauma local, entre outras (REITHINGER et al., 2007). Nos cães, a ulcera cutânea sugestiva costuma ser única, eventualmente múltipla, localizada nas orelhas, focinho ou bolsa escrotal. No entanto, deve estar atento a outras doenças que causem úlceras, tais como neoplasias, piodermites e micoses. Estas devem ser incluídas no diagnóstico diferencial. Entre as micoses, a esporotricose, especialmente, deve ser considerada, por se tratar de uma zoonose e apresentar lesões muito semelhantes as da LT (BRASIL, 2017).

2. 6. 2 Diagnóstico Imunológico

Dentre os testes imunológicos, a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) apresenta facilidade do processo e curto tempo para obtenção do resultado (48 horas), o que faz deste teste o principal método indireto realizado para diagnóstico da LTA em áreas endêmicas (GONTIJO et al., 2002). Este procedimento fundamenta-se na resposta imune celular e consiste no exame de reação de hipersensibilidade tardia após a administração intradérmica de um antígeno padronizado, preparado com componentes extraídos de promastigotas de cultura. Esta hipersensibilidade celular tardia é caracterizada por infiltrado inflamatório com predominância de linfócitos e macrófagos (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Por serem mais rápidos, menos invasivos e permitirem utilização em grande escala, os exames sorológicos apresentam vantagens nos estudos epidemiológicos que visam o controle da doença em áreas endêmicas (SZARGIKI, 2005) e em pesquisas para triagem e determinação de reservatórios (ZOVEIN et al., 1984).

As técnicas para detecção de anticorpos específicos na LV humana e canina constituem instrumentos importantes no diagnóstico e partem do pressuposto de que homens e cães infectados passam por uma estimulação policlonal de linfócitos B, que gera hipergamaglobulinemia ou grande produção de anticorpos anti-*Leishmania* (SILVA et al., 2011).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico de várias doenças parasitárias. Na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* pode apresentar reações cruzadas entre leishmanias e tripanosomas de diferentes espécies e. O resultado considerado sororreagente para *Leishmania* é aquele que possua título igual ou superior ao ponto de corte que é a diluição de 1:40 (BRASIL, 2014).

Diferentes trabalhos demonstraram altos índices de sensibilidade e especificidade para a RIFI em regiões endêmicas para a LV (MANCIANTI et al., 1995, METTLER et al., 2005, MAIA et al., 2009)

O teste ELISA é considerado um importante avanço tecnológico para o diagnóstico da LV, pois permite a avaliação de muitas amostras em um curto espaço de tempo, seu protocolo pode ser facilmente adaptado para a utilização de diferentes

antígenos e a leitura dos resultados é automatizada. Ele consiste na reação de anticorpos presentes nos soros com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* obtidos a partir de cultura in vitro. Esse antígeno é adsorvido em microplacas e os soros diluídos (controle do teste e das amostras) são adicionados posteriormente. A presença de anticorpos específicos no soro vai se fixar aos antígenos. A visualização da reação ocorre quando adicionada uma anti-imunoglobulina de cão marca da com a enzima peroxidase, que se ligará aos anticorpos específicos caso estejam presentes, gerando um produto colorido que poderá ser medido por espectrofotometria. O resultado considerado sororreagente é aquele que apresente o valor da densidade ótica igual ou superior a 3 desvio-padrões do ponto de corte (Cut-Off) do resultado do controle negativo (BRASIL, 2014).

A utilização das técnicas sorológicas de RIFI e ELISA em inquéritos epidemiológicos da LVC apresenta taxas de sensibilidade e especificidades variadas. Há variações no padrão ouro utilizado, na escolha dos controles positivo e negativo, na prevalência da doença na região, no antígeno e no método empregado nas reações (OLIVEIRA et al., 2005).

Lira et al. (2006) demonstraram aumento da sensibilidade e diminuição da taxa de falsos positivos, quando da utilização paralela dos kits de Bio-Manguinhos/Fiocruz, primeiro com triagem pelo método de ELISA, seguido de confirmação pela RIFI. Assim, esta foi a recomendação do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) do Ministério da Saúde (MS).

Atualmente, para diagnóstico de cães, o Ministério da Saúde recomenda para triagem o teste sorodiagnóstico imunocromatográfico DPP (“Dual Path Platform”), que é um teste rápido, utilizando antígenos recombinantes de proteínas antigênicas de *Leishmania* rK 39 e rK26 e o ELISA como teste confirmatório (BRASIL, 2016). Grimaldi Jr. et al. (2012) verificaram que o teste rápido DPP apresentou alta sensibilidade (98%) para cães com sinais clínicos e alta especificidade (96%) mas, baixa sensibilidade (47%) para cães assintomáticos para LVC, sugerindo sua inabilidade para detectar a doença em cães assintomáticos.

2. 6. 3 Exame Molecular

A presença do parasito nas lesões pode ser escassa e com alta dificuldade de detecção. Dessa forma, os métodos convencionais de pesquisa direta apresentam variável sensibilidade e, as técnicas de biologia molecular apresentam maior sensibilidade (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

Como o comportamento das cepas de *Leishmania* é bastante diferente em relação à biologia e à evolução do quadro clínico, o diagnóstico molecular apresenta ainda a possibilidade de especificar o subgênero ou a espécie, permitindo melhores decisões no tratamento e nas medidas preventivas (YARBUH; PREMOLI-DE-PERCOCO, 1999; FABER et al., 2003).

Os métodos moleculares têm sido amplamente desenvolvidos na última década e apesar de diferentes métodos moleculares apresentarem bons resultados para o diagnóstico das leishmanioses, a PCR é mais apropriada (REITHINGER et al., 2007). Este método apresenta especificidade e sensibilidade altas, além de rapidez quando comparadas às técnicas convencionais baseadas em microscopias e culturas de células, vindo a suprir algumas lacunas importantes presentes nos métodos tradicionais de diagnóstico (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

O custo elevado e a necessidade de infraestrutura laboratorial específica e mão de obra especializada não permitem, ainda, a ampla utilização destes métodos diagnósticos no campo, entretanto, têm sido explorados exaustivamente em pesquisas na última década (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; BRASIL, 2017).

2. 7 CASOS DE LEISHMANIOSE NA REGIÃO DE ESTUDO

No Estado de São Paulo a LTA foi registrada pela primeira vez pelo dermatologista italiano Breda, em 1884 (SILVEIRA, 1919). Mas foi a partir de 1905 que a doença foi se tornando problema de saúde pública (SAMPAIO, 1951). Na ocasião, grassou com muita intensidade a partir de Bauru em direção oeste, seguindo à margem esquerda do Rio Tietê até o Rio Paraná. Cidades como Penápolis, Lins, Cafelândia, Birigui, Araçatuba, Guararapes e Andradina constituíram em grandes focos da doença. Também ocorreram epidemias neste período na margem direita do

Rio Paranapanema a partir de Ourinhos. Nos anos 30 e 40 outras epidemias ocorreram a partir de Marília, entre o Rio Feio e Rio do Peixe seguindo a direção Oeste do estado. Já a LV em humanos no estado de São Paulo, data da década de 1970 onde o primeiro registro da ocorrência do agente transmissor - *Lutzomyia longipalpis* - em região restrita, formada pela extensão da Serra da Mantiqueira, a leste do Estado (FORATTINI et al., 1970). Os casos relacionados a doença humana eram importados de outras regiões brasileiras até 1998, sendo o surgimento dos primeiros casos autóctones em Araçatuba em 1999. Já em cães a enzootia canina foi detectada em 1998 (CAMARGO-NEVES et al., 2001).

Cardim et al. (2016) estudando a ocorrência de casos autóctones e expansão da LV em humanos no período de 1999 e 2013, verificou que os casos ocorreram na parte ocidental de São Paulo e sua expansão territorial seguiu principalmente o curso da rodovia Marechal Rondon, no sentido oeste-leste. As incidências foram caracterizadas como duas sequências de elipses concêntricas com intensidade decrescente. A primeira, com maior intensidade, teve epicentro no município de Castilho (cruzamento da rodovia Marechal Rondon com a divisa com o estado de Mato Grosso do Sul) e a segunda, em Bauru.

Um estudo realizado para a ocorrência de LV, em Ilha Solteira, SP, observou-se que os casos de LVC estão dispersos em toda a área urbana, porém, com a criação do mapa estimador de densidade Kernel, uma melhor visualização e registro dos casos foram possível nos eventos ocorridos nos bairros Jardim Aeroporto e Novo Horizonte / COHAB, onde a prevalência estimada foi de 14,5% e 12,4%, respectivamente, o que significa uma faixa de média a média-alta. Os demais bairros da cidade apresentaram prevalência abaixo de 10% variando de baixo a médio-baixo (PAULAN et al., 2012).

Ainda na cidade de Ilha Solteira, SP, inquéritos sorológicos realizados em cães entre 2003 e 2007, a prevalência da enfermidade subiu de 0,67% a 7,44%. Os resultados mostraram um crescente número de casos de LVC nessa cidade e isso significou a necessidade de uma vigilância sanitária mais atuante e de medidas profiláticas mais eficazes no controle da LVC (NORONHA-JUNIOR et al., 2007).

Spada et al (2015), estudando a prevalência de *Lu. longipalpis* e da LVC na área de Cinturão Verde, visitou 12 propriedades ao longo de 12 meses coletando amostras biológicas de 32 cães e mensalmente capturando insetos com o auxílio de

armadilhas do tipo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), verificando assim, presença do vetor em 100 % das propriedades, com 31,25% dos cães diagnosticados soropositivos para a infecção por *L. infantum*.

2. 8 MEDIDAS PREVENTIVAS

Visando evitar os riscos de transmissão da leishmaniose em humanos, são adotadas medidas preventivas de ambientes, individuais ou coletivos. Devem ser estimulados o uso de repelentes quando exposto em ambientes onde há a presença dos vetores, evitar a exposição nos horários de atividades do vetor, uso de mosquiteiros de malha fina (tamanho da malha 1.2 a 1.5 e denier 40 a 100), bem como a telagem de portas e janelas (BRASIL, 2017).

É importante realizar o manejo ambiental por meio de limpeza de quintais e terrenos, a fim de acabar com formas de criação do vetor, realizar podas de arvores aumentando a insolação do solo e evitando o desenvolvimento de larvas de flebotomíneos, dar destino correto do lixo orgânico, evitando a atração de animais sinantrópicos, limpar periodicamente os abrigos de animais, manter os animais domésticos distante do intradomicílio durante a noite, evitando assim a atração dos flebotomíneos para este ambiente (BRASIL, 2017).

Em áreas potenciais de transmissão, sugere-se uma faixa de segurança de 400 a 500 metros entre as residências e a mata (BRASIL, 2017).

Em relação aos cães, é recomendada a captura de cães errantes, especialmente em áreas urbanas, afim dos mesmos serem fonte disseminadora de diversas doenças, dentre elas a leishmaniose, controlar a doação de cães de áreas de transmissão da doença, recomendado a realização de exame sorológico, uso de vacina antileishmaniose visceral canina, uso de telas em canis individuais ou coletivos, obrigatoriamente com telas do tipo malha fina e uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (BRASIL, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Embora verificado que equídeos infectados experimentalmente realizem soroconversão e mantenham formas amastigotas do parasita no fígado, estes não desenvolvem sinais clínicos e nem são infectivos ao flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, quando submetidos ao xenodiagnóstico (CERQUEIRA et al., 2003). Entretanto, existem poucos estudos que confirmam essas afirmações, além de poucos sobre o papel desses animais na transmissão das leishmanioses, quer como fonte de alimentação para os vetores ou como participante do ciclo epidemiológico da doença, bem como os métodos diagnósticos utilizados.

Em relação aos casos citados de equinos infectados com a doença, não se observa padrão clínico característico, sendo descritos nódulos e pápulas, solitários ou múltiplos, lesões ulceradas, proliferativas ou crostosas e nenhuma associação com exames hematológicos e/ou bioquímicos dos animais.

A utilização dos equinos de tração nas áreas urbanas, para transporte de entulho e lixo, ressalta a presença desses animais em grandes centros urbanos e sua íntima relação de trabalho com o homem. Além do intenso intercâmbio de equinos entre os centros urbanos e áreas rurais, possível fator de risco para a difusão de agentes zoonóticos.

Pelo fato de poucos estudos acerca da infecção e diagnóstico de equinos provenientes de áreas endêmicas para as leishmanioses, justifica-se os dados do presente estudo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação de equinos como hospedeiros de *Leishmania* spp. em áreas endêmicas para LV no estado de São Paulo, bem como realizar o levantamento da fauna de flebotomíneos nos municípios de Andradina e Ilha Solteira, São Paulo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência da infecção por *Leishmania* spp. em equinos por meio de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares;
- Realizar uma análise comparativa dos métodos diagnósticos utilizados;
- Correlacionar parâmetros laboratoriais (hemograma completo e bioquímico) dos equinos positivos;
- Avaliar parâmetros clínicos dos equinos positivos;
- Realizar um levantamento da fauna de flebotomíneos por meio de armadilhas luminosas do tipo CDC ("*Center for Disease Control and Prevention*") nos municípios de Andradina e Ilha Solteira;
- Correlacionar a presença dos flebotomíneos com dados climáticos;
- Realizar a caracterização da espécie dos flebotomíneos coletados.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ÁREAS DE ESTUDO

Este estudo foi realizado nos municípios de Andradina/São Paulo (SP), Araçatuba/SP, Bauru/SP, Ilha Solteira/SP e Pirassununga/SP, onde, foram utilizados os espaços físicos da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS / Unesp), Ilha Solteira, da Fundação Educação de Andradina (FEA), e da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA / USP), Pirassununga. Os materiais biológicos para análises foram coletados nas cidades de Andradina, Araçatuba, Bauru e Ilha Solteira.

O município de Andradina está localizado a 620 km da capital, na região Noroeste do estado de São Paulo (S 20° 53' 46" e O 51° 22' 46"). Possui uma população de 57.112 habitantes estimada no ano de 2018 e área total de 964, 226 km² (IBGE, 2017).

O município de Ilha Solteira está localizado no Planalto Ocidental Paulista a 650 km da capital, na região Noroeste do estado de São Paulo (S 20°25'36,47"; O 51° 20' 26,47"). Possui uma população estimada em 26.582 habitantes (IBGE, 2017).

O município de Araçatuba está localizado a 326 km da capital, na região Noroeste do estado de São Paulo (S 21°12'32"; O 50°25'58") e possui uma população estimada em 195.874 habitantes (IBGE, 2017).

O município de Bauru está localizado 520 km da capital, na região Noroeste do estado de São Paulo (**S** 22° 18' 53"; O 49° 03' 38") e possui uma população estimada em 374.272 habitantes (IBGE, 2017).

5.2 AMOSTRAGEM DE ANIMAIS

Foram avaliados 235 equinos, machos e fêmeas, jovens e adultos, com ou sem raça definida, oriundos de propriedades particulares dos municípios de entre Andradina, Araçatuba, Bauru e Ilha Solteira.

5. 3 AVALIAÇÃO FÍSICA

Todos os animais foram avaliados clinicamente, atentando-se ao estado geral, à obtenção dos parâmetros vitais, como frequências cardíaca e respiratória, pulso e temperatura retal, à coloração de mucosas, à avaliação de linfonodos e às particularidades observadas por sistema acometido.

O sistema dermatológico foi priorizado, com uma busca minuciosa por lesões, áreas com alopecia e descamação. As lesões cutâneas foram classificadas em localizada: de uma a cinco lesões individualizadas; disseminada: mais de cinco lesões cutâneas; generalizada: acometimento difuso de mais de 60% da superfície corporal do animal; e universal: acometimento total da superfície corporal do animal.

Os dados referentes à avaliação clínica foram alocados em formulário próprio para posterior correlação aos exames (APÊNDICE A).

5. 4 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após exame clínico físico completo, os equinos foram imobilizados por contenção manual, com auxílio do proprietário. As coletas de sangue foram feitas diretamente da veia jugular externa, com assepsia prévia do local com álcool iodado. Foram coletados cerca de 25mL de sangue de cada animal.

O sangue coletado foi armazenado em tubos a vácuo sem anticoagulante para a obtenção do soro e em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Amostras de sangue foram preservadas em geladeira a 4°C para realização do hemograma em até 24 horas. Amostras de soro e sangue foram armazenadas a -20°C para realização de exames bioquímicos, sorologia e extração de DNA.

As amostras de células epiteliais da conjuntiva ocular foram coletadas de cada animal, nos dois olhos, utilizando suabes estéreis produzidos para o isolamento bacteriológico. Essas amostras foram acondicionadas em microtubos de 1,5mL livres de DNase e RNase e armazenadas a 4°C até o momento da extração de DNA, para realização de exames moleculares.

Para a colheita de aspirados de linfonodos submandibular direito e/ou esquerdo dos animais, demarcou-se a área a ser puncionada e fixou-a manualmente. A punção foi executada com uma agulha hipodérmica 40 x 12 acoplada a uma seringa descartável de 5mL. A agulha foi retirada da seringa, o êmbolo repuxado e a agulha

novamente acoplada à seringa para então despejar o material em lâminas de vidro limpas e desengorduradas, distribuído com ajuda de outra lâmina no formato de *squashes*. O líquido celular do aspirado de linfonodo, que ficou remanescente na agulha, foi lavado diversas vezes em tubos de 5mL com meio de cultura LIT (*liver infusion tryptose*). Os tubos ficaram acondicionados em temperatura ambiente, e ao chegar ao laboratório, mantidos em estufa de incubação do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) (28 ° C a 30°C).

5. 5 HEMOGRAMA COMPLETO

O sangue total com EDTA foi processado em analisador hematológico automático (Sysmex pocH-100iV™), no máximo 24 horas após a coleta, para obtenção do valor de leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina e plaquetas. O valor do volume globular (VG) foi obtido pela leitura de microcapilar, após centrifugação do sangue total em microcentrífuga (Microline, Laborline). Os índices hematimétricos como volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos valores de VG, hemoglobina e eritrócitos.

5. 6 REALIZAÇÃO DE BIOQUÍMICA SÉRICA

O sangue coletado em frascos sem anticoagulantes foi centrifugado após a formação do coágulo, em centrífuga (FANEM, Brasil), a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi alocado em frasco tipo *ependorf* e levado ao analisador automático (Cobas c111®, Roche), para determinação de parâmetros bioquímicos, como uréia, creatinina, AST, ALT, proteínas totais, albumina (A), globulina (G) e relação A/G. Cada analito foi determinado utilizando-se kits específicos (Cobas c111, Brasil), seguindo a metodologia estabelecida de acordo com o fabricante. Antes da realização da rotina, utilizou-se soro controle padrão (Cobas c111, Brasil), para assegurar a confiabilidade dos exames.

5. 7 EXAMES SOROLÓGICOS

5. 7. 1 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA)

O teste ELISA indireto para diagnóstico da leishmaniose em equinos foi realizado segundo a técnica preconizada por Lima et al., (2005), com adaptações. Em cada poço da placa de poliestireno foram adicionados 100µL do antígeno solúvel de *L. infantum* na concentração 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio (TCBS) 0,05M, pH 9,6. Após a incubação da placa por 18 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por quatro lavagens consecutivas, com tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As placas foram bloqueadas com PBS-T acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por duas horas. Após quatro lavagens com PBS-T, para a retirada da solução de bloqueio, adicionou-se 100 µL por poço, em duplicata, as amostras de soros dos controles positivos, controles negativos e das amostras séricas diluídos em PBS-T acrescida de soro fetal bovino a 10%, sendo a diluição 1/100. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lavadas quatro vezes com PBS-T. Em seguida foram colocados 100 µL do anticorpo secundário conjugado com a peroxidase, sendo anti-IgG total de equino na diluição 1: 20.000, seguindo-se de uma nova incubação em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após as lavagens, foram adicionados 100 µL da solução de Tetrametilbenzindina dihidroclorada (TMB) em cada cavidade da placa, com posterior incubação da placa por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço, 50 µL de ácido sulfúrico 0,5N e a densidade óptica (D.O) foi determinada em leitor ELISA (Universal Microplate Reader – EL 800 – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC), utilizando-se filtro de 450nm.

Os valores de densidade óptica média (D.O.) dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variaram de 0 (zero) a 9 (nove). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. dos animais negativos para *L. infantum*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por Voller et al. (1980).

A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando-se os soros de referência negativos e positivos de acordo com a seguinte equação:

A/P=	Absorbância média da amostra	-	Absorbância média do soro de referência negativo
	<hr/>		
	Absorbância média do soro de referência positivo	-	Absorbância média do soro de referência negativo

5. 7. 2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A triagem e titulação das amostras para diagnóstico sorológico da infecção por *Leishmania* spp. foi de acordo com a metodologia descrita por Soares (2012) para cavalos.

As lâminas contendo formas promastigotas de *L. infantum* provenientes do laboratório IMUNODOT® Diagnósticos Ltda, foram retiradas do “freezer” e descongeladas à temperatura ambiente. Em cada círculo contendo o antígeno, foram dispensados 10µL do soro diluído em microtubos com solução PBS, 0,01M, pH7,2 diluído na concentração de 1:40. Em todas as lâminas foram colocados os controles positivo e negativo. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida e levadas à estufa 37°C, por 35 minutos e, a seguir, submetidas a três lavagens em PBS por imersão, de cinco minutos cada. Após a secagem a temperatura ambiente, os círculos das lâminas foram recobertos com 10µL do anticorpo anti-IgG de conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (KPK cat nº 02-19-02), diluído a 1:30, em solução de PBS, contendo azul de Evans 1 mg%. As lâminas foram novamente incubadas por mais 35 minutos e depois lavadas, conforme acima descrito. Após a secagem das lâminas, estas foram montadas com lamínula, utilizando-se glicerina tamponada a uma relação de 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5M, pH 9,6 e, posteriormente foram observadas em microscópio equipado para fluorescência (Olympus, BX-FLA).

Quando observadas as reações fluorescentes, as amostras foram consideradas positivas, e realizou-se a titulação, até negatificação da reação.

5. 8 EXAMES MOLECULARES

5. 8. 1 Extração do DNA

Extração de DNA das amostras de sangue total dos animais foi realizada utilizando-se o kit “Illustra blood genomic Prep Mini Spin Kit, Healthcare® (cod. 28904264)” de acordo com as recomendações do fabricante. A extração de DNA do suabe conjuntival foi realizada pela técnica de *salting-out* descrita por John et. al (1991) e modificada por Lahiri; Nurnberger (1991).

5. 8. 2 Controles Positivos e Negativos

Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481 e *L. braziliensis* MCAN/BR/1987/CLIOC-898 cedidas pelo Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, e como controle negativo água deionizada estéril.

5. 8. 3 PCR convencional (c-PCR) para detecção de *Leishmania* spp.

A detecção de *Leishmania* spp., foi realizada conforme descrito a seguir: A mistura para a reação é preparada do seguinte modo: 2,5µL de tampão (200mM Tris-HCl; 500mM KCl, pH 8,4), 0,75µL de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µL de dNTP's (10mM cada), 1,5µL de cada *primer* (10pmol/µL), 0,15µL de *Platinum*® Taq DNA Polimerase (Invitrogen®) (5U/µL), quantidade suficiente de água Milli-Q para completar 22,5µL e 2,5µL de DNA (10ng/µL), totalizando um volume final de 25µL. As reações de amplificação são conduzidas em termociclador com ciclos de: Desnaturação Inicial: 94°C (3 min.); e 35 ciclos: D: 94°C (40 seg.); A: 56°C (30 seg.); E: 72°C (30 seg.); E final: 72°C (5 min.). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de *Leishmania* spp. foram o 13A: (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3'), 13B: (5' -ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3'), descritos por Rodgers et al. (1990). O produto final amplificado da reação positiva é de 120pb.

5. 8. 4 c-PCR da região de ITS1- rDNA

A PCR da região ITS1 do rDNA foi realizada de acordo El Tai et al. (2000), onde os primers utilizados são: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') que se anelam nas sequências conservadas SSU e 5.8S.

Para a mistura da PCR: tampão de PCR (50mM KCl, 10mM de Tris-HCl), 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 2U de Taq-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 400mM de cada iniciador e 5µL da amostra de DNA.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial em um ciclo de 95°C por quatro minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C durante 30s, 53°C durante 30s e 72°C durante um minuto e uma extensão final de 72°C durante cinco minutos. O produto gerado foi de 300 a 350 pb, dependendo da espécie envolvida, os quais foram visualizados em gel de agarose a 2%.

5. 8. 5 Eletroforese

Os produtos de PCR foram visualizados pela luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel agarose 2,0% (m/v) para fragmentos de 120bp e 1,5% (m/v) para fragmentos de 300/350bp, contendo o corante SYBR® safe (Invitrogen®) em tampão Tris-borato (pH 8.0). O marcador de DNA de 100bp - DNA Molecular Weight Marker (Amresco®) foi utilizado para estimarmos o tamanho do amplicon.

5. 8. 6 Controle endógeno da extração

A fim de avaliar a qualidade da extração de DNA e excluir falsos negativos oriundos de inibição de PCR ou degradação da amostra será realizado uma PCR para a região da β -actina, conforme preconizado por MANNA et al. (2006).

5. 9 EXAME PARASITOLÓGICO DIRETO

5. 9. 1 Punção Biópsia Aspirativa (PBA)

O exame parasitológico foi realizado utilizando aspirados de linfonodos submandibular. Após a colheita e confecção das lâminas, as mesmas foram coradas pelo kit Panótico rápido® conforme as recomendações do fabricante. Brevemente, as lâminas são submergidas durante 20s sob discreta agitação na solução fixadora (Triarilmetano 0,1%). Depois de escorridas são submergidas por 20s sob agitação na solução de corante básico (xantenos 0,1%) e, por fim, submergidas também por 20s sob agitação na solução de corante ácido (tiazinas 0,1%). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e secadas à temperatura ambiente. Após secas, estão prontas para o exame direto ao microscópio ótico.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico e classificadas em positivas se apresentassem formas amastigotas do parasito e negativas se o parasita não era visualizado em pelo menos 300 campos visuais, na objetiva microscópica de 100x, utilizando óleo de imersão.

5. 10 CULTURA CELULAR

5. 10. 1 Cultura de Aspirado de Linfonodo

Durante a coleta das amostras biológicas, o líquido celular do aspirado de linfonodo de 40 cavalos, que ficou remanescente na agulha, foi lavado diversas vezes em tubos de 5mL com meio de cultura LIT (APÊNDICE B). Os tubos ficaram acondicionados em temperatura ambiente, e ao chegar ao laboratório, mantidos em estufa (28 ° C à 30°C).

Após 15 dias, uma gota de material contendo o aspirado de linfonodo em meio de cultura LIT foi depositada sobre lâminas de vidro (Invicta, Brasil) limpas e desengorduradas e posteriormente realizada a primeira leitura em microscópio óptico procurando-se formas flageladas, visualizando em pelo menos 300 campos visuais, na objetiva microscópica de 40x. Uma segunda leitura foi realizada com mais 15 dias.

4. 11 LEVANTAMENTO DE FLEBOTOMÍNEOS

O levantamento de flebotomíneos foi realizado nos municípios de Andradina e Ilha Solteira estado de São Paulo, utilizando-se a armadilha luminosa do tipo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*). Estas foram colocadas em 12 pontos distintos, sendo 6 Armadilhas em Ilha Solteira (Figura 1) e 6 armadilhas em Andradina (Figura 2), entre os horários das 17 às 07 horas por três vezes consecutivas/mês, durante 2 anos, evitando-se assim interferências nos resultados devido à sazonalidade.

Figura 1 - Imagem ilustrando a localização geográfica das 6 armadilhas luminosas CDC para captura flebotomíneos, no município de Ilha Solteira, São Paulo.

Fonte: SPADA, 2019.

Figura 2 - Imagem ilustrando a localização geográfica das 6 armadilhas luminosas CDC para captura flebotomíneos, no município de Andradina, São Paulo.

Fonte: SPADA, 2019.

As armadilhas foram colocadas no peridomicílio, em pontos estratégicos, o mais próximo possível dos recintos dos animais previamente definidos (Figura 3). As propriedades estudadas foram selecionadas de acordo com Macedo et al. (2008), pelas características sugestivas ao estabelecimento e manutenção de criadouros de mosquitos, ou seja, aquelas residências que possuíam amplo peridomicílio, com presença de vegetação abundante, principalmente arbustos, com acúmulo de matéria orgânica no solo e presença de animais domésticos (prováveis fontes de alimento para flebotomíneos) como as aves domésticas. Cada armadilha permaneceu no mesmo local durante 24 meses evitando-se assim interferências nos resultados devido à sazonalidade. A captura iniciou-se em janeiro de 2017 finalizando em dezembro de 2018.

Figura 3 - Imagem ilustrando a localização das armadilhas luminosas CDC para captura flebotomíneos, bem como as características das propriedades onde foram alocadas as armadilhas, como grande presença de lixo, vegetação e animais como cães e galinhas.

Fonte: SPADA, 2019.

Os flebotomíneos capturados em Ilha Solteira, foram transportados vivos até o laboratório LIP AIS – Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho”, UNESP Campus de Ilha Solteira e os capturados em Andradina ao laboratório de microscopia da Fundação Educacional de Andradina (FEA) em recipientes plásticos e telados acondicionados em caixas térmicas. Eles foram agrupados por armadilhas, e a data de captura foi anotada em uma planilha (controle do período de maior incidência do vetor) e posteriormente foram separados quanto ao sexo, e identificados quanto à espécie através de caracteres morfológicos da genitália. Após identificação os machos e fêmeas foram fixados em álcool 70%.

Os espécimes capturados foram submetidos a protocolo de clarificação segundo Forattini (1973). Após a clarificação, os flebotomíneos foram montados entre

lâmina e lamínula com bálsamo do canada (Êxodo Científica®) (GALATI et al., 2017). Para os machos, a cabeça foi separada do tórax e abdômen com auxílio de dois estiletes e posicionada com a face dorsal para cima. Ao lado dela, o tórax e abdômen foram posicionados em posição latero lateral com as pernas e asas distendidas. Já nas fêmeas, a cabeça foi posicionada com a face ventral para cima, e a porção terminal do abdômen ventralmente posicionado, abaixo dela. A identificação a nível de espécie foi realizada conforme a chave de identificação proposta por Galati (2018) com abreviações de gêneros segundo Marcondes (2007), em microscópio óptico de luz (DM500, Leica®).

Para correlacionar a presença dos insetos capturados com as variáveis ambientais (precipitação pluviométrica e temperatura), em Ilha Solteira foram obtidos dados a partir de sensores instalados na Estação Agrometeorológica operada pela UNESP, Campus de Ilha Solteira e Andradina do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO).

5. 12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os métodos estatísticos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de T. Nos estudos de correlação foi realizada a análise de correlação linear de Pearson. Para os testes estatísticos será respeitado o intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

O índice de concordância entre os métodos foram avaliados dois a dois de acordo com o índice Kappa no intervalo de confiança de 95% e ao nível de significância de 5%, sendo classificados de acordo com Landis; Koch (1977), em: valor de Kappa $\kappa < 0.00$ como insignificante, $0.00 \geq \kappa \leq 0.20$ como concordância fraca, $0.20 \geq \kappa \leq 0.40$, como razoável; $0.40 \geq \kappa \leq 0.60$, como moderada, $0.60 \geq \kappa \leq 0.80$, como forte e $0.80 \geq \kappa \leq 1.0$, como excelente.

Todas as análises serão geradas no programa R, versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2019).

5. 12 ASPECTOS ÉTICOS

Esse estudo foi previamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ), em reunião ordinária realizada em 03 de agosto de 2017, protocolada sob o CEUA nº 1380220517.

6 RESULTADOS

6.1 ANAMNESE E AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Dos 235 animais avaliados, 112 (47,66%) cavalos eram fêmeas e 123 (52,34%) machos.

A faixa etária dos cavalos analisados variou de 4 meses a 30 anos, com escore de deposição de gordura na crista do pescoço variando de 0 a 5. Verificou-se que o maior número de animais se encontrava com escore 3, totalizando 111 (47,23%), seguido de 78 (33,19%) animais com escore 2, 19 (8,08%) animais com escore 1, 17 (7,23%) com escore 4 e 8 (3,40%) animais com escore 5. Apenas 2 (0,87%) dos cavalos estavam com escore 0, apresentando extrema caquexia (Figura 4).

Avaliando a mucosas ocular, oral e genital dos cavalos, verificou-se que 215 (91,49%), 213 (90,63%) e 211 (89,78%) respectivamente apresentavam mucosas normocoradas. Já, 19 (8,08%), 21 (8,94%) e 24 (10,22%) respectivamente apresentavam mucosas hipocoradas, sendo sugestivo de anemia. Entretanto um animal apresentou mucosas oral e ocular hipercoradas e nenhum apresentou mucosas genitais hipercoradas.

Quanto à presença de contactantes, a maioria dos cavalos tem como contactantes outros equinos, bovinos, cães, gatos, suínos, aves (galinhas), caprinos e ovinos. Pelo menos 168 (71,49%) cavalos tem contato com cães, 130 (55,32%) com aves, 147 (62,55%) com bovinos, 44 (18,72%) com suínos, 22 (9,36%) com bubalinos, 13 (5,54%) com ovinos e 162 (68,94%) com outros equinos.

Sobre o relato dos tutores dos cavalos em relação à presença de cães eutanasiados com LV na propriedade e de convívio com os animais, 53 (22,55%) dos animais vivem em propriedades que tem relato de cães eutanasiados anteriormente com LV e 58 (24,68%) desses animais convivem com cães diagnosticados com LV. O total de cavalos que residem em propriedades com histórico de cães eutanasiados e cães atualmente diagnosticados com LV são 36 (15,32%) animais.

Durante a inspeção foi constatado que 78 (33,19%) tinham a presença de carrapato.

Ao investigar o manejo de vermifugação dos animais, os tutores foram consultados, verificando que 71 (30,21%) dos animais estavam a mais de um ano sem utilizar qualquer tipo de anti-helmíntico, contando da última vez que foi administrado algum tipo do antiparasitário.

Na análise clínica foram verificadas várias dermatopatias, a maioria delas com grande similaridade clínica. Entre elas foram destacadas, alopecia focal ou disseminada, feridas parasitárias e feridas traumáticas, com tecido de granulação exuberante.

As alopecias observadas foram classificadas como localizadas, principalmente na região da face e dorso do animal ou disseminada, em todo o corpo do mesmo. A grande maioria está relacionada a uma dermatite com a presença de crostas e pústulas. De todos os animais avaliados, 169 (71,91%), não apresentaram nenhuma alteração dermatológica.

Conforme ilustra a Figura 1, muitos cavalos eram utilizados para tração de lixos e materiais na zona urbana, e se encontravam com condições de magreza e com alopecias locais e generalizadas.

Figura 4 - A: égua apresentando dermatite na região da face com alopecia e presenças de áreas crostosas. B: égua apresentando magreza (escore 2) e ferida traumática causada pela tração de lixo. C: égua durante trabalho, evidenciando escore 3. D: cavalo com extrema magreza (escore 0), podendo ser evidenciado alopecia em face.

Fonte: SPADA, 2019.

6. 2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

6. 2. 1 ELISA indireto e RIFI

O exame sorológico ELISA indireto foi realizado utilizando 226 amostras de cavalos. O ponto de corte e os resultados do ELISA dos soros de referência negativa para a padronização do ELISA e o cálculo do ponto de corte, segundo a metodologia já descrita, podem ser visualizados na Tabela 1. O ponto de corte foi calculado como

sendo no valor DO de 0,375 e $NE \geq 3$ (intervalo da DO de $> 0,309 - 0,418$). Já os valores dos Níveis ELISA (NE) estão na Tabela 2 para a padronização do ELISA.

Os soros utilizados como referência negativa para padronização do ELISA, foram obtidos de 6 cavalos provenientes de Mariapoles estado de São Paulo, cidade essa considerada não endêmica para leishmaniose. Como triagem desses animais, foi realizado o teste RIFI, onde na diluição 1:40 foram considerados negativos.

Tabela 1 - Resultado da análise dos 6 soros de referência negativa, provenientes de cavalos de Mariapoles, São Paulo.

Identificação dos Cavalos	Absorbância (D.O.) dos soros de referência negativa		
	DO 01	DO 02	Média
Cavalo 01	0,165	0,139	0,15
Cavalo 02	0,136	0,231	0,18
Cavalo 03	0,145	0,171	0,16
Cavalo 04	0,134	0,218	0,18
Cavalo 05	0,205	0,133	0,17
Cavalo 06	0,172	0,137	0,15
Média Geral			0,17
Desvio Padrão			0,01

Fonte: SPADA, 2019.

Tabela 2 - Níveis ELISA (NE) relacionados à primeira amostragem (N=226 cavalos)

Níveis ELISA (NE)	
NE	Intervalo
0	0 - 0,170
1	$> 0,170 - 0,229$
2	$> 0,229 - 0,309$
3	$> 0,309 - 0,418$
4	$> 0,418 - 0,564$
5	$> 0,564 - 0,762$
6	$> 0,762 - 1,029$
7	$> 1,029 - 1,389$
8	$> 1,389 - 1,875$
9	$> 1,875$

Fonte: SPADA, 2019.

Legenda: N= 226 cavalos. Ponto de corte: $NE \geq 3$

Do total de 226 cavalos examinados, 137 (60,6%) encontravam-se sorologicamente positivos com anticorpos anti-*Leishmania* pelo ELISA. A Figura 05 demonstra a distribuição em número desses animais positivos de acordo com os níveis ELISA, respectivamente para a primeira e a segunda amostragem. Nota-se que a maioria dos cavalos positivos se encontravam no nível NE= 4 (48/137; 35,0%) seguidos pelos níveis 3, 5, 6, 7 e 8 (Figura 5).

Figura 5 - Número de cavalos positivos ao ELISA indireto de acordo com os níveis ELISA (NE) e o ponto de corte ≥ 3 (N= 226).

Fonte: SPADA, 2019.

Após os 226 cavalos serem submetidos à técnica da RIFI, a presença de anticorpos anti-*Leishmania* foi detectada em 202 (89,4%) animais. A categorização quanto a titulação de anticorpos anti-*Leishmania* variou de 1:40 a 1:1280.

Verificou-se que 71 (35,1%) dos animais encontram-se com titulação na RIFI 1:320, seguida de 63 (31,2%) animais com titulação 1:160, 46 (22,8%) animais com titulação 1:60, 18 (8,9%) com titulação 1:40, 3 (1,5%) com titulação 1:640 e apenas 1 (0,5%) animal com titulação igual a 1:1.280. Os animais com titulação $<1:40$ considerados negativos na RIFI, foram 24 (10,9%) cavalos (Figura 6).

Figura 6 - Número de cavalos positivos ao RIFI de acordo com titulação realizada onde <40 são os animais negativos. (N= 226).

Fonte: SPADA, 2019.

Dos 226 cavalos, 202 deles (89,4%) mostraram-se positivos pela RIFI e 137 (60,6%) pelo ELISA indireto (Tabela 3).

Tabela 3 - Número (N) e porcentagem (%) de cavalos positivos e negativos para detecção de anticorpos anti-Leishmania de acordo com os métodos sorológicos utilizados (ELISA indireto ou RIFI).

Número (N) e porcentagem (%) de cavalos positivos e negativos para LVC		
Resultado	ELISA	RIFI
	N (%)	N (%)
Positivos	137 (60,6)	202 (89,4)
Negativos	89 (39,4)	24 (10,6)
Total	226 (100)	226 100)

6. 2. 2 cPCR para detecção de *Leishmania* spp.

As reações de cPCR foram realizadas tanto em amostras do sangue (cPCR-SG) como de suabe conjuntival (cPCR-SC) em 235 cavalos. Todas as amostras

avaliadas pela cPCR-SC foram negativas utilizando-se o *primer* LIT5R/L5-8S (ITS-1). Ao utilizar o *primer* 13A/13B para avaliar cPCR-SC dos cavalos encontramos bandas equivalente ao controle positivo em apenas 8 (3,4%) animais. Já para o cPCR-SC, também utilizando o *primer* 13A/13B, foram encontrados apenas 6 (2,5%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Número (N) e porcentagem (%) de cavalos positivos e negativos para detecção de DNA de *Leishmania* spp. de acordo com os métodos moleculares utilizados (cPCR-SC e cPCR-SC).

Número (N) e porcentagem (%) de cavalos positivos e negativos na cPCR				
Resultado	ITS-1		13A/13B	
	cPCR-SG	cPCR-SC	cPCR-SG	cPCR-SC
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Positivos	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (3,4)	6 (2,5)
Negativos	235 (100,0)	235 (100,0)	227 (96,6)	229 (97,5)
Total	235 (100)	235 (100)	235(100)	235 (100)

Fonte: SPADA, 2019.

6. 2. 3 PBA

Nas análises das lâminas, as leituras foram realizadas, e as mesmas não apresentaram formas amastigotas de *Leishmania* spp. em nenhum dos campos visualizados, consideradas assim negativas.

6. 2. 4 Cultura Celular

Tanto na primeira leitura (15 dias) quanto na segunda leitura (30 dias), não foram encontradas formas flageladas.

6. 3 ANÁLISES LABORATORIAIS CORRELACIONADAS A POSITIVIDADE DOS CAVALOS

Para comparar os resultados de achados clínicos laboratoriais entre cavalos positivos e negativos, foram selecionados dois grupos de animais: um grupo de infectados (GI), formado por 6 cavalos positivos, tanto na RIFI, ELISA, quanto no cPCR-SC simultaneamente e um grupo contendo apenas os animais soropositivos

pelos exames diagnósticos ELISA e RIFI, sendo esse composto pelos 226 animais analisados pelos exames sorológicos.

Na Tabela 5 é possível observar os valores médios e desvio padrão da atividade sérica bioquímica analisada em cavalos com sorologia positiva (GI-cavalos) e negativa (GC-cavalos) para *Leishmania* spp. contendo apenas os animais soropositivos pelos exames diagnósticos ELISA e RIFI. De acordo com o teste T, é possível verificar diferença estatísticas para ureia ($p=5.665e-08$), albumina ($p=0,00218$) e fosfatase ($p=0,00033$). Porém, ao avaliar os valores médios encontrados em cada grupo e comparar com os valores de referência, podemos verificar que somente para o grupo GC-cavalos houve alteração no exame, verificando um aumento dos níveis plasmáticos de ureia nesse grupo (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão da atividade sérica bioquímica analisada em cavalos com sorologia positiva (GI-cavalos) e negativa (GC-cavalos) para *Leishmania* spp.

Média e desvio padrão dos valores de exame bioquímico encontrado em cavalos				
Parâmetros	Valores de referência	GI-cavalos	GC-cavalos	p- value
Ureia (mg/dl)	21 – 51	54,97 ± 39,94	106,0 ± 35,26	5.665e-08*
Creatina (mg/dl)	1,2 – 1,9	1,42 ± 0,61	1,511 ± 0,14	0,5243
ALT (U/L)	3 – 23	13,2 ± 8,86	16,19 ± 12,51	0,1617
AST (U/L)	226 – 366	265,4 ± 69,41	279,4 ± 36,28	0,3981
Albumina (g/dl)	2,6 – 3,7	3,249 ± 1,31	2,32 ± 1,13	0,00218*
Fosfatase	143 - 395	172,11 ± 108,37	259,6 ± 52,93	0,00033*
Globulina	2,62 – 4,04	4,16 ± 0,67	3,998 ± 0,70	0,3224

Fonte: SPADA, 2019.

Legenda: valores de referência de acordo com o proposto por Kaneko et al. (2008). De acordo com o teste T, não há diferença significativa para o nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$) entre os parâmetros analisados.

Na Tabela 6, está descrito a comparação da análise sérica bioquímica do grupo contendo 6 cavalos positivos (GP-cavalos) e 6 cavalos negativos (GN-cavalo), tanto na RIFI, ELISA, quanto no cPCR-SC simultaneamente. Conforme os dados, é possível verificar diferença estatísticas para ureia ($p=0,0441$), creatina ($p=0,0066$) e

globulina ($p=0,0317$). Porém, ao avaliar os valores médios encontrados em cada grupo e comparar com os valores de referência, podemos verificar que somente para o grupo GN-cavalos houve alteração no exame, verificando um aumento dos níveis plasmáticos de ureia nesse grupo e somente para o grupo GP-cavalos verificou aumento da globulina e diminuição de albumina. Ainda em relação a avaliação dos valores médios comparados com os valores de referência, ao analisar a creatina, não foi verificada a alteração (aumento ou diminuição) nos grupos analisados (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão da atividade sérica bioquímica analisada em dois grupos contendo 6 cavalos positivos (GP-cavalos) e 6 cavalos negativos (GN-cavalos), tanto na RIFI, ELISA, quanto no cPCR-SC simultaneamente para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e DNA.

Média e desvio padrão dos valores de exame bioquímico encontrado em cavalos				
Parâmetros	Valores de referência	GP-cavalos	GN-cavalos	p- value
Ureia (mg/dl)	21 – 51	34,32±12,6	81,92±49,06	0,0441*
Creatina (mg/dl)	1,2 – 1,9	1,24±0,2	1,59±0,15	0,0066*
ALT (U/L)	3 – 23	8,67±2,73	8,83±1,72	0,9019
AST (U/L)	226 – 366	266,67±31,84	267±44,33	0,9884
Albumina (g/dl)	2,6 – 3,7	2,52±0,19	3,25±1,88	0,3696
Fosfatase	143 - 395	294,33±88,27	259,33±56,91	0,4334
Globulina	2,62 – 4,04	4,72±0,87	3,6±0,66	0,0317*

Fonte: SPADA, 2019.

Legenda: valores de referência de acordo com o proposto por Kaneko et al. (2008). De acordo com o teste T, não há diferença significativa para o nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$) entre os parâmetros analisados.

A pesquisa hematológica nos cavalos baseou-se na análise de eritrócitos, hemoglobinas, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos, proteína total e plaquetas.

Na Tabela 7 é possível observar os valores médios e desvio padrão da pesquisa hematológica em cavalos com sorologia positiva (GI-cavalos) e negativa (GC-cavalos) para *Leishmania* spp. contendo apenas os animais soropositivos pelos

exames diagnósticos ELISA e RIFI. De acordo com o teste T, é possível verificar diferença estatísticas para VG ($p=0,0064$), VCM ($p=0,0141$), CHCM ($p=0,06105$), leucócitos ($p=6.6575e-05$), proteína total ($p=0,01024$) e plaquetas ($p=0,03098$). Porém, ao avaliar os valores médios encontrados em cada grupo e comparar com os valores de referência, podemos verificar que não houve alteração no exame nos grupos analisados (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão da avaliação hematológica em cavalos com sorologia positiva (GI-cavalos) e negativa (GC-cavalos) para *Leishmania* spp.

Média e desvio padrão dos valores do exame hematológico encontrado em cavalos				
Parâmetros	Valores de referência	GI-cavalos	GC-cavalos	p- value
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	5,5 - 9,5	$7,401 \pm 1,54$	$6,940 \pm 0,514$	0,1864
VG (%)	24 - 44	$36,04 \pm 6,40$	$40,24 \pm 7,21$	0,0064*
Hemoglobina (g/dl)	8 - 14	$11,61 \pm 2,04$	$11,44 \pm 1,16$	0,7163
VCM (fl)	39 - 52	$47,91 \pm 6,89$	$51,76 \pm 2,25$	0,0141*
CHCM (%)	31 - 35	$32,65 \pm 2,35$	$31,65 \pm 0,75$	0,06105*
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	5,5 - 12,5	$10,53 \pm 2,73$	$7,98 \pm 1,72$	6. 6.575e-05*
Proteína total (g/L)	60 - 80	$72,96 \pm 11,39$	$66,2 \pm 7,40$	0,01024*
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	100 - 260	$141,4 \pm 64,74$	$109,20 \pm 41,53$	0,03098*

Fonte: SPADA, 2019.

Legenda: valores de referência de acordo com o proposto por Kaneko et al. (2008). De acordo com o teste T, não há diferença significativa para o nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$) entre os parâmetros analisados.

Ao analisar a Tabela 8, onde está descrito a comparação da pesquisa hematológica do grupo contendo 6 cavalos positivos (GP-cavalos) e 6 cavalos negativos (GN-cavalo), tanto na RIFI, ELISA, quanto no cPCR-SC simultaneamente, de acordo com o teste T, verificamos diferença estatísticas para CHCM ($p=0,0469$) e proteína total ($p=0,0133$). Porém, ao avaliar os valores médios encontrados em cada grupo e comparar com os valores de referência, em ambos os exames avaliados conforme aos grupos selecionados, não foi encontrado alterações, estando estes, dentro do intervalo dos valores de referência (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios e desvio padrão da pesquisa hematológica em dois grupos contendo 6 cavalos positivos (GP-cavalos) e 6 cavalos negativos (GN-cavalo), tanto na RIFI, ELISA, quanto no cPCR-SC simultaneamente para detecção de anticorpos anti-Leishmania spp. e DNA.

Média e desvio padrão dos valores do exame hematológico encontrado em cavalos				
Parâmetros	Valores de referência	GP-cavalos	GN-cavalo	p- value
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	5,5 - 9,5	6,26 $\pm$ 0,85	6,35 $\pm$ 1,9	0,9151
VG (%)	24 - 44	39,48 $\pm$ 9,51	35,88 $\pm$ 4,3	0,4563
Hemoglobina (g/dl)	8 - 14	10,7 $\pm$ 0,84	11,62 $\pm$ 1,65	0,2617
VCM (fl)	39 - 52	51 $\pm$ 17,56	50,42 $\pm$ 2,3	0,9436
CHCM (%)	31 - 35	30,38 $\pm$ 1,35	31,98 $\pm$ 0,83	0,0469*
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	5,5 - 12,5	8,97 $\pm$ 1,56	8,78 $\pm$ 1,08	0,8265
Proteína total (g/L)	60 - 80	74 $\pm$ 9,63	60,6 $\pm$ 0,89	0,0133*
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	100 - 260	119,17 $\pm$ 80,85	111,8 $\pm$ 51,92	0,8649

Fonte: SPADA, 2019.

Legenda: valores de referência de acordo com o proposto por Kaneko et al. (2008). De acordo com o teste T, não há diferença significativa para o nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$) entre os parâmetros analisados

6. 4 ANAMNESE E AVALIAÇÃO CLÍNICA CORRELACIONADAS A POSITIVIDADE DOS CAVALOS

O histórico da presença de cães eutanasiados com LV na propriedade, o convívio do cavalo com cães diagnosticados com LV e a presença de lesão dermatológica, foram correlacionadas com a soropositividade dos mesmos pelos exames ELISA e RIFI, mas não correlação entre essas variáveis.

6. 5 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS UTILIZADOS

A Figura 07 ilustra o resultado da comparação entre os dois testes sorológicos (ELISA e RIFI). Assim, verificou-se que os cavalos positivos isoladamente ou pelo método ELISA indireto ou pela RIFI (ELISA + RIFI) foi de 88 (38,9%). Já o resultado simultâneo de positivos (concordantes positivos) foi de 119 (52,6%). O número de concordantes negativos foi de 20 (8,8%). O resultado dos dois testes divergiu em amostras de 87 animais (38,6%).

Figura 7 - Número total de cavalos positivos isoladamente no ELISA indireto ou na RIFI (ELISA + RIFI), somente para ELISA, somente para RIFI e simultâneos para ELISA x RIFI (N= 226 cavalos).

Fonte: SPADA, 2019.

Análise comparativa (dois a dois) dos métodos de diagnóstico para *Leishmania* spp. em cavalos (número/porcentagem; N°/%) : ELISA indireto; RIFI; ELISA, RIFI, 13A/13B-SG, 13A/13B-SC, ITS1-SG e ITS1-SC, realizado em um total 226 cavalos.

Na Tabela 9, estão os dados da análise estatística comparativa dos diferentes métodos diagnósticos usados na presente pesquisa (RIFI; ELISA, RIFI, 13A/13B-SG, 13A/13B-SC, ITS1-SG e ITS1-SC) quando comparados dois a dois, de acordo com o índice Kappa, ao nível de 5% de significância. Os resultados demonstram uma fraca concordância entre os diferentes métodos avaliados, ou seja, variando de $\kappa = 0$ a $\kappa = 0,1381$. Quando comparado o resultado do ITS1-SG com a RIFI, verificou nível de concordância insignificante ($\kappa = -0,028$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise comparativa (dois a dois) dos métodos de diagnóstico para *Leishmania* sp em cavalos (número/porcentagem; N^o./%): ELISA indireto; RIFI; ELISA, RIFI, 13A/13B-SG, 13A/13B-SC, ITS1-SG e ITS1-SC, realizado em um total 226 cavalos.

Técnicas		Total (N = 240)	Índice Kappa (κ)
ELISA x RIFI	P	119/52,65	0,1381
	N	20/8,85	
	D	87/38,60	
	T	226/100,0	
		κ	Fraca
13A/13B-SG x RIFI	P	8/3,54	0,0109
	N	31/13,72	
	D	197/82,74	
	T	226/100,0	
		κ	Fraca
13A/13B-SG x ELISA	P	6/2,65	0,0227
	N	96/42,48	
	D	124/54,87	
	T	226/100,0	
		κ	Fraca
13A/13B-SC x RIFI	P	5/2,21	0,068
	N	31/13,72	
	D	190/84,07	
	T	226/100,00	
		κ	Fraca
13A/13B-SC x ELISA	P	1/0,44	-0,028
	N	94/41,59	
	D	130/57,97	
	T	226/100,00	
		κ	Insignificante
ITS1-SG x RIFI	P	0/0,00	0
	N	31/13,72	
	D	195/86,28	
	T	226/100,00	
		κ	Fraca
ITS1-SG x ELISA	P	0/0,00	0
	N	98/43,36	
	D	128/56,64	
	T	226/100,00	
		κ	Fraca
ITS1-SC x RIFI	P	0/0,00	0
	N	31/13,72	
	D	195/86,28	
	T	226/100,00	
		κ	Fraca
ITS1-SC x ELISA	P	0/0,00	0
	N	98/43,36	
	D	128/56,64	
	T	226/100,00	
		κ	Fraca

Fonte: SPADA, 2019.

Legenda: (κ) = Índice Kappa; (P) = Cães Positivos; (N) = Cães Negativos; (D) = Cães Discordantes e (T) = Total N = 226 cavalos

6. 6 LEVANTAMENTO DE FLEBOTOMÍNEOS

Os dados referentes à captura dos vetores nos municípios de Andradina e Ilha Solteira, estado de São Paulo, estão apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Analisando a Tabela 10, referente a captura realizada no município de Ilha Solteira, é possível verificar que os pontos 5, 6 e 3 respectivamente apresentaram maior densidade e/ou quantidades de flebotomíneos capturados, além dos outros locais esporádicos, 4 e 1. O ponto 2 foi o único que em nenhum dos 24 meses foi capturado exemplar flebotomíneo. Dessa forma, em 5/6 (83,3%) das propriedades visitadas, constatou-se a presença do flebotomíneo. A densidade parasitária variou de 0 a 25 machos, com média mensal de 2 ± 3 e 0 a 17 fêmeas, com média mensal de 02 ± 2 , totalizando 64 machos e 50 fêmeas em 24 meses.

Os dados referentes a captura realizada no município de Andradina, estão descritos na Tabela 11 sendo possível verificar que os pontos 1 e 4 respectivamente apresentaram maior densidade e/ou quantidades de flebotomíneos capturados, além dos outros locais esporádicos, 2, 6, 3 e 5 respectivamente. Dessa forma, em 6/6 (100%) das propriedades visitadas, constatou-se a presença do flebotomíneo. A densidade parasitária variou de 0 a 5 machos, com média mensal de 1 ± 2 e 0 a 5 fêmeas, com média mensal de 1 ± 1 , totalizando 32 machos e 16 fêmeas em 24 meses.

Tabela 10 - Relação de flebotomíneos (machos e fêmeas) capturados ao longo de 24 meses nas 6 propriedades localizadas no município de Ilha Solteira, SP, período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018.

Número de flebotomíneos capturados mensalmente em 6							
Mês/ano	propriedades diferentes						Total
	1	2	3	4	5	6	
Jan/2017	0	0	0	0	0	0	0
Fev/2017	0	0	0	0	0	1M	1M
Mar/2017	0	0	0	0	0	0	0
Abr/2017	0	0	0	0	0	0	0
Mai/2017	1M	0	0	1F 4M	0	0	1F 5M
Jun/2017	0	0	0	1F 1M	0	0	1F 1M
Jul/2017	0	0	1M	1M	0	0	2M
Ago/2017	0	0	0	0	0	0	0
Set/2017	0	0	0	0	0	0	0
Out/2017	0	0	0	0	0	1M	1M
Nov/2017	0	0	0	0	0	0	0
Dez/2017	0	0	0	0	0	0	0
Jan/2018	0	0	1M 1F	0	0	1F	2F 1M
Fev/2018	1F		4M 4F	1M	1M	1M 2F	7F 7M
Mar/2018	0	0	0	0	0	2F	2F
Abr/2018	0	0	0	1M	5M 1F	1F	2F 6M
Mai/2018	1F	0	0	0	1M 2F	3M 3F	6F 4M
Jun/2018	0	0	0	0	1F	1F	2F
Jul/2018	2F	0	2M 1F	0	0	0	3F 2M
Ago/2018	2M 1F	0	1F	0	3M 2F	0	4F 5M
Set/2018	0	0	0	0	0	0	0
Out/2018	0	0	0	0	1M 1F	0	1F 1 M
Nov/2018	0	0	1M 1F	0	22M 15F	2M 1F	17F 25M
Dez/2018	0	0	1M	0	2M 1F	1F	2F 3M
Total	3M 5F	0	10M 8F	8M 2F	35 M 23F	8M 12F	64M 50F

Fonte: SPADA, 2019.

Legenda: *M=Machos; F= Fêmeas

Tabela 11 - Relação de flebotomíneos (machos e fêmeas) capturados ao longo de 24 meses nas 6 propriedades localizadas no município de Andradina, SP, período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018.

Número de flebotomíneos capturados mensalmente em 6							
Mês/ano	propriedades diferentes						Total
	1	2	3	4	5	6	
Jan/2017	1F	1F	1M	0	0	0	2F 1M
Fev/2017	0	0	0	0	1M	0	1M
Mar/2017	0	1F	0	0	0	0	1F
Abr/2017	0	0	0	0	0	3M	3M
Mai/2017	1F	0	0	0	0	0	1F
Jun/2017	0	0	0	0	0	0	0
Jul/2017	0	0	0	0	0	0	0
Ago/2017	1F 4M	0	0	0	0	0	1F 4M
Set/2017	0	0	0	3M	0	0	3M
Out/2017	0	0	0	0	0	0	0
Nov/2017	0	0	0	0	0	0	0
Dez/2017	0	1M 1F	1M 1F	0	0	0	2F 2M
Jan/2018	3M	1M	0	0	0	0	4M
Fev/2018	0	0	0	0	0	0	0
Mar/2018	0	0	0	0	0	0	0
Abr/2018	4F 2M	0	0	0	0	1M 1F	5F 3M
Mai/2018	0	0	0	0	0	0	0
Jun/2018	0	0	0	0	0	0	0
Jul/2018	0	0	0	0	0	0	0
Ago/2018	1M 2F	0	0	4M 1F	1F	0	4F 5M
Set/2018	0	0	0	0	0	0	0
Out/2018	0	0	0	0	0	0	0
Nov/2018	2M	0	0	0	0	0	2M
Dez/2018	3M	0	0	1M	0	0	4M
Total	9F 15M	3F 2M	1F 2M	1F 8M	1F 1M	1F 4M	32M 16F

Fonte: SPADA, 2019.

Legenda: *M=Machos; F= Fêmeas

A Figura 8 ilustra contagem total mensal de flebotomíneos capturados no município de Andradina, correlacionando com os dados de temperatura média mensal (C°) e precipitação pluvial (mm). Os dados climáticos foram obtidos do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO), durante o período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018. É possível observar um aumento no número de flebotomíneos nos meses de agosto/2017, abril/2018 e agosto/2018. Observa-se que nos meses de junho/2017, julho/2017, outubro/2017, novembro/2017, novembro/2017, fevereiro/2018, março/2018, maio/2018, junho/2018, julho/2018, setembro/2018 e outubro/2018, não houve captura do flebotomíneo. A precipitação máxima foi observada no ano de 2017 foi no mês de janeiro/2017 (254,4 mm), embora com leve declínio nos meses subsequentes (variando de 227,8 a 0 mm). No ano de 2018, a precipitação máxima também foi observada no mês de janeiro/2018 (235,2 mm), com leve declínio nos meses subsequentes (variando de 188,6 a 0,2 mm). Por outro lado, a temperatura média mensal no ano de 2017, variou de 28,5°C (mês de dezembro/2017) a 21°C (meses de junho/2017 e julho/2017). No ano de 2018, a temperatura média mensal, variou de 28,7°C (mês de março/2018) a 21,8°C (mês de agosto/2018). Ao avaliar os dois anos podemos verificar que não houve variação na temperatura média mensal, diferente da precipitação máxima, onde houve variação no mês de agosto/2017 (86,2 mm) quando comparado ao mês de agosto/2018 (22,8 mm).

Figura 8 - Contagem mensal de Flebotomíneos capturados no município de Andradina, durante o período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018, comparados com dados de temperatura média mensal (C°) e precipitação pluviométrica (mm). Dados climáticos obtidos do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO).

Fonte: SPADA, 2019.

Figura 9 ilustra contagem total mensal de flebotomíneos capturados no município de Ilha Solteira, correlacionando com os dados de temperatura média mensal (C°) e precipitação pluvial (mm). Os dados climáticos foram obtidos da Estação Meteorológica da Área de Hidráulica e Irrigação da UNESP-Campus de Ilha Solteira., durante o período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018. É possível observar um aumento no número de flebotomíneos nos meses de novembro/2018, fevereiro/2018 e maio/2018. Observa-se que nos meses de janeiro/2017, março/2017, abril/2017, agosto/2017, setembro/2017, novembro/2017, dezembro/2017 e setembro/2018, não houve captura do inseto. A precipitação máxima foi observada no ano de 2017 foi no mês de novembro/2017 (311,8 mm), embora com leve declínio nos meses subsequentes (variando de 263,8 a 0 mm). No ano de 2018, a precipitação máxima também foi observada no mês de janeiro/2018 (259,8 mm), com leve declínio nos meses subsequentes (variando de 245,4 a 0 mm). Por outro lado, a temperatura média mensal no ano de 2017, variou de 27,7°C (mês de fevereiro/2017) a 21,3°C (mês de julho/2017). No ano de 2018, a temperatura média mensal, variou de 27,7°C (mês de dezembro/2018) a 22°C (mês de agosto/2018). Ao avaliar os dois anos podemos verificar que não houve variação na temperatura média mensal, diferente da precipitação máxima, onde houve variação nos meses de março/2017 (143,3 mm), abril/2017 (128,5 mm) e maio/2017 (160 mm) quando comparado ao meses de março/2018 (mm), abril/2018 (79,5 mm) e maio/2018 (160 mm).

Figura 9 - Contagem mensal de Flebotomíneos capturados no município de Ilha Solteira, durante o período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018, comparados com dados de temperatura média mensal (C°) e precipitação pluviométrica (mm). Dados climáticos obtidos da Estação Meteorológica da Área de Hidráulica e Irrigação da UNESP-Campus de Ilha Solteira.

Fonte: SPADA, 2019.

Após a identificação das espécies dos flebotomíneos (16 fêmeas e 32 machos) capturados no município de Andradina no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018, foram encontrados: *Nyssomyia neivai* (6,26%), *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (43,75%), *Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi* (43,75%), *Nyssomyia whitmani* (2,08%), *Brumptomyia* spp. (2,08%) e *Nyssomyia* spp. (2,08%). Entre todas as espécies identificadas, destaca-se a presença de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (3 fêmeas e 18 machos) sendo o principal vetor incriminado da transmissão da LV (Tabela 13).

Tabela 12 - Relação de flebotomíneos (machos e fêmeas) identificados conforme a espécie ao longo de 24 meses nas 6 propriedades localizadas no município de Andradina, SP, período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018.

Espécie	Sexo		Total	%
	Fêmea	Macho		
<i>Nyssomyia neivai</i>	1	2	3	6,26
<i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i>	3	18	21	43,75
<i>Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi</i>	10	11	21	43,75
<i>Nyssomyia whitmani</i>	0	1	1	2,08
<i>Brumptomyia</i> spp.	1	0	1	2,08
<i>Nyssomyia</i> spp.	1	0	1	2,08
Total	16	32	48	100

Fonte: SPADA, 2019.

Os dados referentes a identificação das espécies de flebotomíneos (50 fêmeas e 64 machos) capturados no município de Ilha Solteira no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018, estão descritos na Tabela 14, onde podemos verificar a prevalência de 7 espécies diferentes com maior incidência de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (28,10%), seguida de *Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi* (20,20%). Com menor prevalência verificamos a presença da *Nyssomyia whitmani* (0,88%).

Tabela 13 - Relação de flebotomíneos (machos e fêmeas) identificados conforme a espécie ao longo de 24 meses nas 6 propriedades localizadas no município de Ilha Solteira, SP, período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018.

Espécie	Sexo		Total	%
	Fêmea	Macho		
<i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i>	10	22	32	28,10
<i>Nyssomyia neivai</i>	2	7	9	7,89
<i>Evandromyia (Aldamyia) carmelinoi</i>	8	15	23	20,20
<i>Brumptomyia avellari</i>	4	6	10	8,77
<i>Evandromyia (Barrettomyia) Cortelezzii</i>	3	2	5	4,39
<i>Brumptomyia spp</i>	4	1	5	4,39
<i>Psathyromyia (Forattiniella) brasiliensis</i>	1	2	3	2,63
<i>Nyssomyia whitmani</i>	1	0	1	0,88
<i>Evandromyia (Aldamyia) lenti</i>	5	8	13	11,4
<i>Sciopemyia sordellii</i>	1	1	2	1,75
<i>Evandromyia (Aldamyia) spp.</i>	11	0	11	9,65
Total	50	64	114	100

7 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a contemplar a investigação epidemiológica da presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. e DNA de *Leishmania* spp. em equinos no município de Andradina, estado de São Paulo. Já nas demais cidades do estado, há relatos da investigação do parasito, DNA do parasito e/ou anticorpos em estudos por Benvenga (2013), Benassi et al., (2018) no município de Ilha Solteira; por Feitosa et al, (2012) no município de Araçatuba e por Paixão (2017) no município de Bauru.

Foram investigados animais utilizados em atividades esportivas bem como para proporcionar suporte financeiro, na maioria das vezes sendo utilizados para tração. Mesmo com o desenvolvimento tecnológico de veículos de transporte, é comum a utilização de equinos para tração de carroças, para pequenos fretes, recolhimento de entulho, lixo, entre outras atividades em centros urbanos em muitas cidades brasileiras (MARANHÃO et al., 2007) os tornando importantes e indispensáveis para a sobrevivência de algumas pessoas (CHAVES et al., 2014).

Quando utilizado em atividades esportivas, são animais que viajam pelo Brasil competindo em diferentes provas, como a dos três tambores, podendo ser este um potencial carreador de *Leishmania* spp. há cidades não endêmicas, uma vez que o papel do equino na cadeia de transmissão ainda não foi totalmente esclarecido, sabendo que o mesmo realiza soroconversão (FEITOSA et al., 2012) e há relatos da preferência alimentar de fêmeas de flebotomíneos pela espécie equina (OLIVEIRA-PEREIRA et al., 2008). Sousa (2018), recentemente verificou que na presença de diversos animais sinantrópicos, além das aves, os equinos atraíram mais insetos para repasto sanguíneo sendo a maioria da espécie *Lu. longipalpis*.

A coabitação de equinos com cães em áreas endêmicas, faz com que o mesmo fique exposto a *L. infantum* (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006). Abrantes et al. (2018), estudando os fatores relacionados a ocorrência de LVC canina, verificou que cães convivendo com outros cães, bem como em locais onde houve histórico de remoção de outros animais com a doença do domicílio, foi considerado um fator para o aumento de ocorrência da infecção. A presente pesquisa demonstra que a maior população de equinos, pelo menos 168 animais, encontram-se coabitando com cães

e que pelo menos 53 residem em propriedades com relatos de cães eutanasiados com LV e 58 estão convivendo com cães diagnosticados com LV, porém não foi evidenciado uma correlação entre a soropositividade dos cavalos e o relato dos tutores referentes a presença de cães com LV ou eutanasiados com a doença.. Chagas (2017), relatam a coabitação de equinos encontrados sororreagentes com cães, no município de Araguaína, estado de Tocantins, e como evidenciado pela pesquisa, sem correlação com a positividade dos cães, porém, a área de pesquisa também é considerada endêmica para LV.

A infecção por *Leishmania* em equinos pode ser assintomática, como também é capaz de produzir uma variedade de lesões cutâneas, devendo qualquer lesão papulonodular e / ou ulcerada ser considerada diagnostico diferencial para leishmaniose na espécie em estudo (SOARES et al., 2013). Ainda, MÜLLER et al. (2009), descrevem sendo pápulas ou nódulos solitários ou múltiplos, que estão presentes na cabeça, orelha, escroto, pernas e pescoço, as lesões da leishmaniose em equinos. Ao correlacionar a presença da alteração dermatológica com a soropositividade dos cavalos, não verificamos correlação, dermatopatias grande similaridade clínica, destacando alopecia focal ou disseminada, dermatite com a presença de crostas e pústulas, informações essas também evidenciadas por Gramiccia (2011). Reforçando nossos dados, Soares (2012) verificou em trinta e quatro animais, lesão ou alteração dermatológica como nódulo ou alopecia em equinos. Todos os relatos da doença são relacionados a lesões cutâneas e pouco frequência de visceralização em equinos (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006).

Utilizando o teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp., 60,6% dos 226 cavalos foram positivos. Paixão (2017) encontrou resultado inferior, 24% de um total de 100 equinos avaliados no município de Bauru. Já Chagas (2017) também encontrou resultado inferior, 17,6% de um total de 165 animais ao pesquisar anticorpos anti-*Leishmania infantum* no município de Araguaína, estado de TO. Sororreatividade de 14,59% em 466 equinos testados para a presença de IgG anti-*Leishmania chagasi* pelo método de ELISA, foi encontrado no município de Araçatuba (FEITOSA et al., 2012). No município de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, Soares (2012) verificou soroprevalência estimada em 41,43% dos equinos analisados, dado esse que mais se aproxima com os encontrados em nossa pesquisa. Mais recentemente, Ferreira et al. (2018), testando 138 equinos provenientes dos

municípios de Pinheiro, Arari e Anajatuba, estado do Maranhão, constatou sororreatividade em 25,4% das amostras testadas, também pelo teste ELISA. Atualmente, o teste ELISA é recomendado pelo Ministério da Saúde como sendo confirmatório da LVC.

Ao submeter as amostras à técnica de RIFI, constatamos que 89,4% dos animais apresentavam anticorpos anti-*Leishmania* na titulação 1:40, titulação adotada conforme preconizado para cães (BRASIL, 2014). Entretanto, há alguns autores que utilizam o título de 1:80 em pacientes humanos (PASSOS et al., 2000). Encontramos na literatura sororreatividade de equinos submetidos a mesma análise de 16% de um total de 100 animais no município de Bauru (PAIXÃO, 2017), 2,5% de 40 equinos no município de Ilha Solteira (BENASSI et al., 2018), 47,62% de 210 no município de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais (SOARES, 2012), 4,34% de 138 dos municípios de Pinheiro, Arari e Anajatuba, estado do Maranhão (FERREIRA et al., 2018) e 40% positivos de um total de 100 cavalos do município de Bauru (VILLALOBOS et al., 2010).

A categorização da RIFI quanto a titulação de anticorpos anti-*Leishmania* variou de 1:40 a 1:1.280, 35,1% dos animais encontram-se com titulação na RIFI 1:320, seguida 31,2% animais com titulação 1:160, 22,8% animais com titulação 1:60, 8,9% com titulação 1:40, 3 (1,5%) com titulação 1:640 e apenas 1 animal com titulação igual a 1:1.280. Soares (2012) verificou que 64% dos equinos positivos encontravam-se com titulação 1:40, 30% com titulação 1:80 e 6% com titulação 1:160. Soares et al. (2013) testando dois animais encontrou um com titulação 1:40 e outro para titulação 1:80. Paixão (2017) encontrou 10 equinos com titulação 1:40, 1 com titulação 1:80 e 3 com titulação 1:160. Mais recentemente no estudo de Benassi et al., (2018) o animal soropositivo na RIFI se encontrava com titulação 1:80.

A concordância entre os testes sorológicos ELISA e RIFI, apresenta fraca correlação, com índice Kappa a nível de 5% de 0,131, com soroprevalência pela combinação de ambas as técnicas de 30,48% (SOARES, 2012). Dados semelhantes encontrados em nossa pesquisa, onde constatamos Kappa 0,1381, apresentando também fraca correlação. Porém o resultado simultâneo dos positivos foi de 52,6%. Paixão (2017), também encontrou fraca concordância entre os testes (Kappa < 0,2). Essas diferenças na concordância dos testes utilizados, pode estar relacionada à natureza do antígeno, pois a sensibilidade e especificidade da RIFI podem variar de

acordo com a espécie de antígeno utilizada (GONTIJO, 2003; SCHWANKE, 2014). Esses dados reforçam a importância e a necessidade da associação das técnicas, procurando a identificação adequada dos animais positivos (SILVA et al., 2014).

O grande número de animais positivos nos exames sorológicos, sugere ponderar os possíveis falso-positivos, oriundos de reações cruzadas, ainda não determinadas no equino (SOARES, 2012), porém já verificado amplamente no ser humano e caninos (BRITO et al., 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003). No cão, alguns autores relatam no diagnóstico para LVC a reação cruzada com outras espécies de *Leishmania* spp., *Ehrlichia canis*, *Trypanosoma caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (ZANETTE, 2006; SILVA et al., 2011). Outros sugerem a ocorrência de reação cruzada entre LV, LT e doenças de chagas (LUCIANO et al., 2009; LANGONI, 2016) favorecida por conta dos agentes etiológicos destas doenças pertencerem à mesma família Trypanosomatidae compartilhando um grande número de antígenos, favorecendo assim a ocorrência de reação cruzada por métodos sorológicos (SOBRINHO et al., 2012). Romariz (2018), avaliando 110 búfalos provenientes de Andradina, SP e de Selviria, MS, constatou que 90% dos animais apresentavam anticorpos anti-*Leishmania* pela RIFI utilizando antígeno de *L. infantum*, sugerindo reação cruzada com *Trypanosoma theileri*, devido ao fato de que 67% desses animais encontravam-se infectados com esse parasita, evidenciado pelo autor.

Por promoverem alta sensibilidade e especificidade, é verificado um aumento da utilização dos métodos baseados em PCR na detecção de *Leishmania* spp. (KUMAR, et al., 2007). Frente aos dados sorológicos, buscou-se avaliar a presença do material genético do parasito no sangue e no suabe conjuntival por meio da PCR. Utilizando-se o *primer* LIT5R/L5-8S (ITS-1) todas as amostras foram negativas e ao utilizar o *primer* 13A/13B, foram detectados 8 cavalos positivos pelo sangue e 6 positivos pelo suabe para o gênero *Leishmania* spp., identificando prevalência de 5,95%. Soares (2012) determinou prevalência de 16,08%, dado esse razoavelmente alto quando comparado aos dados obtidos pela pesquisa. Em um outro estudo, Paixão (2017) constatou prevalência de 6% em pesquisa de DNA no sangue de equinos, corroborando com nossos resultados. Benassi et al. (2018) verificaram prevalência 90% pela PCR de suabe conjuntival e 100% pela PCR de sangue em equinos. Prevalência de 12,86% em suabe conjuntival de equinos também foi verificado

(BENASSI, 2015). Justificando os ensaios de cPCR utilizados pela presente pesquisa, os ensaios que utilizam como alvo de cinetoplasto (kDNA), são mais sensíveis na detecção de leishmanias, apresentando cerca de 10.000 minicírculos de DNA distribuídos em, aproximadamente, 200bp de região conservada e 600bp de região variável (MOHAMMADIHA, et al., 2013).

Em relação ao baixo número de animais negativos nos diferentes ensaios da PCR, alto número de animais sororreagentes tanto ao teste ELISA quando a RIFI, acreditamos que o parasito esteja entrando em contato com os equinos, fazendo soroconversão e rapidamente havendo cronificação da doença, onde o mesmo deixa de ficar circulante no hospedeiro. Os dados corroboram com os dados obtidos por Cerqueira et al. (2003), onde constataram que equídeos infectados experimentalmente realizam soroconversão e mantem formas amastigotas do parasita no fígado, estes não desenvolvem sinais clínicos e nem são infectivos ao flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, quando submetidos ao xenodiagnóstico (CERQUEIRA et al., 2003). Sores (2012) sugere que os resultados negativos na PCR também podem estar relacionados com a degradação do DNA, pela ausência de avaliação para genes equinos constitutivos (SOARES, 2012).

Entre todos os animais avaliados, apenas seis equinos estavam positivos pela RIFI, ELISA e 13A/13B cPCR-SG simultaneamente e apenas um animal positivo pela RIFI, ELISA e 13A/13B cPCR-SC simultaneamente. Não encontramos sequer um animal que tenha sido positivo em todos os testes diagnósticos. A discordância entre técnicas diagnosticas está relacionada a prováveis fases distintas de infecção e/ou doença (SOARES, 2012).

Achados clínicos e laboratoriais devem ser utilizados para suspeita diagnóstica da leishmaniose, mas somente o encontro do parasito confirma a presença do mesmo (PASTORINO et al. 2002). Analisando os valores médios e desvio padrão da pesquisa hematológica, comparando com os animais apresentando sorologia negativa com a positiva, permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie. Mesma coisa se repetiu quando foram analisados os seis equinos que apresentaram positividade simultânea nos testes sorológico e molecular. Esses dados diferem do encontrado por Soares (2012), que verificou nos grupos de animais reativos, maiores índices no hematócrito, VGM e HCM, demonstrando característica regenerativa. Poucos são os estudos sobre a leishmaniose em equinos, e correlação com os

exames hematológicos, mas sabe-se que mesmo para LVC, ainda há discussão na literatura acerca dos valores hematológicos no diagnóstico da leishmaniose (REIS et al., 2006). Segundo Reis et al. (2006) os achados mais constantes são anemia normocítica, normocrômica e não regenerativa. Medeiros et al. (2008) evidenciaram a presença de hiperproteinemia e trombocitopenia em cães reagentes. Oliveira et al. (2018) também encontraram a presença de hiperproteinemia e trombocitopenia em gatos infectados por *Leishmania infantum*.

Analisando função hepática e renal dos cavalos e comparando com os grupos de animais soropositivos, verificamos aumento de ureia circulante no grupo com sorologia negativa. Porém, ao analisar os seis equinos que apresentaram positividade simultânea nos testes sorológico e molecular, constatamos além do aumento de ureia no grupo negativo, aumento de globulinas e diminuição de albumina no grupo positivo. Para descartar qualquer acometimento renal dos animais frente a alteração dos níveis de ureia, faz-se necessário correlacionar a elevação da mesma com valores de creatinina e proteínas totais, e quando constatada a apresentação dos níveis de creatinina dentro dos limites de normalidade e ausência de proteinúria, é verificado quadro clínico sugestivo de desidratação ou desequilíbrio metabólico com maior consumo endógeno de proteínas musculares (BRAUN; LEFEBVRE, 2008). Verificamos que o grupo de equinos que apresentavam aumento de ureia, não apresentava alteração nos níveis de creatinina muito menos proteinúria, e corroborando com nossos dados descartando assim uma possível lesão renal, tendo em vista que os animais estavam em horário de trabalho durante a coleta de material biológico, Soares (2012), sugere que elevados níveis de ureia estão relacionados com as perdas por suor ou menor ingestão de água, relacionado ao horário da coleta, podendo os animais em trabalho apresentar essa alteração. Na LVC, é comum o comprometimento renal levando proteinúria e aumento sérico de ureia e creatinina (ETTINGER, FELDMAN; 2004) dados não encontrados nos equinos avaliados pela pesquisa. Porém já o aumento, mesmo que pequeno, da concentração plasmática de globulinas e diminuição de albuminas no grupo de animais positivos, possa estar relacionado a uma possível inflamação, induzindo assim aumento das globulinas circulantes (KERR, 2003). Em cães positivos, sendo a LVC de caráter crônico, é comum verificar o aumento da concentração de globulinas e uma diminuição na concentração de albumina (CIARAMELLA; CORONA, 2003), devido ao aumento de

anticorpos anti-*Leishmania* (REIS et al., 2006; FREITAS et al., 2012), o que provavelmente também ocorre em gatos (OLIVEIRA et al., 2018). Frente aos dados constatados pela literatura na espécie canina, levantamos a hipótese da doença se manifestar de maneira crônica nos equinos, como foi evidenciado pela presente pesquisa.

Um dos desafios referentes aos controles das leishmanioses, principalmente estão relacionadas ao conhecimento da distribuição das populações dos flebotomíneos, seus comportamentos e identificação das espécies (SANGUINETTE et al., 2015) sendo esses insetos altamente dependentes de oscilações e variabilidade climática, influenciando na transmissão do parasita ao hospedeiro (MARQUES, 2013). A densidade do mesmo varia sazonalmente devido sua sensibilidade climática, principalmente temperatura e precipitação (GÁLVEZ et al., 2010; READY, 2013) podendo afetar a alimentação do vetor, bem como a eclosão dos ovos (REISEN, 2010). Dessa forma, Camargo-Neves et al. (2001) consideraram a necessidade de correlacionar densidade vetorial com os aspectos ambientais. Além disso, as habitações humanas de má qualidade em locais inadequados, a construção desordenada de abrigos de animais domésticos no ambiente peridomiciliar e a carência de condições mínimas de saneamento básico, foram condições consideradas comuns em áreas rurais e periféricas de centros urbanos (MUNIZ et al., 2006) propícias para a criação e manutenção dos criadouros dos vetores transmissores da doença. Frente a essas informações, foram realizadas coletas durante dois anos consecutivos nos municípios de Andradina e Ilha Solteira, procurando correlacionar o número de flebotomíneos com os dados climáticos, evitando a sazonalidade que possa ocorrer de um ano para o outro.

Nos dois municípios foram encontrados a presença dos flebotomíneos, totalizando durante os dois anos de pesquisa, em Andradina 48 espécimes, sendo 32 machos e 16 fêmeas e em Ilha Solteira 114 espécimes, sendo 64 machos e 50 fêmeas. Esses dados corroboram aos encontrados por outros estudos, onde a maioria das coletas referência um número maior de machos que fêmeas (SPADA et al., 2014; LANA et al., 2015; SANGUINETTE et al., 2015; SILVA, 2016). A captura de um número maior de machos pode estar relacionada com a instalação das armadilhas próximas aos criadouros naturais dos flebotomíneos, atraindo, assim, os flebotomíneos machos que tendem a emergir primeiro que as fêmeas (GALATI et al.,

1997) bem como a liberação de mediadores químicos, tais como cairomônios e feromônios, pelos hospedeiros vertebrados e estes insetos (KELLY; DYE, 1997)

Em Andradina foram identificadas 6 espécies distintas de flebotomíneos e Ilha Solteira 11 espécies, dentre todas se destacando a maior densidade de *Lu. (Lu.) longipalpis*, em ambos os municípios. Corroborando com nossos dados, verificamos que sempre há maior captura da espécie *Lu. (Lu.) longipalpis* (MARINHO, et al., 2008) pelo alto grau de adaptação da espécie ao ambiente peridoméstico de áreas antropizadas sendo influenciado, principalmente, pela presença de animais domésticos (XIMENES et al., 2006). Spada et. al (2014), encontrou flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis*, em doze propriedades no município de Ilha Solteira, além de cães positivos para LVC, demonstrando assim a correlação do vetor com a presença da doença em cães. Vale ressaltar que *Lu. (Lu.) longipalpis* e *Lu. (Lu.) cruzi* estão relacionadas com a transmissão da LV (BRASIL, 2014). Outras espécies foram capturas, entre elas espécies relacionadas com a transmissão da LT.

Analisando-se a curva sazonal de flebotomíneos, com as variações climáticas, verificou-se neste estudo uma maior abundância desta espécie, após períodos chuvosos. O que pode ter de fato influenciado na curva de ocorrência dos vetores, seria a precipitação pluvial. A precipitação, aliada à umidade do solo, aumenta a disponibilidade de alimento, hospedeiros e micro habitats favoráveis ao desenvolvimento, explicando assim maior abundância de flebotomíneos capturadas no período chuvoso (SILVA, 2017). Macedo et al. (2008) verificaram que os flebotomíneos apresentaram uma distribuição sazonal associada aos índices pluviométricos e de umidade, somente durante ao período chuvoso do ano.

Os resultados da presente pesquisa alertam para a presença de equinos infectados por *Leishmania* spp. em áreas endêmicas, sem sinais clínicos característicos, bem como da manutenção da fauna de flebotomíneos vetores de LC e LV na área estudada.

8 CONCLUSÕES

Observa-se no presente estudo, que os equinos apresentam soroprevalência alta aos exames ELISA e RIFI, constatando que a espécie estudada esteja em contato com o parasito e realizando soroconversão. Maior atenção deve ser dada aos equinos provenientes de regiões endêmicas para as leishmanioses na área de clínica médica veterinária, sendo importante o diagnóstico diferencial para a doença e mais estudos devem ser realizados procurando o isolamento e caracterização da espécie envolvida, uma vez que eles aparentemente se comportam como hospedeiros acidentais e a região mantém a fauna ativa de vetores incriminados na transmissão tanto da LV quanto da LT, como constatado nos municípios de Andradina e Ilha Solteira.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, T. R.; WERNECK, G. L.; ALMEIDA, A. S.; FIGUEIREDO, F. B. Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 34, .1, 2018

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

ALENCAR, J.E. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista de. Medicina da Universidade Federal do Ceará**, n. 17, v. 18, p. 129-148, 1977.

ALENCAR, J.E. Um caso de leishmaniose tegumentar em Equus asinus. In: **XIV Congresso Brasileiro de Higiene**, Niterói, Brasil. 1959.

ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 109-122, 2000.

ARIAS, J.R.; NAIFF, R.D. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmanis braziliensis guyanensis* inn the Amazon Basin of Brazil. Trans. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, n.4, p.537-541, 1981.

ASHFORD, R.W. What it takes to be a reservoir host. **The Belgian Journal of Zoology**, n.1, p. 85- 90, 1997.

AZEVEDO, P. C. B.; LOPES G. N.; FONTELES R. S.; VASCONCELOS G. C.; MORAES J. L. P.; REBÊLO J. M. M. The effect of fragmentation on phlebotomine communities (Diptera: Psychodidae) in areas of ombrophilous forest in São Luís, state of Maranhão, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, n. 2, p. 271-277, 2011.

BARBOSA-de-DEUS, R.; MARES-GUIA, M.L.; NUNES,A.Z.; COSTA, K.M.; JUNQUEIRA, R.G.; MAYRINK, W.,GENARO, O.; TAVARES, C.A.P. Leishmania major-likeantigen for specific and sensitiveserodiagnosis of humanand canine visceral leishmaniasis. **Clinical and DiagnosticLaboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p.1361-1366, 2002.

BARBOSA-SANTOS, E.G.O.; MARZOCHI, M.C.A.; URTADO, W.; QUEIRÓS, F.; CHICARINO, J.; PACHECO, R. S. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a mare (*Equus caballus*): immunotherapy and chemotherapy assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, n.2, p.217-220, 1994.

BATES, P. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. **International Journal for Parasitology**, Australia, n. 37, p. 1097-1106, 2007.

BENASSI, J. C.; BENVENGA, G. U.; FERREIRA, H. L.; SOARES, R. M.; SILVA, D. T.; PEREIRA, V. F.; RUIZ, V. L. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n. 6, p. 1058-1063, 2018.

BENASSI, J. C. **Detecção de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos**. 2015. 74 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2015.

BENVENGA, G. U. **Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo**. 2013. 101 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

BRANDÃO-FILHO S.P.; CARVALHO, F.; BRITO, M. E. F.; ALMEIDA, F.; NASCIMENTO, L. A. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n.3, p. 445-449, 1994.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; BRITO, M.E.; CARVALHO, F.G.; ISHIKAWA, E. A.; CUPOLILLO, E.; FLOETER-WINTER, L.; SHAW, J.J. Wild and synantropic 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.

BRAUN, J; LEFEBVRE, H. P.; Kidney function and damage. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of domestic animals**. 6. ed. Londres: Elsevier, 2008, Cap. 16, p.485-528.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde** Brasília, p. 25, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar**. Brasília, p. 191, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, p. 122, 2014.

BRAZIL, R. P., BRAZIL, B. G. Biologia de flebotomíneos neotropicais. In: Rangel EF, LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2003. p.257-274.

BRITO, M. E. F.; MENDONÇA, M. G.; GOMES, Y. M.; JARDIM, M. L., ABATH, F. G. C. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.7, p.318-321, 2000.

CAMARGO, J.B.; TRONCARELLI, M.Z.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.71, p.86-92, 2007.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; POLETO, D. W.; LAGE, L. C.; SPINOLA, R. M. F.; CRUZ, O. G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de Leishmaniose Visceral Americana-Araçatuba, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, São Paulo, v. 17, n.5, p. 1263-1267, 2001.

CARDIM, M. F. M.; GUIRADO, M. M.; DIBO, M. R.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: spatial and space-time analysis. **Revista Saúde Pública**, v. 50:48, 2016.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, n. 5, p. 358-368, 2003.

CERQUEIRA, E. J. L. **O papel dos equíneos na ecologia da Leishmaniose visceral no Estado da Bahia, Brasil**. 2001. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Departamento de Protozoologia, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Instituto Oswaldo Cruz, Salvador, 2001

CERQUEIRA, E. J. L.; SHERLOCK, I.; GUSMÃO, A.; BARBOSA JÚNIOR, A. A.; NAKATANI, M. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 6, p. 695-701, 2003.

CHAGAS, F. S. C. **Soroepidemiologia de *Leishmania infantum* em equinos de Araguaína, Tocantins**. 2017. 36f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, Araguaína, 2017.

CHAVES, N. P.; BEZERRA, D. C.; SANTOS, H. P.; PEREIRA, H. M.; GUERRA, P. C.; SILVA, A. L. A. Ocorrência e fatores de risco associados à identificação da anemia infecciosa equina em equídeos de tração. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 301-306, 2014.

COSTA, J. M. L.; SALDANHA, C. R.; NASCIMENTO, D.; SAMPAIO, G.; CARNEIRO, F.; LISBOA, E.; SILVA, L. M.; BARRAL, A. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**. v.79, supl.3, p.70-83, 2009.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 2, n. 5, p. 305-318, 2004.

DUARTE, R.; THEOPHILO, F.A.O.; MARZOCHI, M.C.A.; FERREIRA, F.C.; OLIVEIRA, M. R. F.; MENDES, F. A.; GONZAGA, R. A. Sorologia para leishmaniose em equinos no município do Rio de Janeiro. In. **Boletim de Divulgação Técnica e Científica, Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária / SCZ**, Portal Saúde Rio, 2000.

EL TAI, N. O.; OSMAN, O. F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 575-579, 2000.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária, Doenças do Cão e do Gato**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2004. 2156 p.

FABER, W.R.; OSKAM, L.; GOOL, T.; KROON, N. C.; KNEGT-JUNK, K. J.; HOFWEGEN, H.; WAL, A. C.; KAGER, P. A. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.49, n.1, p.70-74, 2003.

FALQUETO, A.; VAREJÃO, J. B. M.; SESSA, P. A.. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic area in the state of Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 443-443, 1987.

FEITOSA, F. L. F.; LEAL, J.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; PERRI, S. H. V.; LIMA, V. M. F. de.; MARCONDES, M. A seroepidemiological study of leishmaniasis in horses in the region from Araçatuba-SP, Brazil, an endemic area for visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 500-502, 2012.

FERNÁNDEZ-BELLON, H.; SOLANOGALLEGU, L.; BARDAGÍ, M. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.181–185, 2006.

FERREIRA, F. P.; CALDART, E. T.; BRITO, D. R. B.; CHAVES, D. P.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. "Baixadeiros" horses: prevalence of anti-*Trypanosoma* spp. and anti-*Leishmania* spp. antibodies. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, 2018.

FORATTINI, O.P. **Entomologia médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmaniose. Bartonelose**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda; 1973.

FORATTINI, O. P.; RABELO, E. X.; PATTOLI, D. G. B. Sobre o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, n. 4, p. 99-100, 1970.

FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LOPES NETO, B. E.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.45, n. 1, p. 24-29, 2012.

GALATI, E.A.B.; GALVIS-OVALLOS, F.; LAWYER, P.; LÉGER, N.; DEPAQUIT, J. An illustrated guide for characteristic and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Parasite**, v. 24, n. 26, 2017.

GALATI, E. A. B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas**. Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.132p, 2018. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>. Acesso em 11 mar. 2019.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; RÊGO-JÚNIOR, F. A.; OSHIRO, E. T.; CHANG, M. R. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 378-90, 1997.

GÁLVEZ, R., DESCALZO, M.A., MIRÓ, G., JIMÉNEZ, M.I., MARTÍN, O., DOS SANTOS-BRANDAO, F., GUERRERO, I., CUBERO, E., MOLINA, R. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. **Acta Tropica**, n. 115, p. 95–102, 2010.

GONTIJO, C.M.F.; SILVA, E.S.; FUCCIO, M.B.; SOUSA, M. C.; PACHECO, R. S.; DIAS, E. S.; ANDRADE-FILHO, J. D.; BRAZIL, R. P.; MELO, M. N. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v.81, n.2, p.143-150, 2002.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p. 338-349, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.8, n.4, p. 419-433, 2010.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, p. 1-8, 2011.

GRIMALDI-JR, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n.__, p.230-250, 1993.

GRIMALDI JUNIOR, R. G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; SANTOS, C. B.; PINTO, I. S.; AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP^R CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 106, n. 3, p. 54-59, 2012.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v.27, n.9, p.403- 409, 2011.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2017**: censo populacional 2010. Brasília: Editora de Brasília, 2017. Disponível em: < <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv100923.pdf>>. Acesso em 11 mar. 2019.

JARRY, D. M. Historique des leishmanioses et de leurs complexes pathogènes. In: DEDET, J. P. (Ed.) **Les leishmanioses**. Paris: Ellipses, p. 13-20, 1999.

JOHN S.W., WEITZNER G., ROZEN R., SCRIVER C.R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, v.192, p. 408-408, 1991.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego: Academic, 2008. 916p.

KELLY, D. W.; DYE, C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Animal Behavior**. v. 53, n. 4, p. 721-31, 1997.

KERR, M. G. Proteínas plasmáticas. In: **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. São Paulo: Roca, p. 87-94, 2003.

KOEHLER, K.; STECHELE, M.; HETZEL, U.; DOMINGO, M.; SCHÖNIAN, G.; ZAHNER, H.; BURKHARDT, E. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.9–17, 2002.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G.E.M.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGLI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M.A.; SCHÖNIAN, G. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, California, n. 5, v. 6, 2011.

KUMAR, R. BUMB, R. A.; ANSARI, N. A.; MEHTA, R. D.; SALOTRA, P. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 5, p. 896-901, 2007.

LAHIRI D.K., NURNBERGER J.I. JR., A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research** v.19, p.5444-5444, 1991.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.2, p.13-32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Leishmania* and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil. **Bulletin of the Panamerican Health Organization**, n.7, p.1-19, 1973.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; POVOA, M. The importance of edendates (sloths, anteaters) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, a causative agent of "pian bois" in north Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, p.611-612, 1981.

LAINSON, R. The American Leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.

LANA, R. S.; MICHALSKY, E. M.; FORTEIS-DIAS, C. L.; FRANÇA-SILVA, J. C.; LARA-SILVA, F. O.; LIMA, A. C. V. M. R.; AVELAR, D. M.; MARTINS, J. C. D.; DIAS, E. D. Phlebotomine sand fly fauna and *Leishmania* infection in the vicinity of the Serra do Cipó National Park, a natural Brazilian heritage site. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 9, 2015.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1 p. 159-174, 1977.

LANGONI, H. IN: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Leishmanioses. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: ROCA, 2016. 11 p.

LIMA, V.M.F., BIAZZONO, L., SILVA, A.C., CORREA, A.P.F.L., LUVIZOTTO, M.C.R.. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v. 25, n. 4, p. 215–218, 2005.

LINDEMBERG, A. A. úlcera de Bauru e seu o micróbio. Comunicação preventiva. **Revista médica de São Paulo**, São Paulo, v. 12, p. 116-120, 1909.

LIRA, R. A.; CAVALCANTI, M. P.; NAKAZAWA, M.; FERREIRA, A. G.; SILVA, E. D.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C.; SOUZA, W. V.; GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, n.137, p. 11-16, 2006.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 46, p. 181-187, 2009.

LYNN, M.A.; MCMASTER, W.R. *Leishmania*: conserved evolution – diverse diseases. **Trends Parasitology**, v. 24, n. 3, p.103-105, 2008.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, N. B.; SOUSA, L. C.; LINHARES, F. E.; AMÓRA, S. S. A.; OLIVEIRA, L. M. B. Sazonalidade de flebotomíneos em áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 18, n. 2, p. 67-74, 2008.

MAIA, C.; RAMADA, J.; CRISTÓVÃO, J.M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **The Veterinary Journal**, v.179, n.1, p.142-144, 2009.

MANCIANTI, F.; FALCONE, M.L.; GIANNELLI, C.; POLI, A. 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.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; FOGLIA MANZILLO, V.; PAVONE, L. M.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 271-280, 2006

MARANHÃO, R. P. A.; PALHARES, M. S.; MELO, U. P.; REZENDE, H. H. C.; FERREIRA, C. Avaliação biométrica do equilíbrio podal de equídeos de tração no município de Belo Horizonte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8. n. 2, p. 297-305, 2007.

MARCONDES, C.B. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. **Entomological News**, v. 118, n. 4, p. 351-356, 2007.

MARINHO, R. M.; FONTELES, R. S.; VASCONCELOS, C.; AZEVÊDO, P. C. B; MORAES, J. L. P. REBÊLO, J. M. M. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em reservas florestais da área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in forest reserves in the metropolitan area of São Luís, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, v. 1, p. 112-116, 2008.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v.80, p.859-876, 1986.

MARZOCHI, M.C.; MARZOCHI, K.B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, v.10, n. 2, p.359-375, 1994.

MAZZA, S. Leishmaniasis cutánea en el caballo y nueva observación de la misma en el perro. **Boletín. Universidad de Buenos Aires. Instituto de Clínica Quirúrgica**, v. 3, p. 462-4, 1927.

MEDEIROS, C. M. O.; MELO, A. G. C.; LIMA, A. K. F.; SILVA, I. N. G.; OLIVEIRA, L. C.; SILVA, M. C. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, v.18, n.1, p.43-50, 2008.

MELLO, C. X., SCHUBACH, A. O; OLIVEIRA, R. V. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; PIMENTEL, M. I.; LYRA, M. R.; E VASCONCELLOS, E. C.; MADEIRA, M. F. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v.109, n 3, p.927-933, 2011.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. 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, n.11, p.5515- 5519, 2005.

MONTEIRO, C. C.; **O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada.** 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) –Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2017.

MIGONE, L. E., Un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). **Bulletin Societe Pathologic Exotique**, n. 6, p. 118-120, 1913.

MÜLLER, N.; WELLE, M.; LOBSIGER, L.; Stoffel, M. H.; Boghenbor, K. K.; Hilbe, M.; Gottstein, B.; Frey, C. F.; Geyer, C.; Bomhard, W. Occurrence of *Leishmania* sp. In Cutaneous Lesions of Horses in Central Europe. **Veterinary Parasitology**, v.166, n.3-4, p.346- 351, 2009.

MOHAMMADIHA, A. MOHEBALI, M.; HAGHIGHI, A.; MAHDIAN, R.; ABADI, A. R.; ZAREI, Z.; YEGANEH, F.; KAZEMI, B.; TAGHIPOUR, N.; AKHOUNDI, B. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 89-94, 2013.

MUNIZ, L. H. G.; ROSSI, R. M.; NEITZKE, H. C.; MONTEIRO, W. M.; TEODORO, U. Estudo dos hábitos de flebotomíneos em área rural no sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 6, p. 1087-1093, 2006.

NORONHA JUNIOR, C. F; ASSIS, J.; DOBRE. P. R; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R. C. V.; STARKE-BUZETTI, W. A; NEVES, M.F. Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em case do município de Ilha Solteira, SP, Brasil. **Ciência Agrárias e Saúde**, Andradina, v. 7, n. 1, p. 32-367, 2007.

OLIVEIRA, F.S; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; BRAZIL, R. P.; PACHECO, R. S. PCR based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.129, p.219– 27, 2005.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N.; MORAES, J. L. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, n. 24, v. 9, p. 2183-2186, 2008

OLIVEIRA-PERERA, Y. N.; REBÊLO, J. M. M.; MORAES, J. L. P.; PEREIRA, S. R. F. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos (Psychodidae, *Lutzomyia*) por *Leishmania* SP na Amazônia maranhense. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 6, p. 540-543, 2006.

OLIVER, M.; GREGORY D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by wich *Leishmania* parasites can escape the host immune responses: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**. Washington, 2019. Disponível em:<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Acesso em 11 mar. 2019.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; SILVA, D. T.; ALVES, M. L.; SPADA, J. C. P.; BENASSI, J. C.; LEONEL, J. A. F.; PEREIRA, N. W.; STARKE-BUZETTI, W. A. An Analysis of Hematological and Biochemical Parameters of cats infected by *Leishmania infantum*. In: **1st International Caparica Congress on Leishmaniasis, 2018**.

PAIXÃO, M. S. **Análise espacial e detecção de tripanosomatídeos em animais de produção de região endêmica para leishmaniose visceral**. 2017. 151f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu, 2017.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G; MELRO, M. C. B. F.; OLIVEIRA, G. G. S.; SANTOS, W. L. C.; CARVALHO, P. L.; SANTOS, A. J. O. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic área for american visceral leishmaniasis. Implication for the disease control. **Acta Tropical**, Inglaterra, v. 69, n.1 p. 75-83, 1998.

PASSOS, V.M.A.; BARRETO, S.M.; ROMANHA, A.J.; KRETTLI, A. U.; VOLPINI, A. C.; COSTA, M. F. L. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. **Bulletin of the World Health Organization**, v.78, n.8, p.968-974, 2000.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **O Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 120-127, 2002.

PAULAN, S. C.; SILVA, H. R.; LIMA, E. A. F.; FLORES, E. F.; TACHIBANA, V. M.; KANDA, C.; NORONHA JUNIOR, A. C. F.; DOBRE, P. R. Spatial distribution of Canine Visceral Leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo Brazil. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 765-774, 2012.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**. n. 48, p. 949-50, 1934.

QUINNELL, R. J., COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, Reino Unido, n. 136, v. 4, p. 1915-34, 2009.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. **Editora Fiocruz**, Rio de Janeiro, p. 257-274, 2003.

R CORE TEAM (2019). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available from: <http://www.R-project.org/>

READY, P.D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **The Annual Review of Entomology**. n. 58, p. 227–250, 2013.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.7, n. 9, p.581-596, 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.81, n.1, p.68-75, 2006.

REISEN, W. K. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. **The Annual Review of Entomology**, n. 55, p. 461–483, 2010

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v.3, n.71, p.267-275, 1990.

ROLÃO, N.; MARTINS, M.J.; JOÃO, A.; CAMPINO, L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. **Parasite**, v.12, n.2, p.183-186, 2005.

ROMARIZ, A. P. P. L. **Estudo de tripanosomatídeos em búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2018.

ROSS, R. (1) note on the bodies recently described by Leishman-Donovan and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, Estados Unidos, v. 2, n. 1, p. 1261-1401, 1903.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SAMPAIO, L.F. O aparecimento, a expansão e o fim da leishmaniose no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Medicina**, n. 8, p. 717-21, 1951.

SANGUINETTE, C. C.; SILVA, D. F.; STUMPP, R. G. V.; REGO, F. D.; TONELLI, G. B.; TANURE, A.; GONTIJO, C. M. F.; ANDRADE-FILHO, J. D. Comparison of the phlebotomine (Diptera: Psychodidae) fauna of urban, transitional, and wild areas in northern Minas Gerais, Brazil. **Parasites and Vectors**, n. 8, p. 428, 2015.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A.; Paiva, M. H.; Freitas, R. A.; Malacco, M. A. *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12, n.3, p.315- 317, 1998.

SARAIVA, E. M.; BARBOSA, A. F.; SANTOS, F. N.; BORJA-CABRERA, G. P.; NICO, D.; SOUZA, L. O.; MENDES-AGUIAR, C. O.; SOUZA, E. P.; FAMPA, P.; PARRA, L. E.; MENZ, I.; DIAS, J. G. J. R.; OLIVEIRA, S. M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: A transmission blocking vaccine. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, n. 13, p. 2423-2431, 2006.

SCHWANKE, K.; SILVA, A. M. M.; PACHECO, A.; BAHIA, M.; SILVEIRA, F. T.; SCOFIELD, A. Diagnóstico molecular e frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em cães do município de Belém, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, p. 255-60, 2014.

SERRANO, A.C.M.; NUNES, C.M.; SAVANI, E.S.M.; D'URIA, S.R.N.; BONELLO, F.L.; VASCONCELOS, R.O.; LIMA, V.M.F.; BRESCIANI, K.D.S. Leishmaniose em felino na zona urbana de Araçatuba, SP – relato de caso. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.76, p.36-40, 2008.

SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JÚNIOR, G. Observações sobre Calazar em Jacobina, Bahia. VI - Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.21, n.1, p.23–27, 1988.

SILVA, D.A. **Avaliação clínica e laboratorial de cães sororretores para *Leishmania* provenientes de inquérito sorológico realizado no município do Rio de Janeiro**. 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; SOUZA, C. M.; FIGUEIREDO, F. B. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. **Veterinary Parasitology**, v.79, p.257- 261, 2011.

SILVA, D. T.; BUZETTI, W. A. S.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M.; TENÓRIO, M. S.; LOPES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 17-25, 2014

SILVA, M. M. M. **Flebotomíneos (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE) de uma zona de proteção ambiental e seu entorno: resposta comportamental a diferentes fontes luminosas.** 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

SILVA, V. G. **Aspectos entomológicos e infecção natural dos flebotomíneos por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em municípios do estado de São Paulo com autoctonia de transmissão de leishmaniose visceral humana e/ou canina.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2016.

SILVEIRA, R. **Frequência e distribuição da Leishmaniose em São Paulo.** 1919. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina e Cirurgia de São Paulo, São Paulo, 2019.

SOARES, I. R. **Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes para *Leishmania* sp. no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.** 2012. 133fls. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 2012.

SOARES, I. R.; SILVA, S. O.; MOREIRA, F. M.; PRADO, L. G.; FANTINI, P.; MARANHÃO, R. P. A.; SILVA-FILHO, J. M.; MELO, M. N.; PALHARES, M. S. 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*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 665-669, 2013.

SOBRINHO, L. S. V.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; BRAGA, E. T.; GOMES, A. M. D.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; GENEROSO, D.; LANGONI, H.; LEUTENEGGER C.; BIONDO, A. W.; LAURENTI, M. D.; MARCONDE, M. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline ImmunodeficiencyVirus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, p. 302-306, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; SERRA, P.; GÁLLEGO, M.; RAMIS, A.; FONDEVILA, D.; FERRER, L. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.3, p.320-323, 2003.

SOUSA, R. L. T. **Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Altos, Piauí: estudo dos vetores e sua fonte alimentar.** 2018. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Teresina, 2018.

SPADA, J. C. P.; SILVA, D. T.; MARTINS, K. R. R.; RODAS, L. A. C.; ALVES, M. L.; FARIA, G. A.; BUZUTTI, M. C.; SILVA, H. R.; STARKE-BUZETTI, W. A. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) and canine visceral leishmaniasis in a rural area of Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2014; v. 23, n. 4, p. 456-462, 2014.

SZARGIKI, R. **Comparação de métodos diagnósticos em leishmaniose tegumentar americana**. 2005. 93f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Geral) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Araçatuba, 2006.

ZORZETTO, R. Uma doença anunciada. Infecção letal causada por parasita de uma só célula, a leishmaniose visceral avança sobre as cidades brasileiras. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, v.151, p.47-51, 2008.

ZOVEIN, A.; EDRISSIAN, G.H.; NADIM, A. Application of the indirect fluorescent antibody test in seodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in experimentally infected mice and naturally infected *Rhombomys opimus*. Transactions of the. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, n.1, p.73-77, 1984.

ZUBEN, A. P. B.; DONALISIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, 2016.

VEDOVELLO-FILHO, D. JORGE, F. A.; LONARDONI, M. V.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T. G. American Cutaneous Leishmaniasis in Horses from Endemic Areas in the North-Central Mesoregion of Paraná State, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 3, p. 149-155, 2008.

VEXENAT, J.A.; BARRETTO, A. C.; ROSA, A. C. O.; SALES, C. C.; MAGALHÃES, A. V. Infecção natural de *Equus asinus* por *Leishmania braziliensis braziliensis*. Bahia, Brasil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.81, p.237–238. 1986.

VILLALOBOS, E.M.C.; CARVALHO, P.R.; LARA, M.C.C.S.H.; MARQUES, E.C.; SOUZA, M. C. A. M.; FELICIO, P. S.; CUNHA, M. S.; CUNHA, E. M. S. Prevalence of immune response of healthy equines with antibodies anti *Leishmania chagasi* in an endemic area of leishmaniasis. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v.5, n.6, p. 520-534, 2010.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme-linked immunoassorbent assay, p.359-371. In: ROSE, N.; FRIEDMAN, H. (Ed.) **Manual of clinical immunology**. 2.ed. Washington: American Society for Microbiology, p.399-371, 1980.

WRIGHT, J. H. Protozoa in a case of tropical ulcer (Delphisore). **Journal of Medical Research**, n.10, p. 472–82, 1903.

WHO - World Health Organization. **Leishmaniasis, Epidemiological Situation**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em 11 mar. 2019.

XIMENES, M. F. F. M.; CASTELLÓN, E. G.; SOUZA, M. D. E. F.; MENEZES, A. A.; QUEIROZ, J. W.; MACEDO, V. P.; JERÔNIMO, S. M. B. Effect of abiotic factors on seasonal population dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Northeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 990-995, 2006.

YARBUH, L.; PREMOLI-DE-PERCOCO, G. Detection and identification of *Leishmania braziliensis* in cutaneous lesions using conventional techniques and PCR amplification probe. **Revista de Ecología Latinoamericana**, v.6, n.2, p.01-07, 1999.

YOSHIDA, E. L. A.; MARQUES, S. A.; STOLF, H. O.; BARSOTTI, L. A.; BUENO, M. M. F.; SOGAYAR, R. Infecção natural de *Equus caballus* por *Leishmania* sp-São Paulo, Brasil (Breve comunicação científica). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 2, p. 79-80, 1988.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Ficha Individual e termo de consentimento livre e esclarecimento

Data:		Número:
Nome:	Sexo: () M () F	Pelagem:
Idade:		
Proprietário:		
Endereço:		
Cidade:		Estado:
Telefone:		

ECORES DE DEPOSIÇÃO DE GORDURA NA CRISTA DO PESCOÇO E RESENHA

OBSERVAÇÕES:

ANAMNESE E AVALIAÇÃO CLÍNICA:**Cidade de procedência:****Contactantes:** () cães () gatos () bovinos () equinos () suínos () aves () caprinos () ovinos () outros:.....**Possui cães com leishmaniose no convívio:** () sim () não**Possui histórico de cães eutanasiados com leishmaniose:** () sim () não**Animal fica:** () zona rural () zona urbana**Realiza algum tratamento no animal:** () sim () não**Qual:**.....**Presença de ectoparasitas:** () sim () não **Qual:**.....**Vermifugação:** () sim () não **Qual/quando:****Vacinas:** () sim () não **Qual/quando:****Temperatura (°C):****FC (bpm):****FR (mpm):****Mucosas oculares:** () hipocorada () normocorada () hiperacorada**Mucosas genitais:** () hipocorada () normocorada () hiperacorada**Mucosas orais:** () hipocorada () normocorada () hiperacorada**Lesões (especialmente de pele):****Outras informações:****Responsável pelo preenchimento:**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo (USP), por meio de seus pesquisadores e alunos de graduação e pós-graduação buscam investigar aspectos relacionados com a ocorrência de Leishmaniose Visceral em equinos na região de Ilha Solteira e Andradina, por meio do projeto intitulado “**Avaliação Clínica, Laboratorial e Xenodiagnóstico de Equinos Naturalmente Infectados por *Leishmania infantum***”. Essa pesquisa visa a realização de um levantamento epidemiológico e de fatores de riscos da leishmaniose à população equina e humana dos municípios de Ilha Solteira e Andradina e apresenta extrema relevância para a adoção de medidas de controle adequadas.

Para participar do estudo, será realizada a coleta de 10 a 20 ml de sangue venoso, suabe conjuntival e aspirado de linfonodo, para realização dos exames laboratoriais. Os materiais utilizados na coleta são estéreis e descartáveis e os riscos são mínimos.

Todos os resultados serão fornecidos ao proprietário do animal. Não serão testados medicamentos ou substâncias de qualquer natureza. A participação no estudo não é obrigatória e caso não deseje que seu animal participe ou se quiser abandonar o estudo, receberá a mesma atenção da equipe de pesquisa.

Eu, _____, RG nº....., declaro que fui informado a respeito dos procedimentos a serem realizados caso meu Animal participe do mencionado projeto de pesquisa e fui orientado em relação aos eventuais riscos. Autorizo a coleta de amostra de sangue venoso e punção de linfonodo e suabe conjuntival do (s) equino (s).....sob minha responsabilidade.

.....Assina
tura do proprietário

.....de.....de 2019

APÊNDICE B – Meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*) - (250 ml)

Elaborado por: Maria Luana Alves

REGRAS

Todos os materiais devem ser deixados de molho em solução de hipoclorito (2 horas), enxaguados, posteriormente, lavados com detergente neutro e deixados em solução de sabão de vidraria (1 hora). Finalmente, devem ser lavados em água corrente e repousados em H₂O destilada (15 minutos). A secagem deve ser realizada em estufa (60°C).

- 1) Dissolver em 100 mL de H₂O destilada em Kitassato (de 500 mL):

Na ₂ HPO ₄	2 g
NaCl.....	1 g
KCl.....	0,1g

- 2) Adicionar mais 44,5 mL de H₂O destilada ao Kitassato e fazer a montagem do filtro, conforme a figura abaixo:

Observações:

- Autoclavar o filtro montado com os sais
- Enrolar a parte de cima com papel alumínio e papel
- Vedar com fita para autoclavagem

Materiais para autoclavagem

- 1 kitassato de 500 mL com o filtro montado
- 1 Erlenmeyer com 500 mL de H₂O destilada
 - Erlenmeyer de 250 mL
 - Proveta de 100 mL
 - Proveta de 50 mL
- 4 Beckers pequenos (~50mL)
 - 2 Beckers de 250 mL
 - 2 Bastões
 - 5 colheres
 - Algodão
 - 3 pares de luvas
 - Ponteiras de 1000 µL
- 60 tubinhos de vidro + 2 tubinhos BHI

Levar no dia:

- 2 suportes de tubos, parafilm, Pisseta com H₂O destilada, pHmetro, balança, copo de vidro, Becker de 100 mL, dextrose, triptose, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ e infusão de fígado.

3) Após autoclavar todos os materiais necessários, secá-los em estufa (60°C) overnight.

4) Na manhã seguinte, descongelar o soro fetal bovino e pentabiótico em banho maria (água em 30 segundos no micro-ondas)

5) Colocar todos os materiais em luz UV (15 minutos) e iniciar os procedimentos abaixo:

6) Em um Erlenmeyer, dissolver 0,75 g de infusão de fígado em 100 mL de H₂O destilada aquecida.

* A água aquecida deve estar na temperatura que o dorso da mão suporte

7) Adicionar a esta solução (suspensão):

Dextrose.....0,5 g
Triptose.....1,25 g

8) Ajustar o pH para 7,4

* Geralmente o pH fica abaixo, então corrigir com a base

Base: 50mL de H ₂ O + 2,83g de Na ₂ HPO ₄
Ácido: 50mL de H ₂ O + 2,39g de NaH ₂ PO ₄

9) Adicionar 2,5 mL do pentabiótico

10) Quando a temperatura do kitassato diminuir de modo que o dorso da mão suporte, acoplar a bomba de vácuo e iniciar a filtração. Além disso, deve-se envolver o local onde a mangueira e a extremidade lateral do kitassato se une com um algodão embebido de álcool.

11) Ligar a bomba de vácuo a uma pressão de 300-400 mmHg e colocar a suspensão na parte superior do filtro para ser filtrada

12) Após a filtração, adicionar 5,5 mL de hemoglobina 2,2%

13) Homogeneizar o meio e deixar os materiais na luz UV (15 minutos)

14) Adicionar 30 mL de soro fetal bovino

15) Com a proveta, distribuir 5 mL de meio LIT em cada tubinho. Lembrando de fazer os tubinhos BHI inicial e final.

16) Manter todos os tubinhos com LIT sob controle de esterilidade (48 horas- 37°C)

* Meio claro com precipitado= ótimo/ Meio turvo e com pontos brancos= contaminado

17) Manter o meio LIT em geladeira (4°C) e a validade é de aproximadamente 1 mês.

OBSERVAÇÕES

Se tiver que fazer pentabiótico:

- 1 becker de 50 mL
- 1 proveta de 25 mL
- 1 Erlenmeyer com 20 mL de água destilada
- 10 Falcons

Levar no dia: Suporte de falcons, 1 seringa de 5 mL

RECEITA PENTABIÓTICO (Zoetis 6.000.000 UI- 8,5g):

Misturar 15 mL de água destilada no pentabiótico em pó, agitar bem e separar em alíquotas de 2,5 mL. Colocar cada alíquota em um falcon e congelar.

Se tiver que fazer alíquotas de soro fetal bovino:

- 1 Proveta de 50 mL
- 10 tubos falcons grandes

Levar no dia: Suporte de falcons

Colocar 30 mL em cada falcon e congelar.