

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**PRESENÇA DE *LEISHMANIA* SP EM EQUINOS DE ZONA URBANA  
DE URUGUAIANA, RIO GRANDE DO SUL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**TAIANE ACUNHA ESCOBAR**

**Uruguiana, RS, Brasil**

**2015**

**TAIANE ACUNHA ESCOBAR**

**PRESENÇA DE *LEISHMANIA* SP EM EQUINOS DE ZONA URBANA  
DE URUGUAIANA, RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Claudia Acosta Duarte

Co-orientadora: Irina Lübeck

**Uruguaiana**

**2015**

**TAIANE ACUNHA ESCOBAR**

**PRESENÇA DE *LEISHMANIA* SP EM EQUINOS DE ZONA URBANA  
DE URUGUAIANA, RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade Animal

Dissertação defendida e aprovada em: 16 de abril de 2015.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Acosta Duarte  
Orientadora  
Curso de Medicina Veterinária – UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Luis Flávio Souza de Oliveira  
Curso de Farmácia – UNIPAMPA

---

Prof Dr.Diego Moscarelli Pinto  
Curso de Medicina Veterinária – UFPEL

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente à Deus pela vida e por me manter em pé, através da minha fé, consegui me manter tranquila, forte e esperançosa nos momentos mais difíceis ao longo da caminhada.

Agradeço infinitamente aos meus pais por todas as oportunidades de formação pessoal e acadêmica que me proporcionaram, e por todos os momentos em que me apoiaram, e me conduziram na construção do caráter e educação, sem os quais jamais alcançaria este título, assim como meus irmãos que muitas vezes compartilharam as minhas angústias e os momentos difíceis.

As minhas duas orientadoras Prof. Dr<sup>a</sup> Claudia Acosta Duarte e Prof. Dr<sup>a</sup> Irina Lübeck pelo apoio incondicional, e principalmente por confiarem e acreditarem em mim, oportunizando a realização de um sonho, tão importante na minha trajetória profissional e pessoal. Agradeço também pelo profissionalismo, dedicação, paciência e perseverança em me orientar, e especialmente pelo aprendizado durante esses dois anos de caminhada.

À toda Equipe do “Projeto Carroceiro”, por todo apoio e suporte durante a realização das coletas, sem os quais seria impossível desenvolver o experimento.

Agradeço aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal que auxiliaram em meu crescimento técnico e intelectual ao longo desses 24 meses.

À toda a equipe do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal do Pampa, onde o experimento foi desenvolvido em grande parte, que de uma forma ou de outra me auxiliaram durante os dias em que passamos juntos. Aos estagiários que passaram ao longo do experimento, Luana Polo, Waylton Franco Jr., Bibiana Welter, Giovana Jung, Rafaela Machado, Isis Jankus, Lilian Camargo, Bárbara Alvim, e as técnicas Tatiane Lima e Claudia Pessano.

Em especial, agradeço imensamente às estagiárias Gabriela Dowich e Leticia Cantele, por toda a dedicação, eficiência, companheirismo, auxílio incansável mesmo nos finais de semana, nas férias, estavam sempre dispostas a me ajudar, e sem as quais não teria finalizado o experimento com agilidade e eficiência.

Agradeço imensamente à amiga Luiza Zuravski, que por todo tempo de mestrado me apoiou incondicionalmente oferecendo palavras de conforto nas horas mais difíceis, e sem contar o conhecimento técnico que me transmitiu durante os experimentos, assim como os conselhos, paciência e principalmente a amizade sincera.

Também não poderia deixar de agradecer ao Professor Michel Mansur Machado, que juntamente com a amiga Luiza, foi responsável por valiosas trocas de informações técnicas, pela disponibilizando as dependências do Laboratório de Imunologia e Toxicologia Clínica para a condução de alguns experimentos.

À Prof, Dr<sup>a</sup> Cheila Spotiglia, que disponibilizou o Laboratório de Microbiologia do Curso da Farmácia, permitindo a utilização dos equipamentos e por algumas vezes também auxiliar no experimento.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Priscila Trindade, que durante o tempo em que estive na Universidade Federal do Pampa, participou da padronização das técnicas, auxiliando na minha busca por conhecimentos na área da biologia molecular.

Aos colegas do mestrado pela convivência, companheirismo, auxílio, e em especial à colega Luana Marchi Quadros que se tornou amiga, por todas as caronas, por todos os dias em que fizemos companhia uma a outra, nos almoços, lanches deliciosos que trouxe para alegrar nossos dias de trabalho e principalmente por escutar, aconselhar, apoiar em todos os momentos.

À equipe do Laboratório de Virologia da UNIPAMPA, pelo apoio, empréstimos de materiais, colaboração nas coletas, e pela amizade.

À equipe do Laboratório Central do Estado (LACEN), e especialmente à Raquel Ramos, que me recebeu carinhosamente, durante alguns dias para realizar os experimentos, sua paciência, atenção e disponibilidade foram imprescindíveis na condução dos testes.

À todos os proprietários dos animais estudados, por disponibilizarem seu tempo e atenção e aceitarem nossa intervenção proporcionando a realização do estudo.

À equipe da Polícia Rodoviária Federal e aos funcionários da Secretaria de Trânsito do município por disponibilizarem o transporte dos animais até o Hospital Universitário Veterinário da Universidade, para a realização das coletas.

À amiga Maria Del Carmen Braccini, ex professora, que foi responsável por me guiar em muitos momentos da vida acadêmica, servindo de exemplo de profissionalismo e que me mostrou a beleza de fazer ciência.

A amiga Karina Braccini Pereira, que me apresentou à minha orientadora Prof. Irina, quando tudo começou, obrigada também por acreditar e confiar em mim.

À equipe da Coordenação Acadêmica, Ingrid Tasca, Eloisa Fortes, Luciane Pahin e Patricia Altermann por sempre me receberem de braços abertos, as inúmeras vezes me auxiliarem nos momentos de urgência e necessidade.

Ao meu amado noivo Mario Finardi, por ser um dos maiores apoiadores desta caminhada junto com minha família, por me incentivar, acreditar e entender quando por diversas vezes estive ausente.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão da bolsa.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

**Charles Chaplin**

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença parasitária infecciosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida pelo vetor flebótomo. Caracterizada como Doença Tropical Negligenciada, acomete diversas espécies de mamíferos, sendo o cão, atualmente, o principal reservatório em áreas urbanas. Os equinos também podem ser infectados, especialmente quando estão em contato com reservatórios ou vetores. No município de Uruguaiana – RS há um expressivo número de equinos utilizados na tração de cargas e como meio de transporte, com constante movimentação dentro do perímetro urbano. Esses animais vivem em condições precárias, submetidos a trabalhos excessivos e má nutrição. Frente a estes fatores somados à atual situação epidemiológica da leishmaniose visceral canina no município, o presente estudo foi realizado com o objetivo de identificar a presença de *Leishmania* sp em equinos urbanos do município de Uruguaiana-RS. Para a condução do experimento foram utilizadas amostras sanguíneas de 192 equinos testadas em três técnicas: sorológica (ELISA), imunocromatográfica (TR-DPP) e molecular (PCR). Na técnica de ELISA foi utilizado soro, testado com o Kit Ensaio Imunoenzimático para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos e para o teste imunocromatográfico Teste Rápido *Dual Path Platform* utilizaram-se amostras de sangue total. As reações de PCR, após extração de DNA de sangue periférico dos animais, foram realizadas com quatro pares de iniciadores distintos. Todas as amostras testadas apresentaram-se não reagentes nos ensaios imunológicos. Entretanto, com o emprego da técnica PCR, mais sensível, houveram amostras positivas. Dos quatro pares de iniciadores testados, 75 amostras foram positivas, 52 com pelo menos um dos pares. Contudo, ao analisarmos individualmente os iniciadores, 58,6% foram positivos para LITSV/L5.8SR, 44% para LITSV/LISTSR, 28% para RV1/RV2, e 4% LITSR/L5.8S. Os resultados apresentados no experimento indicam a possibilidade de existência de *Leishmania* em equinos na região de Uruguaiana, embora os testes sorológicos não tenham apresentado reatividade para *Leishmania*. A técnica molecular possibilitou a detecção do gênero *Leishmania* nas amostras de sangue periférico dos equinos. Este foi o primeiro relato da infecção na espécie equina na região do extremo oeste do estado do Rio Grande do Sul. Contudo, se faz importante a realização de sequenciamento do fragmento para que se possa confirmar a identidade genética de *Leishmania* sp.

Palavras-chave: Cavalos. Doenças Parasitárias. Métodos de Diagnóstico. Infecção.



## ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic infectious disease caused by protozoa genus *Leishmania* and transmitted by the sandfly vector. Characterized as Neglected Tropical Disease, affects several species of mammals, and the dog are main reservoir in urban areas. The horses can also be infected especially when they are in contact with reservoirs or vectors. In Uruguaiana's city, there is a significant number of horses used in the tensile loads and means of transport, with constant movement within the city, living in precarious work's conditions, subjected to excessive and poor nutrition. In view of these factors added to the current epidemiological situation of LVC in the city, the present study aim to identify the presence of *Leishmania* in urban horses the municipality of Uruguaiana-RS. For the experiment, blood samples from 192 horses were used for holding three techniques: serological (ELISA), immunochromatographic (TR-DPP) and molecular (PCR). For conducting ELISA's Test serum was used and tested with Bio-Manguinhos kit and for TR-Dual Path Platform Rapid Test whole blood samples were employed. In the PCR technique, DNA was extracted from peripheral blood of animals and amplifications were performed with primers RV1 / RV2, LITSR / LITSV, LITSR / L5.8S / LITSV / L5.8SR.. All tested samples showed negative results in immunoassays. However, employing sensitive techniques such as PCR, positive samples were detected. Considering the four primer pairs tested, 75 animals were positive, 52 with at least one of the pairs. However, when analyzing the individual primers, 58.6% were positive for LITSV/L5.8SR, 44% to LITSV/LITSR, 28% for RV1/RV2, and 4% LITSR/L5.8S. In The results presented in the experiment indicate the possibility of *Leishmania* in horses in the region of Uruguaiana city, although serological tests have not submitted reactivity to *Leishmania*. Molecular technich shows results to consider the *Leishmania*'s presence in horse's peripheral blood samples. This was the first report of infection in equine species in westernmost region of the Rio Grande do Sul state. However, it is important to conduct sequencing of the fragment so that we can confirm the genetic identity of *Leishmania* sp.

Keywords: Horses. Parasitic Disease. Diagnostic Methods. Infection.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Organização celular dos protozoários trypanosomatídeos representação do núcleo e cinetoplasto, organelas que contém DNA nuclear e kDNA .....	18
Figura 2 - Organização do minicírculo de <i>Leishmania</i> .....	18
Figura 3 - Organização do locus do DNA ribossomal de <i>Leishmania sp.</i> .....	19
Figura 4 - Representação esquemática da forma promastigota (3A) e amastigota (3B) de <i>Leishmania sp.</i> .....	21
Figura 5 - Ciclo de vida do protozoário <i>Leishmania sp.</i> .....	22
Figura 6 - Fêmea flebotomínea adulta .....	23

### CAPÍTULO II - ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1 – Amplificação de DNA por PCR, eletroforese em gel de agarose (1,8%). Iniciadores LITSV/L5.8SR (700pb). Linha 1: Marcador molecular 100pb. Linha 2: Controle Positivo <i>L infantum</i> (MOHM/BR/1974/PP7). Linha 3: Controle negativo (sem DNA). Linha 4-5: Controles negativos equinos região não endêmica. Linhas 6-12: amostras de sangue periférico de equinos de zona urbana de Uruguaiana – RS. ....	53
--	----

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA**

Tabela 1 – Características de iniciadores utilizados na detecção de DNA das espécies do Complexo <i>Leishmania donovani</i> .....	19
Tabela 2 - Técnicas de diagnóstico utilizadas para a detecção de leishmaniose em equinos, com diferentes materiais biológicos. ....	34

### **CAPÍTULO II - ARTIGO CIENTÍFICO**

Tabela 1 - Características dos quatro métodos de PCR utilizados para a detecção de leishmaniose em equinos de zona urbano no município de Uruguaiana – RS. ....	50
Tabela 2 - Análise global do número de amplificações de DNA de <i>Leishmania</i> em amostras de sangue equino. ....	51
Tabela 3 - Resultados da amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> utilizando quatro métodos de PCR em amostras de sangue de equinos provenientes de diferentes regiões do município de Uruguaiana - RS. ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

DTN – Doença Tropical Negligenciada  
WHO – World Health Organization  
PKDL – Post- Kala-azar  
LVC – Leishmaniose visceral canina  
LVH – Leishmaniose visceral humana  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
kDNA – ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto  
pb – pares de bases  
SSU – subunidade menor do DNA ribossomal  
LSU – subunidade maior do DNA ribossomal  
ITS – *Internal transcribed spacers*  
µm – micrômetros  
LPG – lipofosfoglicanos  
CEVS – Centro Estadual de Vigilância em Saúde  
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
RIFI – Imunofluorescência Indireta  
TR-DPP – Teste Rápido *Dual Path Platform*  
SES – Secretaria Estadual de Saúde  
LACEN – Laboratório Central do Estado  
PVCLV – Plano de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
RFLP – Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
M – molar  
nm – nanômetros  
DO – densidade óptica  
µL – microlitros  
rpm – Rotações por minuto

min – minutos

TEM – Tampão Tris- HCL- EDTA – NaCl

HCL – ácido clorídrico

NaCl – Cloreto de Sódio

SDS – Duodecil Sulfato de Sódio

TE – Tampão Tris HCL EDTA

pmol – picomol

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

U – unidade

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1</b> Protozoário <i>Leishmania</i> .....	17
<b>2.2</b> Genoma .....	17
<b>2.3</b> Ciclo Biológico .....	20
<b>2.4</b> Transmissão .....	21
<b>2.5</b> Vetor .....	23
<b>2.6</b> Hospedeiros Mamíferos .....	24
<b>2.7</b> Epidemiologia .....	26
<b>2.8</b> Formas Clínicas da Leishmaniose em diferentes hospedeiros .....	29
<b>2.9</b> Diagnóstico .....	31
<b>2.9.1</b> Diagnóstico da Leishmaniose equina .....	33
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3.1</b> Objetivo geral .....	35
<b>3.2</b> Objetivos Específicos .....	35
<b>4 CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	36
<b>RESUMO</b> .....	37
<b>ABSTRACT</b> .....	38
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	38
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	46
<b>COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

<b>ANEXO</b> .....	50
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose representa um grave problema de saúde pública, presente em 98 países, com 14 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões expostas ao risco de infecção e doença (ALVAR et al., 2012). A enfermidade acomete principalmente populações de países em desenvolvimento, sendo 90% dos casos diagnosticados provenientes da Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (ALVAR et al., 2012). É classificada como uma Doença Tropical Negligenciada - DTN (WHO, 2010).

No Brasil, até o fim da década de 80, a leishmaniose estava restrita às zonas rurais, e a transmissão ocorria entre vetores e animais silvestres (BRASIL, 2014). Entretanto, na década de 90 iniciou um nítido processo de urbanização da enfermidade, além da sua expansão geográfica para os estados mais ao sul do país (ALVES e BEVILACQUA, 2004).

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* Roos, 1903, família Trypanosomatidae (SOARES, 2012). O ciclo do parasito é digenético com duas formas principais: sendo a forma promastigota, flagelada e localizada no tubo digestório do inseto vetor; e a forma amastigota, sem flagelo livre e intracelular obrigatória das células fagocitárias do hospedeiro mamífero (GONTIJO e CARVALHO, 2003; LYNN e MC MASTER, 2008). A enfermidade tem sintomatologia variada, e as manifestações clínicas em humanos são subdivididas em leishmaniose cutânea, mucocutânea, visceral e tegumentar *Post-kala-azar - PKDL* (CHAPPUIS, 2007). A leishmaniose visceral é decorrente da infecção pela espécie *Leishmania infantum*, proveniente de países europeus. Entretanto, nas Américas foi classificada como *Leishmania chagasi*, Cunha & Chagas, 1937.

O vetor flebótomo nas Américas do Sul e Central é o *Lutzomyia longipalpis* e, mais recentemente, também o *Lutzomyia cruzi*. Apesar das evidências de que pulgas e carrapatos sejam infectados por *Leishmania*, a atuação como vetores no ciclo de transmissão não está clara (COUTINHO e LINARDI 2007; PAZ et al., 2010).

Os reservatórios habituais são os canídeos, a espécie *Canis familiaris* é considerada o mais importante hospedeiro vertebrado e o principal reservatório para a leishmaniose visceral humana (SOARES et al., 2012). Sabe-se que, além dos seres humanos e cães, diversos mamíferos também podem ser acometidos por leishmaniose (SOARES et al., 2013), incluindo primatas (MALTA et al., 2010), marsupiais (SANTIAGO et al., 2007), edentados (ARAÚJO et al., 2013), roedores (PAPADOGIANNAKIS et al., 2010) e equinos (ROLÃO et al., 2005).



As evidências de que equinos, incluindo os que residem em áreas endêmicas para leishmaniose visceral canina (LVC) e leishmaniose visceral humana (LVH), são capazes de se infectar com *Leishmania* sp (MUKHTAR et al., 2000), reforçam a importância da investigação da espécie, que atua como fonte de alimentação para os vetores ou participante do ciclo epidemiológico (ROLÃO et al., 2005; KOUAM et al., 2010). No continente europeu existem descrições de equinos infectados por *L. infantum* (SOLANO-GALLEGO et al. 2003; ROLÃO et al., 2005). No Brasil, foram detectados anticorpos anti-*Leishmania* sp (FEITOSA et al., 2012), e presença de parasitos através de técnicas sorológicas e moleculares, com possível infecção mista causada por *L. infantum* e *L. braziliensis* em equinos provenientes de regiões endêmicas (SOARES et al., 2013).

O diagnóstico definitivo das leishmanioses é realizado através da detecção do agente causal, preferencialmente nos órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário ou em lesões de pele no caso de se tratar de LVH e LVC, respectivamente (CORTES, 2008).

Diferentemente da infecção em humanos e caninos que já possuem padronização nas técnicas de diagnóstico, para a detecção do parasito em outras espécies, como a equina, utilizam-se os mais variados testes (sorológicos, moleculares, culturas, biópsias). Os testes sorológicos e parasitológicos têm sido amplamente utilizados nos equinos (KOUAM et al., 2010; FEITOSA et al., 2012; BIGELI et al., 2012; SOARES et al., 2013). Deste modo, considerando a predisposição de infecção da espécie equina por protozoários do gênero *Leishmania* sp em regiões endêmicas, houve a necessidade de verificar a possível infecção em equinos de zona urbana do município de Uruguaiana, RS, através das técnicas de diagnóstico descritas para LVC e LVH.

## 2 CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Protozoário *Leishmania*

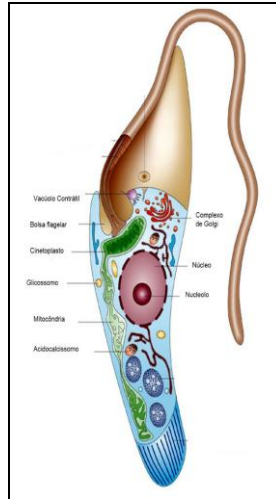
Os primeiros estudos para a identificação do protozoário *Leishmania* datam do século XIX e foram realizados pelos pesquisadores Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, que trabalharam de forma independente na identificação do parasito. A primeira espécie descrita foi *Leishmania infantum*, sendo relatada por Cathoire e Laveran, em 1904, após o diagnóstico da enfermidade em uma criança (WHO, 2010).

As leishmanioses são um complexo de doenças decorrentes da infecção por protozoários do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae). O gênero engloba mais de 30 grupos taxonômicos e aproximadamente 20 espécies infectantes para humanos. Classificam-se em dois subgêneros, *Viannia* Lainson & Shaw, 1987 e *Leishmania* Ross, 1903. O subgênero *Leishmania* subdivide-se ainda em complexos, estando as espécies *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. infantum* e *L. archibaldi* reunidas no Complexo *L. donovani* (LUKES et al., 2007). Existe uma grande similaridade genética entre as espécies *L. chagasi* e *L. infantum*. O status da espécie *L. chagasi* está sob discussão, pois se concluiu que no Novo Mundo, essa espécie é a mesma que *L. infantum*, sendo identificada por *L. infantum* (*L. chagasi*) indicando a possível migração da enfermidade de países europeus, onde o protozoário é *L. infantum*, para as Américas, que é usualmente referida como *L. chagasi* (KUHLS et al., 2007; KUHLS et al., 2011).

### 2.2 Genoma

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem um genoma composto por dois DNAs distintos (Figura 1), o DNA ribossomal ou nuclear, localizado no núcleo celular e o kDNA (DNA mitocondrial do cinetoplasto), localizado no cinetoplasto. O cinetoplasto é uma estrutura característica dos protozoários tripanossomatídeos, localizada na base do flagelo no interior da mitocôndria (SHAPIRO e ENGLUND, 1995). Esta organela em forma de bastão é composta por uma rede compacta de kDNA (corresponde entre 15% e 35% do DNA total)

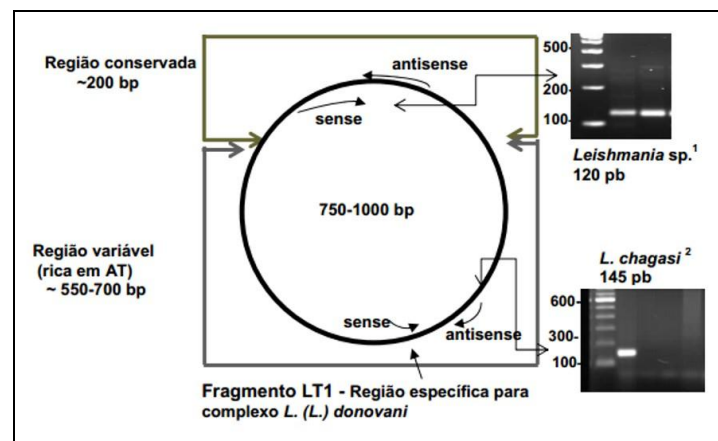
Figura 1 - Organização celular dos protozoários tripanossomatídeos representação do núcleo e cinetoplasto, organelas que contém DNA ribossomal e kDNA



Fonte: VARGAS-PARADA (2010)

O kDNA é subdividido em maxicírculos (20 a 50 cópias por células) e minicírculos (aproximadamente 10.000 cópias por células). Em todos os tripanossomatídeos, aproximadamente 800 pb constituem o minicírculo (Figura 2), sendo possível identificar a presença de uma região conservada de 120 a 200 pb e uma região variável de 600 a 680 pb (CORTES, 2008). A região conservada do minicírculo do kDNA permite a identificação molecular a nível de gênero, ao passo que a utilização de marcadores específicos para a amplificação de fragmentos presentes na região variável possibilita a identificação das espécies (Tabela 1). A região LT1 (fragmento com 145 pb) é específica para o complexo *L. donovani* (BIGELI et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013) (Figura 2), permitindo a detecção das espécies *donovani*, *chagasi* e *infantum*.

Figura 2 - Organização do minicírculo de *Leishmania*

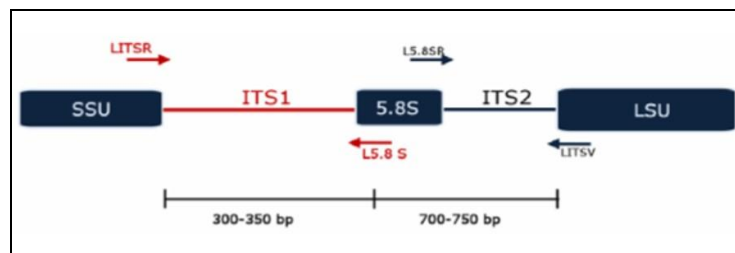


Fonte: GOMES (2008)

Diagrama esquemático da organização do minicírculo de *Leishmania* e localização dos marcadores para *Leishmania sp.*<sup>1</sup>(Passos et al., 1999) e *L. (L.) donovani*<sup>2</sup> (Ravel et al., 1995).

O DNA ribossomal das espécies de *Leishmania* também apresentam regiões conservadas: SSU (Subunidade menor) e LSU (Subunidade maior) ambas do rDNA e regiões variáveis: ITS (*Internal Transcribed Spacers*) ou espaçadores transcritos internos, com alto nível de variação intra e interespecífica, sendo muito utilizadas como marcadores moleculares (Figura 3). Na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a detecção das regiões ITS específicas em fragmentos de DNA de *Leishmania* é realizada com diferentes pares de iniciadores (Tabela 1)

Figura 3 - Organização do locus do DNA ribossomal de *Leishmania sp.*



Fonte: LIMA (2010)

Subunidades conservadas: SSU (subunidade menor) e LSU (subunidade maior) / Subunidades variáveis: ITS1 e ITS2.

Tabela 1 – Características de iniciadores utilizados na detecção de DNA das espécies do Complexo *Leishmania donovani*

Fonte: arquivo pessoal

Iniciadores	LITSR/LITSV	LITSR/L5.8S	LITSV/L5.8SR	RV1/RV2
Espécies	<i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i>	Complexo <i>L. donovani</i>
Região amplificada	ITS rDNA	ITS1 Rdna	ITS2 rDNA	LT1 kDNA
Tamanho das bandas	1020 pb	320 pb	700 pb	145 pb
Condições do PCR	(El Tai et al., 2001) (Kuhls et al., 2005)	(El Tai et al., 2001) (Kuhls et al., 2005)	(El Tai et al., 2001) (Kuhls et al., 2005)	(Bigeli et al., 2012) (Almeida et al., 2013)
Sequência Iniciadores	5' - CTGGATCATT-TCCGATG-3' 5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3'	5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3' 5'-CTGGATCATT-TCCGATG-3'	5'-AAGTGCG-ATAAGTGGTA-3' 5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3'	5'-CTTTCTGGTCCCGGGTAGG-3' 5'-CCACCTGGCTATTTACACCA-3'

### 2.3 Ciclo Biológico

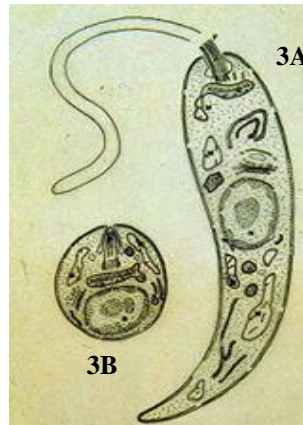
O protozoário *Leishmania* é hemoflagelado intracelular, apresenta reprodução por divisão binária, e ciclo digenético com duas formas distintas (Figura 3). A forma promastigota ocorre no tubo digestório do inseto vetor, e a forma amastigota encontra-se no hospedeiro mamífero, sendo intracelular obrigatória das células do sistema mononuclear fagocitário (GONTIJO e CARVALHO, 2003; LYNN e MC MASTER, 2008).

Durante o ciclo biológico do parasito no intestino dos vetores ocorre um processo complexo envolvendo alterações comportamentais, morfológicas e bioquímicas, diferindo entre as espécies de *Leishmania* (CORTES, 2008). A forma promastigota (Figura 3A) mede cerca de 10-20  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5-3,0  $\mu\text{m}$  de largura, possui flagelo que se origina no corpo basal do cinetoplasto e emerge na extremidade anterior celular, permitindo sua mobilidade no intestino do inseto. Nesta etapa do ciclo biológico, o parasito apresenta duas fases de desenvolvimento. A fase promastigota procíclica tem a morfologia celular alongada com flagelo habitualmente mais curto que o corpo celular, e a fase promastigota metacíclica, possui estrutura celular relativamente curta e arredondada e flagelo longo (duas a três vezes maior que o corpo celular) e com grande mobilidade, esta é a fase final do desenvolvimento do protozoário que ocorre no inseto vetor e é a forma infectante que será inoculada no hospedeiro vertebrado.

A fase amastigota (Figura 3B) apresenta células ovoides ou arredondadas, sem flagelo aparente. Estas formas estão localizadas no interior das células dos hospedeiros, no sistema mononuclear fagocitário. As amastigotas possuem o núcleo arredondado, uma única mitocôndria distribuída pelo corpo celular que abriga o cinetoplasto, em forma de bastonete, com grande quantidade de kDNA.

Figura 4 - Representação esquemática da forma promastigota (3A) e amastigota (3B) de

*Leishmania sp*



Fonte: FIOCRUZ ©1997 (WebSight Solution Group)

## 2.4 Transmissão

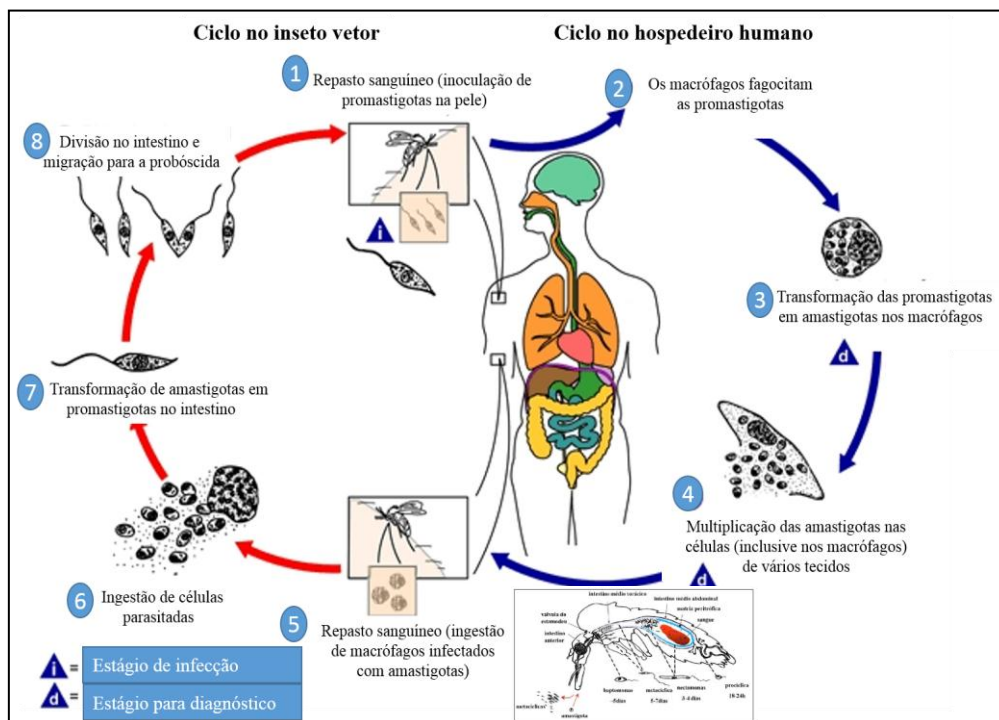
A perpetuação do ciclo biológico e processo de transmissão do protozoário ocorrem por meio do repasto sanguíneo, onde o vetor infectado com as formas promastigotas transmite o protozoário aos mamíferos susceptíveis. Os insetos vetores são infectados pela mesma via de transmissão, ao ingerir formas amastigotas presentes nas células mononucleadas fagocitárias parasitadas dos mamíferos (Figura 5).

Após a ingestão das formas amastigotas de *Leishmania*, ocorre a diferenciação em formas promastigotas procíclicas no tubo digestório do inseto. Estas possuem moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície, que permitem a interação com lectinas intestinais e, conseqüente, adesão ao epitélio digestório. Esta adesão é importante, pois garante o desenvolvimento completo do protozoário, impedindo que seja eliminado junto com o alimento. Após a fixação das formas promastigotas procíclicas no intestino do inseto vetor, o parasito sofre metaciclogênese diferenciando-se nas formas promastigotas metacíclicas. Este processo perdura de 8 a 20 dias e é responsável pela geração das formas infectantes (OLIVER et al., 2005). Nesta fase não há reprodução, os parasitos perdem a capacidade de adesão ao epitélio digestório, e migram para o esôfago, faringe e probóscida, onde serão eliminadas durante o repasto sanguíneo, atingindo as células do hospedeiro.

No momento em que a fêmea flebotomínea realiza o repasto sanguíneo, necessário para a maturação dos ovos, ocorre a inoculação simultânea das formas promastigotas

metacíclicas na derme do hospedeiro mamífero. As formas promastigotas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos, perdendo o flagelo livre e transformando-se em amastigotas. Estas formas se multiplicam por divisão binária, provocando o rompimento das células e infectando novos macrófagos (CORTES, 2008). As formas amastigotas se disseminam pelos sistemas linfático e vascular dos hospedeiros, além de eventualmente atingirem também a medula óssea, fígado e baço (CHAPPUIS et al., 2007).

Figura 5 - Ciclo de vida do protozoário *Leishmania* sp.



Fonte: CDC - Centers for Disease Control and Prevention (Adaptada)

A infecção do inseto vetor ocorre através da ingestão de formas amastigotas presentes nos macrófagos do hospedeiro mamífero, que ao serem ingeridas adquirem a forma promastigota, com flagelo livre, passando pelas fases procíclicas e metacíclicas no interior do tubo digestório do inseto. Após o completo desenvolvimento serão transmitidas aos hospedeiros através do repasto sanguíneo, adquirindo novamente a forma amastigota, com a perda do flagelo e infecção dos macrófagos.

## 2.5 Vetor

Os vetores responsáveis pela transmissão dos protozoários do gênero *Leishmania* são as flebotomíneos (fêmeas) infectados, pertencentes a família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, que são distribuídos em dois gêneros: *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Estudos indicam que 30 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados ou suspeitos, apesar de existirem aproximadamente 1.000 espécies já descritas (DESJEUX, 2004). Nas Américas, as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são descritas como vetores causadores da LV (SANTOS et al., 2003).

Os flebotomíneos são insetos pequenos (raramente excedem três milímetros), frágeis, com o corpo densamente coberto por finas cerdas e coloração clara (castanho claro ou cor de palha) e atividade crepuscular ou noturna (Figura 6). Os flebotomíneos são holometábolos, desenvolvendo-se a partir do ovo para estádios larvais, pupa e adultos. Após a cópula, as fêmeas colocam seus ovos sobre um substrato úmido no solo, com alto teor de matéria orgânica e de baixa incidência luminosa, para garantir a alimentação das larvas. Ao se desenvolverem, as larvas aumentam o metabolismo e o tamanho. Quando atingem o estágio de pupa, fixam-se no substrato e não se alimentam, iniciando a metamorfose até o inseto adulto. O período de desenvolvimento do ovo até o estágio de inseto adulto varia de 30 a 40 dias, de acordo com a temperatura do ambiente.

Figura 6 - Fêmea flebotomínea adulta



Fonte: BRASIL (2014)

As fêmeas são hematófagas obrigatórias, apresentam hábitos ecléticos podendo realizar o repasto sanguíneo em várias espécies de animais vertebrados, inclusive em humanos, entretanto, em áreas urbanas, o cão parece ser a principal fonte de alimentação no



ambiente doméstico. A longevidade das fêmeas é estimada em média de 20 dias. Na fase adulta, as espécies têm se mostrado, ao longo dos últimos 30 anos, altamente adaptadas às condições urbanas e peri-urbanas (HARHAY et al., 2011; BRASIL, 2014).

Apesar das evidências de que espécies de pulgas e carrapatos sejam infectados por *Leishmania* (COUTINHO e LINARDI 2007; PAZ et al., 2010), ainda não está clara a atuação destas espécies como vetores. Segundo Coutinho et al. (2005), carrapatos de cães infectados apresentaram 15,4% de taxa de infecção, sendo a infecção decorrente do repasto sanguíneo das fêmeas infectadas. Entretanto, Paz et al. (2010), constataram, em uma infecção experimental de carrapatos a partir de cães infectados, a presença de DNA do parasito em diversas culturas de *Rhipicephalus sanguineus* e apenas uma forma flagelada em esfregaço, indicando um baixo número de formas infectantes nesse artrópode. Para os autores, a manutenção e multiplicação de *Leishmania* nos carrapatos parece pouco provável de acontecer, havendo a necessidade de desenvolvimento de outros experimentos para elucidação da interação entre as espécies.

Na tentativa de verificar a possível transmissão de leishmaniose através de pulgas de cães infectados a outros animais, foi realizada uma infecção experimental em 36 hamsters (via oral e peritoneal). Os testes moleculares apresentaram resultados positivos em 16 amostras. Entretanto, quando realizada a investigação do parasito em esfregaços, estes resultados foram negativos. Os autores relataram a possibilidade de reações cruzadas com leptomonas, na técnica molecular (COUTINHO e LINARDI, 2007).

## **2.6 Hospedeiros Mamíferos**

A cadeia epidemiológica da leishmaniose é tema de diversos estudos em diferentes regiões do mundo. A alta capacidade de adaptação aos mais variados ambientes, aliada à grande diversidade de espécies de vetores e de protozoários que podem causar a enfermidade, bem como diversidade de espécies de mamíferos que podem ser acometidos, torna essa afecção um problema de saúde pública.

Os hospedeiros participam ativamente da cadeia epidemiológica e garantem a manutenção do agente etiológico (SOARES et al., 2013). No Novo Mundo, mais de 40 espécies de mamíferos (de várias ordens) são conhecidas como hospedeiros de *Leishmania* sp. em diferentes ciclos de transmissão (SOARES, 2012). Recentemente, compilou-se sete ordens

de mamíferos, Didelphimorphia, Pilosa, Cingulata, Rodentia, Carnivora, Primata, Chiroptera, que sabidamente foram infectadas por diferentes espécies de *Leishmania sp* nas Américas (ROQUE e JANSEN, 2014).

Várias espécies de primatas, incluindo *Callicebus nigrifrons*, *Cebus xanthosternos*, *Leontopithecus crysomelas*, *Aotus nigriceps*, *Pithecia irrorata* e *Saguinus imperator*, já foram diagnosticados positivos para o protozoário. Três Primatas (*Alouatta guariba*) conhecidos como bugio marrom, mantidos em cativeiro de vida livre procedentes de região endêmica, apresentaram infecção por *L. infantum*, (MALTA et al., 2010; LOMBARDI et al., 2014), assim como marsupiais (SANTIAGO et al., 2007) da espécie *Didelphis spp.*, edentados *Tamandua tetradactyla* (ARAÚJO et al., 2013), roedores (PAPADOGIANNAKIS et al., 2010) e equinos (ROLÃO et al., 2005).

Os reservatórios identificados como habituais estão relacionados às formas, ou seja, ambientes silvestres e urbanos, em que a cadeia epidemiológica é conhecida. Primeiramente, a enfermidade foi notificada nas zonas rurais com reservatórios silvestres de espécies de carnívoros como *Lycalopex vetulus* (raposa-do-mato), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato), *Speothos venaticus* (cachorro-do-mato-vinagre) e *Didelphis albiventris* (gambás) (COURTENAY et al., 1996; CURI et al., 2006; LOMBARDI et al., 2014). No Brasil, dentre os canídeos silvestres, a raposa (*Cerdocyon thous*) é considerada reservatório natural da leishmaniose visceral (SHERLOCK, 1996).

Os reservatórios em ambientes urbanos são os canídeos. A espécie *Canis familiaris* é o mais importante hospedeiro vertebrado e principal reservatório para a leishmaniose visceral humana pelo íntimo convívio entre as espécies (SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2012). Configuram a principal fonte de infecção para os flebótomos devido ao alto grau de parasitismo na pele e à grande susceptibilidade à infecção (HARHAY et al., 2011).

Eventualmente, os felinos, principalmente o gato doméstico, podem ser acometidos por leishmaniose, sendo susceptíveis tanto na forma visceral quanto cutânea, e também estão relacionados a infecção em ambientes urbanos (COSTA et al., 2010).

A infecção por *Leishmania sp* em equinos tem sido relatada em diferentes países. O primeiro caso conhecido foi de animal na Argentina em 1927. A partir deste, foram diagnosticados outros casos em diversos países, com uma variedade de espécies responsáveis pela infecção, entre elas: *Leishmania siamensis* nos Estados Unidos (REUSS et al., 2012) *Leishmania infantum* na Alemanha, Espanha, Portugal e Brasil (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006; KOEHLER et al., 2002; LOPES et al. 2013; SOARES et al., 2013), *Leishmania*

(*Viannia braziliensis* e *Leishmania chagasi* no Brasil (VEDOVELLO FILHO et al., 2008; FEITOSA et al., 2012).

No continente europeu, as descrições de cavalos infectados por *L. infantum* apontam esta espécie como o agente etiológico da leishmaniose. Equinos que vivem em áreas endêmicas estão mais expostos a contrair a enfermidade (SOLANO-GALLEGO et al. 2003; MUHKTAR et al., 2000). Foram relatados casos em Portugal, Espanha e Alemanha (ROLÃO et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al. 2003; FERNÁNDEZ-BELON et al., 2006; KOEHLER et al., 2002). No Brasil, foram detectados anticorpos anti-*Leishmania* sp. em equinos na cidade de Araçatubada (SP), região endêmica para LVC e LVH (FEITOSA et al., 2012). Também houve relato da presença de *L. infantum* nesta espécie no estado de Minas Gerais, cujo diagnóstico realizado em três animais detectou presença de parasitos em lesões e aspirado de medula óssea, sendo a identificação realizada através de técnicas sorológicas e moleculares. O resultado do PCR sugeriu uma infecção mista causada por *L. infantum* e *L. braziliensis* nos três animais estudados (SOARES et al., 2013).

Cerqueira et al. (2003) sugerem a participação dos equinos na cadeia epidemiológica da leishmaniose, por serem comumente utilizados como meio de transporte ou de carga, movimentando-se constantemente por diversas regiões das localidades endêmicas. A espécie constitui adequada fonte sanguínea para a alimentação dos flebótomos, o que pode estimular a proliferação dos vetores, aumentando a reprodução, densidade e elevando o risco de transmissão do agente etiológico.

## **2.7 Epidemiologia**

As doenças transmitidas por vetores são limitadas por variáveis ambientais como temperatura, umidade, uso do solo e vegetação. O ciclo de vida dos vetores, assim como dos reservatórios e hospedeiros que participam da cadeia de transmissão de doenças está fortemente relacionada à dinâmica ambiental dos ecossistemas onde vivem. Porém, além dos fatores ambientais, existem outros que influenciam nesta dinâmica, como os fatores sócio-demográficos, biológicos e médico-sociais (BARCELOS et al., 2009).

Neste panorama, a leishmaniose apresenta-se como uma enfermidade em grande processo de expansão geográfica em diversos países ao redor do mundo, sendo classificada pela Organização Mundial de Saúde como uma das Doenças Tropicais Negligenciadas - DTN

de maior importância que acomete, com maior frequência, a população dos países em desenvolvimento, com 90% dos casos diagnosticados concentrados na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012).

Estima-se que cerca de 98 países já identificaram casos positivos, representando um grave problema de saúde pública, pois anualmente são cerca de 14 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção e doença pelo parasito (ALVAR et al., 2012).

O Brasil concentra o maior número de casos de LVH (90%) na América Latina, representando um dos maiores focos da doença no mundo. Entre os anos de 1980 e 2005, foram notificados pelo Ministério da Saúde 59.129 casos de LVH no nordeste brasileiro que gradativamente foram expandindo-se para outras regiões (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Até o final da década de 80, estava restrita às zonas rurais do nordeste do país e o ciclo de transmissão ocorria entre vetores e animais silvestres. Na década de 1990, a região nordeste concentrava 89% dos casos positivos de leishmaniose. A partir de então, verificou-se a ocorrência de uma nítida expansão geográfica para os estados mais ao sul do país e franco processo de urbanização do vetor em regiões distintas.

O Estado do Rio Grande do Sul era considerado área indene para leishmaniose visceral até 2007. No entanto, em outubro de 2008, foi diagnosticado um cão residente no município de São Borja. Nos meses seguintes, foram efetuadas capturas de vetores na cidade para corroborar a autoctonia do caso canino, sendo comprovada a presença da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Em janeiro de 2009, foi confirmado o primeiro caso humano autóctone do município (SES, 2014). No mesmo ano, a doença passou a ocorrer em todas as regiões do país, sendo que a principal condição de transmissibilidade nesses novos ambientes está relacionada à adaptação do vetor *L. longipalpis* ao peridomicílio (CEVS/RS, 2010).

Conforme Nota Técnica do Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (CEVS – RS, 2010), até abril de 2010 foram identificados sete municípios com a presença do vetor (*L. longipalpis*), localizados na fronteira com a Argentina (Barra do Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja, Garruchos, Pirapó e Porto Xavier). Também foram registrados 11 municípios com a presença de cães sorologicamente positivos para LVC, sem isolamento da espécie de *Leishmania*, sendo que cinco dessas cidades fazem fronteira com o território argentino (Barra do Quaraí, Uruguaiana, Itaqui, São Borja e Porto Xavier). As cidades de São Borja e Uruguaiana foram incluídas como municípios pertencentes à área de transmissão, onde foram encontrados vetores e houveram casos positivos humanos e caninos autóctones, com caracterização do parasito (TARTAROTTI et al., 2011).

A urbanização da leishmaniose visceral no Brasil é multifatorial, estando associada à fatores ambientais, biológicos do vetor e demográficos. Como principal fator ambiental, pode-se inferir o desmatamento desordenado das zonas rurais que resultou na invasão do ambiente peridomiciliar pelas espécies vetoras. Estes ambientes, com a presença dos vetores e grande população do cão doméstico susceptível à infecção por *L. infantum*, contribuíram para a disseminação e manutenção do ciclo peridomiciliar da endemia. (ROSAS FILHO e SILVEIRA, 2007).

Algumas características biológicas do vetor também propiciam disseminação da doença, especialmente a alta capacidade de adaptação do vetor a variadas condições de temperaturas, assim como sua permanência e reprodução em diversos ambientes, fatores estes que justificam a expansão geográfica da leishmaniose em todo território brasileiro, desde climas mais quentes como nas regiões do nordeste até climas amenos no sul do país. Em regiões urbanas, o vetor é encontrado principalmente nas zonas de periferias, entretanto em alguns municípios, a enfermidade apresenta uma distribuição mais ampla abrangendo além das zonas periféricas, as áreas centrais. Os vetores são bem adaptados aos peridomicílios, intradomicílios, galinheiros, chiqueiros, canis, paíóis (ALVES e BEVILACQUA, 2004; BRASIL, 2014).

Outra característica peculiar dos vetores, é que as fêmeas possuem hábitos ecléticos para realizar o repasto sanguíneo, o que explica a grande quantidade de animais vertebrados mamíferos que podem ser infectados pelo protozoário, e desta forma, tornando o entendimento da cadeia epidemiológica mais complexo (BRASIL, 2014; SOARES, 2012).

Frente a essas condições epidemiológicas, o Ministério da Saúde implementou, em 2006, o *Programa de Controle da Leishmaniose Visceral* e instituiu algumas metas para a eliminação da doença, incluindo o diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, identificação e eutanásia dos cães diagnosticados soropositivos, controle do inseto vetor e educação em saúde. Embora exista o programa, suas ações apresentam pouco impacto sobre a situação epidemiológica da leishmaniose no país. Os dados apontam uma grande expansão do vetor e dos casos diagnosticados dentro do território brasileiro, com significativo aumento anual.

Por ser uma enfermidade relativamente nova no estado, com casos diagnosticados a partir da década de 2000, o sistema de controle e prevenção está em estruturação. Entretanto, tem se observado um grande aumento de cães infectados, principalmente em áreas urbanas. Como a urbanização da doença é um fenômeno recente, são escassas as informações sobre a

epidemiologia e as relações entre os componentes da cadeia de transmissão nesse novo cenário no estado do Rio Grande do Sul.

## **2.8 Formas Clínicas da Leishmaniose em diferentes hospedeiros**

A leishmaniose apresenta variadas manifestações clínicas intimamente relacionadas à espécie de vetor e parasito envolvidos na infecção (CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004). A presença de sinais clínicos ocorre dependendo da resposta imunológica desencadeada pelo organismo do hospedeiro.

A infecção em humanos é subdividida em quatro quadros clínicos distintos: leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea, leishmaniose visceral e PKDL (leishmaniose tegumentar Post-kala-azar), podendo permanecer assintomático por meses até anos (CHAPPUIS et al., 2007; WHO, 2010).

Na leishmaniose cutânea, os sinais clínicos mais aparentes são nódulos ulcerados na pele. A forma muco-cutânea causa ulceração nas mucosas estendendo-se do nariz e boca para a faringe e laringe, permanecendo por meses ou anos. A leishmaniose visceral é uma enfermidade fatal quando não é tratada. Os principais sintomas são anemia, febre, hepatoesplenomegalia, manifestações hemorrágicas, linfadenomegalia, perda de peso, taquicardia, diarreia, tosse seca e desnutrição. A forma tegumentar PKDL é frequentemente observada após seis meses até um ano ou mais, do tratamento e cura aparente da leishmaniose visceral. Esses casos são altamente infecciosos devido ao elevado parasitismo nas lesões (WHO, 2010).

Essa classificação adotada para as formas de leishmaniose em humanos não se aplica para infecção em outros mamíferos (ROQUE e JANSEN, 2014). Os cães, praticamente todos, desenvolvem doença visceral ou sistêmica, sendo que 90% dos animais sintomáticos também apresentam algum envolvimento cutâneo. A evolução da doença é lenta e o início insidioso, as manifestações clínicas estão intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. O quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final (BRASIL, 2014). Os sinais viscerais mais comuns são: linfadenopatia, emaciação, sinais de insuficiência renal (poliúria, polidipsia, vômito), neuralgia, poliartrite, polimiosite; sendo que aproximadamente um terço dos pacientes apresenta febre e esplenomegalia. Dentre os sinais

cutâneos estão hiperqueratose, pelagem seca e quebradiça, perda de pêlos e unhas anormalmente longas ou quebradiças, o que se constitui em um achado específico em alguns pacientes. A pele dos cães é a região do corpo que mais manifesta sinais clínicos, local onde acontece a primeira interação entre o parasito e o sistema imune do cão e também onde se encontra grande quantidade de formas amastigotas do parasito (CIARAMELLA et al., 1997).

Um desafio enfrentado no diagnóstico canino é a identificação dos animais assintomáticos. Segundo Solano – Gallego et al., (2004) as lesões de pele (alopecia e dermatites) são comuns na leishmaniose visceral canina, no entanto, a maioria dos cães infectados não apresenta sinal clínico, e mesmo na pele clinicamente sadia pode haver presença de parasitos. Devido a este fato, Solano – Gallego et. al (2004) alertam para a relevância desses animais no ciclo de transmissão da doença. Complementando, Otranto et al. (2009) descreveram que nas regiões da América do Sul e Mediterrânea a maior parte dos cães infectados (soropositivos) é assintomática, e mesmo assim, reservatórios do protozoário.

Os relatos da infecção em equinos não apresentaram indícios de acometimento sistêmico, a sintomatologia conhecida até o presente momento é cutânea, sem padrão característico (KOEHLER et al., 2002; MÜLLER et. al., 2009).

Um equino de 3,5 anos, proveniente da região sul da Alemanha, apresentou um pequeno nódulo dérmico na região dos olhos, que após remoção evoluiu, em dois meses, para ulceração na pele com múltiplas lesões. Entretanto, após detectada a presença de formas amastigotas e material genético de *L. infantum*, o animal apresentou cura espontânea, com cicatrização completa das lesões em seis meses (KOEHLER et al., 2002). Por outro lado, animais saudáveis, frequentemente expostos à infecção pelo protozoário em áreas endêmicas e na presença de cães, também podem estar infectados por leishmaniose, apresentando resposta imunológica para *L. infantum*, mesmo sem manifestações clínicas aparentes (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006).

Ainda, dentro deste contexto, sabe-se que equinos provenientes da Alemanha e Suíça, apresentaram nódulos na pele e lesões cutâneas na cabeça, orelha, tórax, axila e flancos. Também complementaram que, em geral, as lesões de pele relatadas na leishmaniose equina são pápulas ou nódulos, solitários ou múltiplos, que podem ser ulceradas, e são mais comumente presente na cabeça, ouvidos, pescoço, escroto e membros. Outros sinais clínicos geralmente não estão presentes (MÜLLER et al., 2009).

No Brasil, recentemente, foram diagnosticados os primeiros casos de leishmaniose em equinos pela infecção por *L. infantum* (FEITOSA et al., 2012; SOARES et al., 2013). No entanto, já existiam relatos de equinos com lesões cutâneas, causadas pela espécie *L.*

*braziliensis* (VEDOVELLO FILHO et al., 2008). Os sinais clínicos aparentes incluíram lesão ulcerada grande, granulomatosa e exsudativa com um grau moderado de prurido, somado à baixa condição corporal. Outro animal apresentou lesões ulcerativas na região vulvar e problemas locomotores (SOARES et al., 2013).

Os resultados apresentados pelos diferentes autores na Europa, assim como no Brasil, mostram que a enfermidade em equinos, assim como em outras espécies, pode causar uma série de manifestações clínicas, ou até mesmo, manter o hospedeiro assintomático, tornando o diagnóstico muitas vezes inconclusivo, tardio ou inexistente e, desta forma, aumentando o risco de infecção na população humana e animal nas regiões endêmicas, propiciando a expansão destes protozoários através de vetores infectados a regiões indenes.

## 2.9 Diagnóstico

No Brasil, com a crescente expansão e urbanização geográfica da leishmaniose, o Ministério da Saúde desenvolveu o *Manual de Vigilância Epidemiológica da Leishmaniose, Visceral e Tegumentar*. Este manual padronizou o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina, os quais se fundamentam na detecção do agente causal, baseando-se nas técnicas imunológicas ou parasitológicas (BRASIL, 2014; SES, 2014).

Os testes laboratoriais de rotina mais utilizados são os imunológicos, como as técnicas sorológicas ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) que são baseados na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* ou de antígenos específicos. Tais testes são empregados em levantamentos soroepidemiológicos (TÁVORA et al., 2007), sendo considerados um importante avanço tecnológico para o diagnóstico da LV, pois permitem a avaliação de um grande número de amostras em um curto espaço de tempo (SOARES, 2012). Contudo, nas técnicas sorológicas a presença de reações cruzadas com outras espécies de parasitos da família Trypanosomatidae, em especial o *Trypanosoma cruzi* podem apresentar resultados falsos positivos (INIESTA et al., 2002; MATOS et al., 2015). Também é utilizado o teste imunocromatográfico (Teste Rápido *Dual Path Platform*), como método de triagem, o qual detecta anticorpos específicos de LVH e LVC. Este método destaca-se pela praticidade da execução e interpretação dos resultados, além disso, apresenta alta especificidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; SES, 2014). Uma limitação encontrada na utilização das técnicas sorológicas é o diagnóstico de leishmaniose visceral em animais



assintomáticos, pois frequentemente, nestes casos os testes sorológicos não apresentam reatividade pela baixa carga de infecção e consequentemente baixos níveis de anticorpos (INIESTA et al., 2002; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006).

Entre as técnicas laboratoriais, o método parasitológico é considerado de maior especificidade para o diagnóstico de LV, embora nem sempre este seja de fácil execução, pois a coleta do material biológico é invasiva (QUEIROZ et al., 2010; MATOS et al., 2015). O diagnóstico parasitológico busca a presença de parasito, nas formas amastigotas, nos órgãos infectados, através das técnicas de observação microscópica, cultura ou exame direto (CORTES, 2008). O material biológico para a visualização das formas amastigotas deve ser obtido preferencialmente da medula óssea (por ser um procedimento mais seguro), aspirado de linfonodos ou biópsia hepática (SES, 2014).

A técnica molecular PCR tem sido muito utilizada para o diagnóstico da LVC. Este método permite a amplificação de sequências de DNA específicas do parasito, mesmo em amostras biológicas com baixos níveis de infecção parasitária, apresentando viabilidade de diagnóstico inclusive em animais assintomáticos e soronegativos nas técnicas imunológicas (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; INIESTA et al., 2002). Amostras de aspirados ou biópsias de linfonodo, baço, medula óssea e fígado apresentam melhores resultados, contudo, amostras de sangue periférico, pele e conjuntiva proporcionam uma colheita menos invasiva (MANNA et al., 2004). Embora a técnica molecular PCR apresente maior sensibilidade no diagnóstico de leishmaniose visceral, é pouco utilizada na rotina de laboratórios e não está padronizada pelo Ministério da Saúde do Brasil por ser onerosa inviabilizando inquéritos epidemiológicos (QUEIROZ et al., 2010).

No Rio Grande do Sul, casos suspeitos para a LVC são testados pelo Laboratório Central do Estado (LACEN), com a utilização do teste de triagem teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP) e pela técnica de ELISA, que é o teste confirmatório, preconizados pela Nota Técnica do Ministério da Saúde N°1/11. Quando os dois testes são positivos, o cão é considerado portador da doença (sintomático ou assintomático), sendo a eutanásia a única medida recomendada, segundo as normas do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do Ministério da Saúde.

Diferentemente das LVC e LVH, que já possuem padronização das técnicas diagnósticas, utilizam-se os mais variados testes para a verificação da infecção nas demais espécies, sendo os testes sorológicos e parasitológicos amplamente utilizados (KOUAM et al., 2010; FEITOSA et al., 2012; BIGELI et al., 2012; SOARES et al., 2013).

### 2.9.1 Diagnóstico da Leishmaniose equina

O diagnóstico da enfermidade em equinos tem sido realizado em diversas regiões endêmicas, tanto na Europa quanto nas Américas, através de diferentes técnicas e materiais biológicos como sangue total, soro, biópsia de lesões de pele e nódulos, aspirado de medula óssea (Tabela 2).

MÜLLER et al. (2009) descreveram as técnicas comumente utilizadas (histologia e sorologia) e ressaltaram também a utilização da técnica de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (RFLP) e PCR utilizadas por Koehler et al.(2002), nos casos provenientes da Alemanha.

Na tentativa de se obterem resultados confiáveis, tem-se utilizado técnicas já conhecidas para as espécies humanas e caninas, para o diagnóstico da leishmaniose visceral em equinos. O método molecular PCR tem sido amplamente utilizado no diagnóstico e também na identificação das espécies infectantes, por apresentar um alto índice de sensibilidade e especificidade (KOEHLER et al., 2002; MÜLLER et al.,2009; SOARES et. al., 2013).

São também frequentemente utilizadas para o diagnóstico as técnicas sorológicas, principalmente o ensaio imunoenzimático ELISA (FERNÁNDEZ – BELLON et al., 2006; KOUAM et al., 2010; FEITOSA et al., 2012; LOPES et. al., 2013).

Nos animais que apresentam alterações cutâneas, também pode ser realizada a biópsia das lesões para a averiguação da presença de formas amastigotas infectantes nos macrófagos através de exames histopatológicos e observação em microscopia eletrônica (KOEHLER et al., 2002).

Tabela 2 - Técnicas de diagnóstico utilizadas para a detecção de leishmaniose em equinos, com diferentes materiais biológicos.

Técnica de diagnóstico	Material biológico	Sintomatologia	País	Autor/Ano
Análise histopatológica Imunohistoquímica Imunofluorescência Microscopia PCR/RLFP ELISA	Biópsia de lesão de pele	Nódulos múltiplos na pele	Alemanha	Koehler et al. (2002)
ELISA	Sangue (soro)	Ausência de sinais clínicos	Espanha	Fernández-Bellon et al. (2006)
Análise histológica Imunohistoquímica PCR	Biópsia de nódulos de pele	Nódulos e lesões cutâneas	Alemanha Suíça	Müller et al. (2009)
ELISA	Sangue (soro)	Não informado	Grécia	Kouam et al. (2010)
ELISA Imunocromatografia	Sangue (soro)	Não informado	Brasil	Feitosa et al. (2012)
Imunofluorescência PCR ELISA	Lesões de pele, aspirados de MO	Lesões de pele	Brasil	Soares et al. (2013)
PCR ELISA	Sangue	Ausência de sinais clínicos	Brasil	Truppel et al. (2014)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Verificar a ocorrência de *Leishmania* sp, em equinos de zona urbana do município de Uruguaiana – RS, por meio de diferentes técnicas de diagnóstico.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Verificar a presença de material genético de *Leishmania* sp no sangue periférico pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em equinos de zona urbana do município de Uruguaiana – RS;
- Investigar presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp pela técnica sorológica ELISA nos equinos do município;
- Empregar o ensaio de triagem imunocromatográfico Teste Rápido *Dual Path Platform* para a detecção de anticorpos específicos para *Leishmania* nos equinos do município de Uruguaiana - RS.

## **4 CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, formatado de acordo com as normas de submissão da Revista Ciência Rural. As seções Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no manuscrito a seguir.

1 **Presença de *Leishmania* sp em equinos de zona urbana no município de**  
2 **Uruguaiana – RS.**

3 ***Leishmania* sp in equines of urban area in Uruguaiana’s city – RS.**

4  
5 **Taiane Acunha Escobar<sup>1</sup>, Gabriela Dowich<sup>2</sup>, Letícia Cantele<sup>2</sup>, Irina Lübeck<sup>2</sup>, Claudia**  
6 **Acosta Duarte<sup>2\*</sup>**

7  
8 **RESUMO**

9 O estudo foi realizado com o objetivo de identificar a presença de *Leishmania* sp em equinos  
10 urbanos do município de Uruguaiana-RS, utilizando a técnica sorológicas (ELISA e TR-DPP)  
11 e molecular (PCR). Para a condução da técnica de ELISA foi utilizado soro, testado com o Kit  
12 Ensaio Imunoenzimático para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina – Bio-  
13 Manguinhos e para o Teste Rápido *Dual Path Platform* Bio-Manguinhos, utilizaram-se  
14 amostras de sangue total. Na técnica de PCR, o DNA foi extraído do sangue periférico e as  
15 ampliações foram realizadas com os iniciadores RV1/RV2, LITSR/LITSV, LITSR/L5.8S/  
16 LITSV/L5.8SR. Todas as amostras testadas apresentaram-se não reagentes nos ensaios  
17 imunológicos. Entretanto, com o emprego do PCR, técnica mais sensível, houveram 75  
18 amostras positivas, 39,06% do total de 192 equinos testados. Na análise individual de cada  
19 iniciador, observamos que 58,6% das amostras foram positivas para LITSV/L5.8SR, 44%  
20 para LITSV/LITSR, 28% para RV1/RV2, e 4% LITSR/L5.8S. Os resultados apresentados

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Laboratório de Diagnóstico de doenças infecto contagiosas bacterianas e fúngicas animais, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. Uruguaiana, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Curso de Medicina Veterinária, Laboratório de Laboratório de Diagnóstico de doenças infecto contagiosas bacterianas e fúngicas animais, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. Uruguaiana, RS, Brasil.

\*Autor para correspondência, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, BR 472, KM 585, Caixa Postal 118, Uruguaiana, RS, Brasil. CEP 97.501-009. E-mail: [caduarte74@gmail.com](mailto:caduarte74@gmail.com)

1 na técnica molecular indicam a infecção por protozoários do complexo *Leishmania donovani*  
2 em equinos na região de Uruguaiana-RS.

3 **Palavras-chave:** *Leishmania*, Método Diagnóstico, Infecção

4

#### 5 **ABSTRACT**

6 The aim of the present study was to identify the presence of *Leishmania* infection in urban  
7 equines in the city of Uruguaiana, RS, using serological (ELISA and TR-DPP) and molecular  
8 (PCR) techniques. For conducting ELISA's Test serum was used and tested with Bio-  
9 Manguinhos kit and for TR-Dual Path Platform Rapid Test whole blood samples were  
10 employed. In the PCR technique, DNA was extracted from peripheral blood of animals and  
11 amplifications were performed with primers RV1 / RV2, LITSR / LITSV, LITSR / L5.8S /  
12 LITSV / L5.8SR. All tested samples showed negative results in immunoassays. However,  
13 employing PCR, sensitive technique, 75 (39,06%) positive samples were detected. In the  
14 individual analysis of each primer observed that 58.6% of the samples were positive for  
15 LITSV/L5.8SR, 44% to LITSV/LITSR, 28% for RV1/RV2, and 4% LITSR/L5.8S. The  
16 molecular technique results showed possibility of infection by protozoa *Leishmania donovani*  
17 complex in horses in Uruguayana - RS.

18 **Key Words:** *Leishmania*, Diagnostic Methods, Infection

19

#### 20 **INTRODUÇÃO**

21 A leishmaniose é um complexo de doenças causadas por protozoários de diferentes  
22 espécies do gênero *Leishmania*, Ross, 1903, pertencentes à família Trypanosomatidae, e  
23 transmitida pelo vetor flebótomo. Tem ocorrência em 98 países e estima-se que 350 milhões  
24 de pessoas estejam expostas ao risco de infecção e doença (ALVAR et al., 2012),  
25 representando um grave problema de saúde pública. Atualmente, sabe-se que além dos seres  
26 humanos, diversos mamíferos também são acometidos por leishmaniose, participando

1 ativamente da cadeia epidemiológica e garantindo a manutenção do agente etiológico  
2 (SOARES et al., 2013).

3 MUKHTAR et al. (2000) relataram que equinos podem ser infectados quando vivem  
4 em áreas endêmicas. Os animais de tração utilizados como meio de transporte ou carga,  
5 movimentam-se intensamente por diversas regiões em localidades endêmicas e podem  
6 participar da cadeia epidemiológica da leishmaniose (CERQUEIRA et al., 2003). A espécie  
7 constitui adequada fonte sanguínea para a alimentação dos vetores estimulando a sua  
8 proliferação, aumentando a reprodução, densidade e elevando o risco de transmissão do  
9 agente etiológico. Nos países do continente europeu existem descrições de equinos infectados  
10 por *L. infantum* (SOLANO-GALLEGO et al. 2003), possível agente etiológico da  
11 leishmaniose em equinos. No Brasil, também foram evidenciados casos de infecção por  
12 *Leishmania* sp em equinos de áreas endêmicas (FEITOSA et al. 2012; SOARES et al., 2013).  
13 Apesar das evidências de que equinos são capazes de se infectar com *Leishmania infantum*, a  
14 investigação em animais provenientes de regiões endêmicas se faz importante, uma vez que o  
15 papel desta espécie na transmissão da enfermidade, como fonte de alimentação para os  
16 vetores ou participante do ciclo epidemiológico, ainda não está esclarecido (KOUAM et al.,  
17 2010).

18 Nos últimos anos tem-se verificado o aumento significativo de casos caninos da  
19 enfermidade no município de Uruguaiiana, aliado às condições ambientais propícias à  
20 adaptação do vetor. Os equinos de zona urbana são frequentemente utilizados como meio de  
21 transporte e fonte de renda para muitas famílias, estão em intenso contato com animais  
22 domésticos, habitando residências onde geralmente existe acúmulo de lixo e matéria orgânica.  
23 Neste cenário, o expressivo número de cavalos de tração circulando diariamente dentro do  
24 perímetro urbano, somado às condições precárias de vida dos animais, podem ser fatores de  
25 risco de infecção por *Leishmania* na espécie. Tal fato nos faz questionar se no município,



1 assim como em outras regiões endêmicas do Brasil, os equinos são capazes de albergar o  
2 parasito, visando o conhecimento sobre a dinâmica da enfermidade na espécie e alertar a  
3 comunidade e autoridades competentes para o risco de infecção por *Leishmania* sp em outras  
4 espécies, além de cães. Portanto, o presente estudo teve como objetivo identificar a presença  
5 de *Leishmania* sp em equinos de zona urbana do município de Uruguaiiana, -RS.

6

## 7 MATERIAL E MÉTODOS

8 Foram utilizados 192 equinos de zona urbana, de diferentes bairros e de ambos os  
9 sexos, vinculados ao Projeto “Carroceiro” da Universidade Federal do Pampa, do município  
10 de Uruguaiiana, extremo oeste do Rio Grande do Sul - Brasil. A amostra foi determinada a  
11 partir da estimativa de proporção amostral, considerando a prevalência estimada de 14,6%  
12 (FEITOSA et al., 2012), ao nível de confiança de 95%.

13 Os animais foram submetidos a colheita de sangue por venopunção da jugular externa,  
14 em tubos com EDTA e com gel separador de coágulo, após as amostras foram acondicionadas  
15 a -20°C até o início do processamento.

16 A avaliação sorológica dos equinos foi realizada através da técnica ELISA com o Kit  
17 Ensaio Imunoenzimático para Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina – Bio-  
18 Manguinhos fornecido pelo Ministério da Saúde, conduzida no Laboratório Central do Estado  
19 LACEN –RS. As amostras foram processadas conforme indicação do fabricante em duplicata,  
20 com diluições na proporção 1:100, em placas de microtitulação sensibilizadas com antígenos  
21 solúveis de *Leishmania major-like* (MHOM/BR/76/JOF). O bloqueio da reação foi efetuado  
22 com a adição de ácido sulfúrico 2M e a leitura realizada em espectrofotômetro com  
23 absorvância de 450nm. O ponto de corte foi calculado através do dobro da média da  
24 densidade ótica (DO) dos controles negativos. Foram consideradas reagentes as amostras que

1 apresentaram DO igual ou superior ao ponto de corte, e não reagentes, as que apresentaram  
2 densidade inferior ao ponto de corte.

3 Para a realização da técnica de imunocromatografia, o Teste Rápido *Dual Path*  
4 *Platform* Bio-Manguinhos, fornecido pelo Ministério da Saúde foi desenvolvido conforme  
5 manual do fabricante, com sangue total. Consideraram-se positivas as amostras em que  
6 houveram a marcação de duas bandas (referentes ao controle e a amostra testada) e negativas  
7 quando apresentaram apenas a banda referente ao controle, foram utilizadas amostras de cães  
8 portadores de LVC como controles positivos.

9 Para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a extração do DNA foi  
10 adaptada de SAMBROOCK et al. (1989). Utilizou-se 500 µL de sangue total periférico e  
11 tampão *Cell Lyse* (Tris 1M pH 7,4, Sacarose, Triton X 100), com centrifugação à 13.000 rpm  
12 por 1 min. após adicionou-se RCLB (Bicarbonato de Amônio, Cloreto de Amônio) com  
13 centrifugação (5.000 rpm por 6 min.) e descarte do sobrenadante. A lise do precipitado foi  
14 com adição de TEM 1x (Tris HCL, EDTA, NaCl), SDS (Duodecil Sulfato de Sódio) e  
15 proteinase K. Após agitação e incubação a 56 °C por 1 hora, foi adicionado NaCl saturado  
16 (5M) e centrifugação (13.000 rpm por 5 min.). A precipitação do material foi com álcool  
17 isopropílico a -20 °C por 30 minutos, seguida de três lavagens com Etanol 70% e  
18 centrifugação (10.000 rpm por 2 min.). O DNA foi ressuspensão em tampão TE (Tris HCL,  
19 EDTA). A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada com 4 protocolos distintos,  
20 visando aumentar as chances de detecção do protozoário no sangue periférico. Foram  
21 empregados quatro pares de iniciadores, os quais amplificaram separadamente as regiões  
22 ribossomais ITS, ITS1, ITS2 e a sequência LT1 do kDNA, do complexo *L. donovani* (Tabela  
23 1). Nas reações, foram utilizados 10 µL de DNA e o *mix* contendo 10 mM de dNTP, 10 pmol  
24 de cada iniciador, 2µL solução tampão, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq DNA polimerase, e 8  
25 µL de água ultra pura, totalizando 25 µL. As amplificações, em termociclador *Amplitherm*

1 *Thermal Cyclers* TX96 Plus, seguiram as indicações das condições de desnaturação,  
2 anelamento, extensão para cada iniciador (Tabela 1). Os controles positivos foram o DNA das  
3 espécies *L. (L.) infantum* (MOHM/BR/1974/PP75 e MOHM/BR/2002/LPC-RPV) e *L. (L.)*  
4 *donovani* (MOHM/ET/1967/HU3) cedidos pelo Laboratório de Referência Nacional para  
5 Tipagem de *Leishmania* – CLIOC FIOCRUZ. Como controles negativos utilizaram-se os  
6 reagentes sem material genético e amostras de equinos de região não endêmica para  
7 leishmaniose.

8 A análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose  
9 corados com brometo de etídeo (SAMBROOK et al., 1989) visualizados em sistema de  
10 fotodocumentação com luz ultravioleta (*AlphaImager*). As amostras foram consideradas  
11 positivas a partir da visualização de fragmentos com bandas específicas referentes a cada par  
12 de iniciador (Tabela 1).

13

## 14 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

15 No diagnóstico molecular, a utilização dos quatro pares de iniciadores específicos para  
16 as regiões conservadas das espécies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* (complexo *L.*  
17 *donovani*) permitiu a visualização de fragmentos de DNA de *Leishmania* em 75 equinos,  
18 totalizando 39,06% dos 192 animais testados (Tabelas 2 e 3). Estes animais eram  
19 provenientes de sete bairros distintos do município, sendo utilizados na tração de cargas e  
20 meio de transporte, com constante movimentação dentro do perímetro urbano.

21 Entre os animais positivos, 21 (28%) amostras apresentaram a região LT1 do kDNA  
22 do parasito amplificada e no DNA ribossomal houveram ampliações de fragmentos nas  
23 regiões variáveis ITS em 33 amostras (44%), ITS1 em 44 amostras (58,6%) e ITS2 em 3  
24 amostras (4%) (Tabela 3). Três animais apresentaram resultados positivos para três pares  
25 distintos de iniciadores e vinte mostraram-se positivos para dois pares (Tabela 2).

1 A amplificação da região ITS2 (LITSV/L5.8SR) evidenciou maior desempenho nos  
2 resultados, apresentando 22,9% de positivos em relação ao número total de amostras testadas  
3 (Figura 1), embora os demais iniciadores também tenham codificado fragmentos de DNA do  
4 complexo *L. donovani*. Corroborando com os resultados apresentados no presente trabalho, os  
5 iniciadores LITSV/L5.8SR e LITSR/L5.8S foram empregados no diagnóstico de leishmaniose  
6 cutânea em equinos em diferentes países europeus como Alemanha e Suíça (KOEHLER et  
7 al., 2002; MÜLLER et al., 2009). A utilização dos iniciadores RV1/RV2 em amostras de cães,  
8 para a detecção de material genético do complexo *donovani* no Brasil, também foi eficiente  
9 (BIGELI et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013).

10 Os resultados apontados são compatíveis com outros estudos nos quais a técnica  
11 molecular de PCR foi amplamente utilizada como método diagnóstico de leishmaniose em  
12 diferentes espécies animais e permitiu a detecção do parasito em diversas amostras (GOMES  
13 et al., 2007; SOUZA et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2010; LOMBARDI et al., 2014).

14 O diagnóstico sorológico (ELISA) e o teste imunocromatográfico (TR-DPP) não  
15 detectaram a presença de anticorpos anti-*Leishmania* nas amostras testadas. Os resultados  
16 negativos, mesmo naquelas amostras positivas no diagnóstico molecular, podem estar  
17 associados à utilização de controles de cães (positivos e negativos) na técnica sorológica,  
18 devido à inexistência de controles equinos, o que poderia ter influenciado o cálculo da linha  
19 de corte (*cut-off*) dos testes. Em equinos, a ausência de anticorpos específicos pode estar  
20 associada ao fato da espécie apresentar resposta imune humoral fraca comparada à resposta de  
21 cães (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006). Para GRAMICCIA (2011), além da ausência de  
22 anticorpos específicos, os animais apresentam cura espontânea, sendo sugerido os testes  
23 parasitológicos e moleculares para o diagnóstico. Também pode-se considerar que a baixa  
24 resposta humoral característica dos indivíduos assintomáticos frequentemente coloca seus

1 níveis de anticorpos abaixo da linha de corte (*cut-off*) ou no seu limite de detecção  
2 (CABRAL, 2007).

3 A combinação das técnicas de ELISA e imunocromatografia empregadas para o  
4 diagnóstico de equinos na região de Araçatuba, diferiram dos resultados encontrados no  
5 presente trabalho, apresentando reatividade. Entretanto os testes foram adaptados à espécie  
6 equina (FEITOSA, et al., 2012). Por outro lado, KOEHLER et. al., (2002) identificaram um  
7 equino com ausência de anticorpos séricos específicos, embora diagnosticado com presença  
8 de formas amastigotas nas análises histopatológicas e imunohistoquímicas e fragmentos de  
9 DNA no PCR. Para RIERA et al. (2003), a sorologia negativa não descarta a infecção,  
10 principalmente nas formas ocultas, assim como um resultado positivo em técnicas  
11 imunológicas não representa, necessariamente, uma infecção ativa e pode indicar uma  
12 exposição prévia ou contato com o protozoário, o que é comum em áreas endêmicas.

13 TRUPPEL et al. (2014), ao realizar diagnóstico em equídeos no Estado do Paraná –  
14 Brasil, observaram, pelas técnicas de PCR / ELISA, que a presença de parasito no sangue e  
15 sorologia negativa podem caracterizar uma infecção aguda ou doença relacionada à  
16 deficiência imunitária, enquanto que resultados sororeagentes com PCR negativo foram  
17 obtidos em casos em que o animal teve apenas uma exposição ao parasito, ou está em fase  
18 crônica da infecção e não se encontra presente no sangue.

19 Na América Latina, incluindo o Brasil, foi identificada a espécie *Leishmania infantum*,  
20 (*Leishmania chagasi*) como agente etiológico da leishmaniose visceral em humanos e nos  
21 cães que, além de apresentarem a forma visceral ou sistêmica, podem desenvolver lesões  
22 cutâneas. Em equinos infectados por *Leishmania infantum*, foi observada a presença de lesões  
23 de pele como a principal manifestação clínica, sendo esta denominada como leishmaniose  
24 cutânea (KOEHLER et al., 2002; MÜLLER et. al., 2009). Contudo, não é possível considerar  
25 as lesões como um sinal clínico característico da infecção, pois animais aparentemente

1 saudáveis podem apresentar anticorpos anti-*L infantum* (FERNÁNDEZ-BELLON et al.,  
2 2006), especialmente quando vivem em áreas endêmicas, expostos à infecção. Os resultados  
3 obtidos com a técnica molecular apontam que todos os equinos identificados com fragmentos  
4 de DNA de *Leishmania* no sangue periférico, com exceção dos animais apreendidos, são  
5 residentes de bairros onde existem notificações de LVC (Tabela 4), sugerindo uma possível  
6 relação de infecção da espécie com contato de cães portadores de LVC.

7 A carência de controles positivos de equinos, devido a insipiência da identificação do  
8 complexo donovani nesta espécie animal, limitou a análise comparativa entre as técnicas  
9 empregadas. Entretanto, com a inexistência de padronização de diagnóstico somada a  
10 constatação da infecção por *Leishmania* sp em equinos, percebe-se a necessidade de  
11 desenvolvimento de novas análises a partir dos achados no trabalho, utilizando diferentes  
12 materiais biológicos dos animais estudados.

13 Não obstante, a presença de reação nas técnicas moleculares indica fortemente a  
14 possibilidade de existência de *Leishmania* nos equinos em regiões consideradas endêmicas do  
15 município.

16

## 17 **CONCLUSÃO**

18 A técnica molecular possibilitou a detecção do gênero *Leishmania* nas amostras de  
19 sangue periférico dos equinos. Embora os testes sorológicos não tenham apresentado  
20 reatividade, os resultados apresentados no experimento indicam a possibilidade de existência  
21 de *Leishmania* sp em equinos de zona urbana na região de Uruguaiana – RS. Este foi o  
22 primeiro relato da infecção na espécie equina na região do extremo oeste do estado do Rio  
23 Grande do Sul.

24

## 1 AGRADecIMENTOS

2 Secretaria Municipal de Saúde de Uruguaiana, Laboratório Central do Estado do Rio  
3 Grande do Sul – LACEN – RS, Polícia Rodoviária Federal, FIOCRUZ – Laboratório de  
4 Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania*.

## 6 COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

7 A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da  
8 Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), sob o número 029-2013. A participação dos  
9 animais teve consentimento prévio dos proprietários através do Termo de Consentimento  
10 Livre e Esclarecido para a coleta de dados e de material biológico.

## 12 REFERÊNCIAS

13 ALMEIDA, A. B. P. F. et al. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on  
14 polymerase chain reaction employing different biological samples. **Diagnostic microbiology  
15 and infectious disease**, v. 76, n. 3, p. 321-324, 2013.

16 ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, v.  
17 7, n. 5, p. e35671, 2012.

18 BIGELI, J. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, W. P. de; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania*  
19 (*Leishmania*) *chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary  
20 aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade  
21 Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 18-23, 2012.

22 CABRAL, A. W. D. Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da  
23 PCR para a detecção de *Leishmania spp*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2007,  
24 56p. **Dissertação**. Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de  
25 Biociências, Campus Botucatu, 2007.

- 1 CERQUEIRA, E. J. L. et al. Experimental infection of *Equus asinus* with *Leishmania chagasi*  
2 Cunha & Chagas, 1937. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6,  
3 p. 695-701, 2003.
- 4 DANTAS- TORRES, F. et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus*  
5 ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, v.106, p.857–860, 2010. DOI  
6 10.1007/s00436-010-1722-4. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus*  
7 ticks from Brazil and Italy
- 8 EL TAI, N. O. et al. *Leishmania donovani*: Intraspecific Polymorphisms of Sudanese Isolates  
9 Revealed by PCR-based Analyses and DNA Sequencing. **Experimental Parasitology**, v. 97,  
10 n. 1, p. 35-44, 2001.
- 11 FEITOSA, F. L. F. et al. Estudo soropidemiológico de leishmaniose em equinos na região de  
12 Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of**  
13 **Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 6, p. 500-502, 2012.
- 14 FERNÁNDEZ-BELLON, H. et. al. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy  
15 horses in Spain. **Veterinary parasitology**, v. 135, p. 181-185, 2006.
- 16 GOMES, A. H. S. et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine  
17 leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 144, p. 234-241, 2007.
- 18 GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology,  
19 diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary parasitology**, v. 18, p. 123-130, 2011.
- 20 KOEHLER, K. et al. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by  
21 *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, v. 109, p. 9-17, 2002.
- 22 KOUAM, M. K. et al. A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*,  
23 *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. **Veterinary**  
24 **parasitology**, v. 170, n. 1, p. 170-175, 2010.



- 1 KUHL, K. et al. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the  
2 *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 1224–1234, 2005.
- 3 LOMBARDI, M. C. et al. Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain  
4 Reaction in wild mammals. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1243-1246,  
5 dezembro 2014.
- 6 MUKHTAR, M. M. et al. Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a  
7 kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. **Transactions of the Royal**  
8 **Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 33-36, 2000.
- 9 MÜLLER, N. et al. Occurrence of *Leishmania sp.* In cutaneous lesions of horses in Central  
10 Europe. **Veterinary parasitology**, v. 166, p. 346-351, 2009.
- 11 RIERA, C. et al. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood  
12 donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic  
13 methods. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p.  
14 102-110, 2003.
- 15 SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. 1989. **Molecular Cloning. A Laboratory**  
16 **Manual**. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 17 SOARES, I. R. et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania)*  
18 *infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania*  
19 *infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3, p.  
20 665-669, 2013.
- 21 SOLANO-GALLEGO, L. et al. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. **Equine**  
22 **veterinary journal**, v. 35, n. 3, p. 320-323, 2003.
- 23 SOUZA, N. P. S. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres  
24 mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de**  
25 **Medicina Tropical**, v.43, n. 3, p. 333-335, mai-jun, 2010.

1 TRUPPEL, J. H. et al. Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic áreas?

2 **PLOS One**, v. 9, n. 4, e93731, 2014.

3

## ANEXO

Tabela 1 - Características dos quatro métodos de PCR utilizados para a detecção de leishmaniose em equinos de zona urbana no município de Uruguaiiana – RS.

Iniciadores	LITSR/LITSV	LITSR/L5.8S	LITSV/L5.8SR	RV1/RV2
Espécie	<i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i>	Complexo <i>L. donovani</i>
Região amplificada	ITS rDNA	ITS1 rDNA	ITS2 rDNA	LT1 kDNA
Tamanho das bandas	1020 pb	320 pb	700 pb	145 pb
Condições do PCR	(El Tai et al., 2001) (Kuhls et al., 2005)	(El Tai et al., 2001) (Kuhls et al., 2005)	(El Tai et al., 2001) (Kuhls et al., 2005)	(Bigeli et al., 2012) (Almeida et al., 2013)
Sequência Iniciadores	5' - CTGGATCATT-TCCGATG-3' 5' - AACTCAGGTCTGTAAAC-3'	5' - TGATACCACTTATCGCACTT-3' 5' - CTGGATCATT-TCCGATG-3'	5' - AAGTCCG-ATAAGTGGTA-3' 5' - AACTCAGGTCTGTAAAC-3'	5' - CTTTCTGGTCCC CGGGTAGG-3' 5' - CCACCTGGCTATTTACACCA-3'

1 Tabela 2 - Análise global do número de ampliações de DNA de *Leishmania* em amostras  
 2 de sangue equino.

3

<i>N</i> =192		Métodos de PCR			
Nº de Animais positivos	Região	Amostras positivas em 1 método	Amostras positivas em 2 métodos	Amostras positivas em 3 métodos	Amostras positivas em 4 métodos
1	Vila Bethânia	1	-	-	-
2	Mascarenhas de Moraes	2	-	-	-
1	Tabajara Brites	-	1	-	-
25	Cabo Luiz Quevedo	17	7	1	-
1	Francisca Tarrago	1	-	-	-
21	União das Vilas	12	7	2	-
8	Apreendidos PRF**	8	-	-	-
16	Salso de Baixo	11	5	-	-
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>52</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>-</b>

4 \*\*Polícia Rodoviária Federal

5

1 Tabela 3 - Resultados da amplificação de DNA de *Leishmania* utilizando quatro métodos de  
 2 PCR em amostras de sangue de equinos provenientes de diferentes regiões do município de  
 3 Uruguaiana - RS.

4

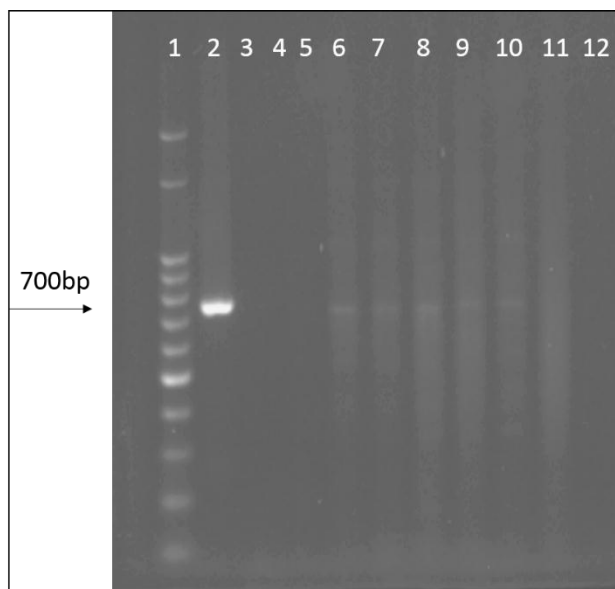
5

<i>N</i> =192		Iniciadores				
Nº de Animais	Região	Notificação de LVC *	LITSR/LITSV Região ITS	LITSR/L5.8S Região ITS1	LITSV/L5.8SR Região ITS2	RV1/RV2 Região LT1
1	Vila Bethânia	Sim	-	-	1	-
2	Mascarenhas de Moraes	Sim	-	-	2	-
1	Tabajara Brites	Sim	-	1	1	-
25	Cabo Luiz Quevedo	Sim	11	2	14	7
1	Francisca Tarrago	Sim	-	-	1	-
21	União das Vilas	Sim	14	-	12	6
8	Apreendidos PRF**	-	-	-	5	3
16	Salso de Baixo	Sim	8	-	8	5
Total	75		33	3	44	21

6 \*Casos de leishmaniose visceral canina notificados pelo Vigilância Sanitária em 2012.

7 \*\* Polícia Rodoviária Federal

8



1  
2

3 Figura 1 – Amplificação de DNA por PCR, eletroforese em gel de agarose (1,8%). Iniciadores LITSV/L5.8SR  
4 (700pb). Linha 1: Marcador molecular 100pb. Linha 2: Controle Positivo *L. infantum* (MOHM/BR/1974/PP7).  
5 Linha 3: Controle negativo (sem DNA). Linha 4-5: Controles negativos equinos região não endêmica. Linhas 6-  
6 12: amostras de sangue periférico de equinos de zona urbana de Uruguiana – RS.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou a verificação da presença de fragmentos de DNA de *Leishmania* sp em equinos de zona urbana do município de Uruguaiana – RS, a qual foi feita através das análises moleculares pela técnica de PCR. Contudo, se faz importante a realização de sequenciamento do fragmento para que se possa confirmar a identidade genética de *Leishmania* sp. Dessa forma, pode-se inferir que embora os animais não tenham apresentado resposta imunológica nos testes de ELISA e TR-DPP, os resultados dos testes moleculares indicam a infecção na espécie. Por ser uma enfermidade relativamente nova na região sul e também pouco conhecida em equinos, existe uma grande carência de conhecimentos sobre a dinâmica da infecção na espécie. Necessitam-se de mais estudos para padronização de técnicas de diagnóstico, incluindo ensaios imunológicos, que auxiliariam em uma análise mais acurada da infecção e permitiriam a realização de inquéritos epidemiológicos na espécie equina. Também seria imprescindível desenvolver estudos para determinar as alterações clínicas e laboratoriais a partir do conhecimento de que a leishmaniose equina pode afetar principalmente animais em regiões endêmicas e em contato com os reservatórios caninos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. B. P. F et al. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 76, n. 3, p. 321-324, 2013.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, Feb. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2004000100043&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2004000100043&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 05 Mar. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2004000100043>.
- ARAUJO, V. A. L. de et al. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. **Parasitology**, v. 140, n. 04, p. 455-460, 2013.
- BARCELOS, C. et al. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 18, n.3, p. 285-304, jul-set 2009.
- BIGELI, J. G.; OLIVEIRA JÚNIOR, W. P. de; TELES, N. M. M. Diagnosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in dogs and the relationship with environmental and sanitary aspects in the municipality of Palmas, state of Tocantins, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 18-23, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. Ed., 5. Reimpr. Brasília: 2006. Ministério da Saúde. 2014. 120p.
- CABRAL, A. W. D. Estudo comparativo entre o diagnóstico por técnicas sorológicas e da PCR para a detecção de *Leishmania* spp. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2007, 56p. **Dissertação**. Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Campus Botucatu, 2007.



CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **il.** Ciclo de vida do protozoário *Leishmania* sp (Adaptado). Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em 06 mar 2015.  
CERQUEIRA, E. J. L. et al. Experimental infection of *Equus asinus* with *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 695-701, 2003.

CEVS – RS - CENTRO ESTADUAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE / CEVS/RS. **Nota técnica** conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina- 26 de julho de 2010. Disponível em<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_tec\\_front\\_br\\_argentina\\_lv\\_final\\_ses\\_r s.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tec_front_br_argentina_lv_final_ses_rs.pdf) >. Acesso em 27 set. 2012.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews/ Microbiology**. v. 5, p. 873-882, 2007.

CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539-543, 1997.

CORTES, 2008 - CORTES, Sofia. **Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal**. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 2008. 163p. Teses (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Biomédicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008. Disponível em:<<http://run.unl.pt/handle/10362/6590>>. Acesso em: 20 mai 2014.

COSTA, T. A. C. et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 212-217, 2010.

COURTENAY, O. et al. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 90, n. 5, p. 498-502, sep-oct, 1996.

COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 128, n. 1-2, p. 149-155, 2005.

\_\_\_\_\_. e LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**. v. 147, p. 320-325, 2007.

CURI, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 99-101, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

EL TAI, N. O. et al. *Leishmania donovani*: Intraspecific Polymorphisms of Sudanese Isolates Revealed by PCR-based Analyses and DNA Sequencing. **Experimental Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 35-44, 2001.

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

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

FIOCRUZ. 1997. **il**. Representação esquemática da forma amastigota (3A) e promastigota (3B) de *Leishmania sp.* Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>. Acesso em 06 mar 2015

GOMES, A. H. de S. Contribuição da reação da polimerase em cadeia no diagnóstico e às ações de vigilância epidemiológica das leishmanioses tegumentar e visceral no Estado de São Paulo. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências. 2008. SÃO PAULO

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

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, september, 2011.

INIESTA, L. et al. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 1137-1141, 2002.

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

KOUAM, M. K. et al. A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. **Veterinary parasitology**, v. 170, n. 1, p. 170-175, 2010.

KUHLS, K. et al. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 1224–1234, 2005.

\_\_\_\_\_. et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 334–343, 2007.

\_\_\_\_\_. et al. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

LIMA, A. C. V. M. da R. “Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil”. TESE DE DOUTORADO. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/SAGF-8HCK3K>, acesso em 20 jan 2015. 2010.

LOMBARDI M.C. et al. Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1243-1246, 2014.

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

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

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **PNAS**, v. 104, n. 22, p. 9375–9380, 2007.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MALTA, M. C. et al. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 169, p. 193-197, 2010.

MANNA, L. et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 125, n. 3, p. 251-262, 2004.

MATOS, H. J. de et al. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 1, p- 65-68, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica conjunta nº 01/2011 – CGDT/ DEVIT/ SUS MS. Esclarecimento sobre a substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasil: Brasília – DF: 2011.

MUKHTAR, M. M. et al. Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 33-36, 2000.

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

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

OTRANTO, D. et al. Toward Diagnosing *Leishmania infantum* Infection in Asymptomatic Dogs in an Area where Leishmaniasis is Endemic. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n. 3, p.337-343, Mar. 2009.

PASSOS, V.M.A. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 72, p. 251-258, 1999.

PAPADOGIANNAKIS, E. et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. **Zoonoses and public health**, v. 57, n. 7-8, p. e23-e25, 2010.

PAZ, G. F. et al. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. v. 106, p. 523-528, 2010.

QUEIROZ, N. M. G. P. de et al., Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR em tedidos cutâneos em associação com RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p-34-40, 2010.

RAVEL, S. et al. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Tropica**, v. 59, n. 3, p. 187-196. 1995;

REUSS, S. M. et al. Autochthonous *Leishmania siamensis* in Horse, Florida, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.9, p.1545-1547, 2012.

ROLÃO, N. et al. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. **Parasite**, v. 12, n. 2, p. 183-186, 2005.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, december, 2014.

ROSAS FILHO, M. S.; SILVEIRA, F. T. Epidemiologia, clínica e imunologia da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de leishmaniose visceral no Pará. **Revista Paraense de Medicina**. v.21, n.3, p.7-18, 2007.

SANTIAGO, M. E. B. et al. An investigation of *Leishmania* spp. In *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary parasitology**, v. 150, n. 4, p. 283-290, 2007.

SANTOS, S. O. dos, et al. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumba, Mato Grosso do Sul State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 633–634, 2003.

SES, SECRETARIA DE SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL. **Nota técnica conjunta nº 01/2014** – CEVS – IPB-LACEN – SES/RS: Dispõe sobre Leishmaniose visceral no Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria de Saúde, Porto Alegre.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 117-143, 1995.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1996.

SILVA, J. P. et al. Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 480-484, 2012.

SOARES, I. R. **Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes para *Leishmania sp.* no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.** Minas Gerais: UFMG, 2012. 132p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-95ZGQZ>>. Acesso em: 13 mar 2014.

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

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. **Equine veterinary journal**, v. 35, n. 3, p. 320-323, 2003.

TARTAROTTI, A. L. et al. Vigilância de Reservatórios caninos. **Boletim Epidemiológico**. Centro Estadual de Vigilância em Saúde – RS. v. 13, n. 1, p. 3-6, março de 2011.

TAVORA, M. et al. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania sp* em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, Aug. 2007 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003786822007000400023&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003786822007000400023&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 22 Mar. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000400023>.

VARGAS-PARADA, L. Kinetoplastids and their networks of interlocked DNA. **Nature Education**, v.3, n. 9, p. 63, 2010. **il**

VEDOVELLO FILHO, D. et al. American cutaneous leishmaniasis in horses from endemic áreas in the North-central mesoregion of Paraná State, Brazil. **Zoonoses and Public Health**. v. 55, p 149-155, 2008.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniases** – Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, Switzerland: WHO Press; (2010). Disponível em: < [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf)> Acesso em: 25 fev 2015.