

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE
EQUINOS SORORREAGENTES PARA
LEISHMANIA SP. NO MUNICÍPIO DE BELO
HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL**

ISABEL ROUSSOULIÈRES SOARES

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG
2012

Isabel Roussoulières Soares

**Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes
para *Leishmania* sp. no município de Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brasil**

Dissertação apresentada à UFMG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Profa. Maristela Silveira Palhares

Co-orientadora: Profa. Maria Norma Melo

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2012**

S676a

Soares, Isabel Roussoulières, 1985-

Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes para *Leishmania* sp. no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil / Isabel Roussoulières Soares. – 2012. 133 p. : il.

Orientadora: Maristela Silveira Palhares

Co-orientadora: Maria Norma Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Inclui bibliografia

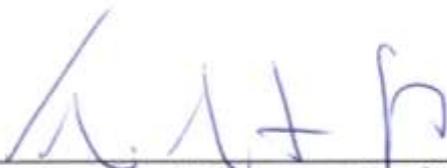
I. Equino – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Leishmaniose – Teses. 3. Teste imunoenzimático – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Palhares, Maristela Silveira. II. Melo, Maria Norma. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.108 96

Dissertação defendida e aprovada em 27 de setembro de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



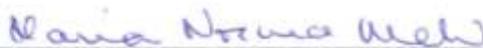
Prof. Maristela Silveira Palhares
Presidente



Prof. Valmir Laurentino Silva



Prof. Renata de Pino Albuquerque Maranhão



Prof. Maria Norma de Melo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus mentores espirituais, os responsáveis pelo encontro e convívio com as pessoas citadas abaixo e pelas oportunidades que me trouxeram até aqui. Com o auxílio da minha religiosidade e da espiritualidade pude me manter tranquila, forte e esperançosa em todos os momentos de desespero e desânimo ao longo do mestrado. Mais uma vez, espero retribuir todas as dádivas que venho recebendo ao longo da vida e que meus anjos continuem me guiando ao melhor caminho.

Agradeço aos meus pais, responsáveis pelas minhas formações acadêmica e pessoal, sem os quais eu jamais alcançaria este título. Agradeço pela construção sempre firme do meu caráter, por sempre acreditarem que eu poderia e por serem meus eternos porto seguros. Ao meu amado irmão, Túlio, agradeço o imenso carinho, confiança e amizade e por ser um abraço sempre tão gostoso!

Às minhas avós, agradeço os conselhos carinhosos e os olhares, apesar de marejados de saudade, confiantes e delicados. Aos meus tios, tias, primos e primas, obrigada pelo incentivo e torcida de sempre. Os e-mails preocupados, as receitas culinárias e as fotos dos eventos familiares me traziam sempre força. Especialmente, ao Tio Zé (*in memoriam*) que apesar de não ver essas conquistas até o fim, sei o quanto se orgulhava e torcia por mim!

Aos meus amigos de sempre, meu eterno Potinho, que ainda sem saberem/compreenderem com o que eu trabalho, sempre me apoiaram e tinham, a qualquer momento, um colo confortável, uma palavra de consolo e esperança e um bom papo para a noite toda... Quanto mais amadureço, mais convicta fico de que os amigos são as “coisas” mais preciosas que podemos ter! Amo vocês.

Aos meus amigos Veterinários fluminenses, que tanto me incentivaram a iniciar essa nova batalha, agradeço a inspiração, as conversas técnicas e os conselhos pessoais! Especialmente Bia, Lobão, Daniel e Maria Pia, vocês foram fundamentais para a concretização deste mestrado. Ao meu eterno orientador, Prof. Felipe Zandonadi Brandão, que tanto me incentivou e torceu para que eu estudasse na UFMG.

Agradeço à Carol e ao Ed, meus pais substitutos em terras mineiras! Agradeço por todo o carinho com que abriram sua casa para mim, pela devoção, pelo auxílio técnico para o concurso e ao longo do Mestrado e pela boa companhia de sempre para uma agradável descontração. Que vocês sejam sempre felizes!

Aos novos amigos mineiros, Betina, Miguel, Nayara e Aton. A oportunidade de conhecer boas pessoas como vocês me enche o coração de esperança de que o Mundo ainda tem solução! Obrigada pela amizade, carinho, confiança, e apoio! Espero vocês em Niterói!

Às minhas novas irmãzinhas, Mi e Lí! Foi muito bom poder contar com o “Boa noite!” receptivo e carinhoso de vocês ao final de um longo dia de trabalho. Gratificante termos aprendido a lição de aceitar os pensamentos e comportamentos diferente sem deixar de nos amarmos por isso! Aprendi demais com o nosso convívio e guardarei lembranças muito gostosas dos nossos almoços de domingo, das louças eternas, do estresse diário, das gargalhadas com os seriados e com as coisas esquisitas da outra e, principalmente das conversas tão construtivas e dos abraços tão carinhos e reconfortantes nos momentos mais difíceis! Obrigada por tudo, tudo mesmo! Agradeço também à Anthara e à Gaia, nossas gatinhas, por me comprovarem mais uma vez o quanto a relação homem/animal é fundamental para nosso equilíbrio.

Agradeço à Rose e à Alessandra, meninas responsáveis pela limpeza dos laboratórios onde executei meus experimentos. Obrigada por manterem meu ambiente de trabalho cheiroso e agradável.

Apesar de curtos dois anos, agradeço aos companheiros de trabalho e eternos amigos da Clínica Médica de Equídeos da Escola de Veterinária da UFMG. Tião, muito obrigada por todo auxílio técnico e por me ensinar a ser mais criativa! Isalto, seu sorriso e disposição sempre me entusiasmavam e davam energia. Obrigada!

Aos “figuras” Filipe e Priscila e ao Luan agradeço pelo carinho, pelas cervejas geladas, pelo importantíssimo apoio técnico, moral e por todas as broncas recebidas! Juízo, galera! Priscila, a você agradeço especialmente. Sem seu incentivo inicial eu não teria vindo! Obrigada por me ensinar a ser mais “relax” com a vida e ao mesmo tempo me fazer mais trabalhadora! Sucesso e felicidade!

Aos demais “filhos da Teca”, Karen, Gertrude, Bira, Cinthia, Roberta e Pati, foi muito bom poder contar com o carinho e todo apoio técnico de vocês. Obrigada por toda ajuda! Karen e Gertrude, obrigada pelo auxílio na tabulação dos dados, pelas risadas e pelos “perrengues”! Cinthia e Bira, valeu por todos os momentos tão variados dentro daquele galpão, sempre divertidos e de aprendizado! Roberta e Pati, vocês são uns doces! Obrigada pela confiança e pelas palavras de incentivo!

Às queridas e lindas residentes, Jackeline Rezende e Ana Luísa Miranda, obrigada pelo auxílio técnico, pelos sorrisos e abraços! Agradeço por serem sempre bons ouvidos e pela força nessa reta final! Jackeline, obrigada, por ser, juntamente com a Mirella, minha *personal stylist*! Foi muito divertido passar esses momentos com vocês!

Aos incansáveis estagiários, bolsistas e membros do Projeto Carroceiros, Raphael, Álvaro, Vitor, Camila, Catiane, Ana, Fernanda, José Wesley, Isabela, muito obrigada! A dedicação e eficiência de vocês foram fundamentais para a realização da minha pesquisa. Além disso, as conversas, as risadas e o companheirismo foram de grande auxílio para nosso trabalho e crescimento. Que vocês continuem assim!

À toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica pelo rico apoio técnico-científico, pelos cafezinhos e pelas conversas descontraídas. Fê, Renatinha, Ana Luísa, Gabi e Mari, obrigada. Agradeço especialmente à professora Adriane Costa-Val pelo enriquecimento do meu projeto quando relatora e à Carol, pela rica troca de informações e pelo apoio com as técnicas laboratoriais.

Agradeço a paciência, os ensinamentos técnicos e o convívio de todos os que me receberam no Laboratório de Biologia de *Leishmania*, Paula, Greg, Nino, Priscila, Rafael, Isabela e Juliana. Agradeço imensamente à Soraia pelo companheirismo e trabalho incansáveis, pelo apoio técnico, pelas conversas e conselhos sobre a vida futura e por todo carinho com que me recebeu. Que Deus ilumine sempre seus caminhos. Os alunos merecem que um dia você se torne professora!

Ao professor Ricardo Wagner Vitor pelas valiosas trocas de informações técnicas e pelo “empréstimo” da Rosa. Rosa, você foi peça fundamental no meu trabalho e lhe agradeço o apoio inigualável, por me ensinar a importância da organização e logística laboratoriais, a prática diária da técnica do ELISA e pelas sábias e carinhosas palavras. Muito obrigada!

Agradeço a todos os docentes da Escola de Veterinária que auxiliaram em meu crescimento técnico e intelectual ao longo desses dois anos. Agradeço de forma especial às Profs. Renata Maranhão e Fabíola Paes Leme, não só como mestres, mas pela amizade e pelo respeito dedicados a mim. A forma como vocês tratam seus alunos e companheiros de trabalho me incentivam a continuar no caminho acadêmico! Profs., muito obrigada pelo carinho e pelos bons momentos em Belo Horizonte.

Agradeço ao professor Múcio Flávio Barbosa Ribeiro do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Ciências Biológicas por ceder, gentilmente, as amostras de soros de potros para utilização em meu experimento. Agradeço também às suas orientadas Júlia e Camila que me receberam com uma solicitude ímpar.

Agradeço aos professores e pesquisadores da ENSP/FIOCRUZ, Valmir Laurentino Silva e Rosemere Duarte pelo treinamento laboratorial, pela troca de informações técnico-científicas e pelo incentivo à continuidade da pesquisa. Muito obrigada.

À querida Professora Maria Norma Melo, minha co-orientadora, que me recebeu com tanto carinho no Laboratório de Biologia de *Leishmania*. Obrigada pela oportunidade, pelo entusiasmo e pelo fundamental auxílio técnico para a concretização desta dissertação.

Finalmente, agradeço à minha orientadora, Profa. Maristela Silveira Palhares. Obrigada por aceitar o desafio deste trabalho e pela confiança devotada a mim. Obrigada por todo crescimento profissional e pessoal que a senhora me proporcionou. Agradeço pela sua orientação meio “maternal”: muito exigente, mas ao mesmo tempo carinhosa e preocupada, preparando seus pupilos para o mundo real. Concluo o mestrado muito mais madura, moral e intelectualmente, e, sem dúvidas, a postura da senhora ao longo desse período foi de grande importância para essa transformação. Muito obrigada. Que muitos outros orientados possam usufruir da mesma experiência que eu tive.

SUMÁRIO

RESUMO	20
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1. Agente etiológico e ciclo biológico	26
2.2. Hospedeiros	28
2.2.1. Hospedeiros invertebrados (vetores)	28
2.2.2. Hospedeiros mamíferos / reservatórios	28
2.3. Epidemiologia	30
2.4. Fisiopatogenia	34
2.5. Manifestações clínicas	35
2.6. Diagnóstico	37
2.6.1. Diagnóstico clínico	37
2.6.2. Exames parasitológicos.....	38
2.6.3. Exames imunológicos.....	40
2.6.4. Exames moleculares: reação em cadeia de polimerase (PCR).....	43
2.7. Prevenção.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Delineamento experimental	47
3.2. Seleção dos animais	47
3.3. Experimento I: Padronização da técnica do Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	49
3.4. Experimento II: Avaliação clínica e laboratorial de equinos com enfoque na infecção por <i>Leishmania</i> sp.	50
3.4.1. Avaliação clínica	50
3.4.2. Avaliação laboratorial	50
3.4.2.1. Hemograma	51
3.4.2.2. Análises bioquímicas	51
3.4.2.3. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	51
3.4.2.4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	52
3.5. Experimento III: Estudo comparativo das técnicas de RIFI, ELISA e PCR.	54
3.5.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	54
3.5.2. Comparação entre o diagnóstico molecular e as técnicas sorológicas.....	55
3.6. Análise estatística	55
3.6.1. Experimento I e III	56
3.6.2. Experimento II	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1. Experimento I: Padronização da técnica do Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	58
4.2. Experimento II – Avaliação clínica e laboratorial de equinos com enfoque na infecção por <i>Leishmania</i> sp.	60
4.2.1. População estudada.....	60
4.2.2. Avaliação sorológica pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)..	61
4.2.3. Avaliação sorológica pela técnica do ELISA	66
4.2.4. Comparação entre as técnicas sorológicas	70
4.2.5. Avaliação clínica	78

4.2.5.1.	Inspeção	78
4.2.5.2.	Índices paramétricos	82
4.2.5.3.	Avaliação clínica das mucosas e linfonodos	83
4.2.6.	Hemograma	85
4.2.6.1.	Eritrograma e plaquetograma	85
4.2.6.2.	Leucograma	87
4.2.7.	Perfil protéico	90
4.2.8.	Bioquímica de sangue	91
4.3.	Experimento III: Estudo comparativo das técnicas de RIFI, ELISA e PCR	94
4.3.1.	Reação em Cadeia da Polimerase	94
4.3.2.	Comparação do diagnóstico molecular com as técnicas sorológicas.....	100
5.	CONCLUSÕES.....	109
6.	PERSPECTIVAS PARA O FUTURO.....	110
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
8.	ANEXOS	129
8.1.	Anexo 1: Carta de consentimento	129
8.2.	Anexo 2: Ficha Exame Clínico	130
8.3.	Anexo 3: Primeira bateria de exames para padronização do ELISA	131
8.4.	Anexo 4: Segunda bateria de exames para padronização do ELISA	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Casos humanos de Leishmaniose Visceral ocorridos no município de Belo Horizonte/MG, por Distrito Sanitário de Residência entre os anos de 2008 e 2011.....	48
Tabela 2-	Percentual de positividade de Leishmaniose Visceral Canina, em Belo Horizonte/MG, nos anos de 2007 e 2008.....	49
Tabela 3-	Valores de probabilidade, no teste de normalidade, brutos e após transformação, para as variáveis dos experimentos II e III e teste estatístico aplicado.....	57
Tabela 4-	Intensidade de concordância para amostras de soro equino na padronização do teste de ELISA.	60
Tabela 5-	Distribuição dos animais amostrados de acordo com as URPVs e Regionais....	62
Tabela 6-	Distribuição dos animais por sexo e regionais, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	62
Tabela 7-	Distribuição das amostras reativas e não reativas pela técnica da RIFI, de acordo com o sexo, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	63
Tabela 8-	Distribuição das amostras reativas e não reativas na RIFI, de acordo com a regional e a diluição do soro, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	65
Tabela 9-	Comparação dos valores médios do índice de reatividade do ELISA, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	66
Tabela 10-	Distribuição das amostras reativas e não reativas no ELISA, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	68
Tabela 11-	Distribuição de amostras reativas, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	70
Tabela 12-	Concordância entre as técnicas sorológicas da RIFI e do ELISA, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	71
Tabela 13-	Distribuição da frequência entre animais sororreagentes e não sororreagentes, independente da técnica sorológica e de acordo com o sexo, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	71

Tabela 14-	Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com as regionais e os grupos, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	73
Tabela 15-	Comparação do comportamento entre os animais não reativos e reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	78
Tabela 16-	Comparação do escore de condição corporal (ECC) entre os animais não reativos e reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp. Belo Horizonte, 2012.....	79
Tabela 17-	Comparação dos animais com ou sem lesão, de acordo com a reatividade, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp. Belo Horizonte, 2012.....	79
Tabela 18-	Comparação dos animais com ou sem lesão, de acordo com a reatividade e técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp. Belo Horizonte, 2012.....	79
Tabela 19-	Comparação dos índices paramétricos entre grupos de animais reativos e não reativos, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	83
Tabela 20-	Comparação dos índices paramétricos entre grupos de animais reativos e não reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	83
Tabela 21-	Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com o exame físico das mucosas, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp. Belo Horizonte, 2012.....	84
Tabela 22-	Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com o exame físico dos linfonodos, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp. Belo Horizonte, 2012.....	85
Tabela 23-	Valores médios (média \pm erro padrão) do eritrograma e da plaquetometria entre os grupos de animais reativos e não reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	86
Tabela 24-	Valores médios (média \pm erro padrão) do eritrograma e da plaquetometria entre os grupos de animais reativos e não reativos, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp. Belo Horizonte, 2012	87

Tabela 25-	Valores médios (média \pm erro padrão) do leucograma entre os grupos de animais reativos e não reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp. Belo Horizonte, 2012	88
Tabela 26-	Valores médios (média \pm erro padrão) do leucograma entre os grupos de animais reativos e não reativos, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp. Belo Horizonte, 2012.....	89
Tabela 27-	Valores médios (média \pm erro padrão) do perfil protéico entre os grupos de animais reativos e não reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	90
Tabela 28-	Valores médios (média \pm erro padrão) do perfil protéico entre os grupos de animais reativos e não reativos, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	90
Tabela 29-	Comparação dos perfis renal e hepático entre os grupos de animais reativos e não reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	93
Tabela 30-	Valores médios (média \pm erro padrão) dos perfis renal e hepático entre os grupos de animais reativos e não reativos, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp. Belo Horizonte, 2012.....	93
Tabela 31-	Distribuição das amostras testadas pela técnica da PCR, com iniciadores para o gênero <i>Leishmania</i> sp., de acordo com as Regionais, em investigação da infecção equina por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	96
Tabela 32-	Características das lesões e exames realizados em pacientes da Clínica de Equídeos da Escola de Veterinária suspeitos para leishmaniose. Belo Horizonte, 2012.....	100
Tabela 33-	Comparação da técnica da PCR, com iniciadores para o gênero <i>Leishmania</i> sp. e a titulação obtida pela técnica da RIFI, em investigação da soroprevalência e infecção equina para <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	101
Tabela 34-	Comparação da técnica da PCR, com iniciadores para o gênero <i>Leishmania</i> sp. e a técnica do ELISA, em investigação da soroprevalência e infecção equina para <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	101

Tabela 35-	Concordância entre a técnica da PCR, com iniciadores específicos para o gênero <i>Leishmania</i> , e as técnicas sorológicas RIFI e ELISA, em investigação da soroprevalência e infecção equina por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	103
Tabela 36-	Concordância entre a técnica da PCR, com iniciadores específicos para o gênero <i>Leishmania</i> , e a técnica sorológica do ELISA, em investigação da soroprevalência e infecção equina por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012..	104
Tabela 37-	Concordância entre a técnica da PCR, com iniciadores específicos para o gênero <i>Leishmania</i> , e a técnica sorológica da RIFI, em investigação da soroprevalência e infecção equina por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Regionais administrativas do município de Belo Horizonte e ilustração (asterisco) das sete regionais selecionadas para o estudo.....	48
Figura 2-	Amostras de soro equino, reativa (A) e não reativa (B) no teste da RIFI utilizando promastigotas da cepa MHOM/BR/75/M2904 em investigação da soroprevalência equina por infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	53
Figura 3-	Iniciadores e seus respectivos alvos utilizados para a PCR de sangue total de equinos, no município de Belo Horizonte, 2012.....	56
Figura 4-	Metodologias utilizadas pela técnica sorológica do ELISA para pesquisa de imunoglobulinas IgG anti- <i>Leishmania</i> sp. em equinos.....	58
Figura 5-	Controle positivo para padronização da técnica do ELISA. (A) Amastigota (seta) de <i>Leishmania</i> sp. em esfregaço por aposição, corado pelo Panótico, de biópsia de lesão em membro posterior de equino; (B) Gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR específico para o complexo <i>L. braziliensis</i> . M: Peso molecular 1 Kb; C+: controle positivo da reação (DNA extraído de cultura da cepa MHOM/BR/75/M2904); C-: Controle negativo da reação (sem DNA); Canaleta 1: material extraído de biópsia das lesões ativas em membro posterior de equino utilizado como controle positivo.....	59
Figura 6-	Frequência das diluições dos soros em amostras reativas na RIFI, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	64
Figura 7-	Distribuição dos animais reativos e não reativos na técnica da RIFI, de acordo com a regional, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	64
Figura 8-	Distribuição das absorbâncias entre as amostras reativas e não reativas no ELISA, separadas por placas de realização (1 a 12), em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	67
Figura 9-	Distribuição dos Índices de Reatividade (IR) entre as amostras reativas e não reativas no ELISA, separadas por placas de realização (1 a 12), em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	67
Figura 10-	Distribuição das amostras reativas e não reativas no ELISA, de acordo com a regional, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.,. Belo Horizonte, 2012.....	68
Figura 11-	Distribuição das amostras reativas e não reativas no ELISA, de acordo com o sexo, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	68

Figura 12-	Reatividade das amostras, de acordo com a regional e a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	70
Figura 13-	Distribuição das amostras reativas e não reativas, independente da técnica sorológica e de acordo com a Regional administrativa, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	72
Figura 14-	Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	72
Figura 15-	Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com sexo e técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção de <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	73
Figura 16-	Lesão sugestiva de leishmaniose. Equino examinado na URPV Delta, na Regional Noroeste, apresentando lesão no chanfro, com formato arredondado, crostosa e com bordas elevadas. Belo Horizonte, 2012.....	80
Figura 17-	Distribuição da localização das lesões encontradas em 34 equinos de tração no município de Belo Horizonte, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	81
Figura 18-	Distribuição das amostras reativas e não reativas, dos animais que apresentavam lesão ao exame clínico, em investigação da soroprevalência equina para infecção por <i>Leishmania</i> sp. de acordo com a técnica sorológica. Belo Horizonte, 2012.....	81
Figura 19-	Gel de poliacrilamida a 5 %, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR específico para o gene da DNA Polimerase de <i>Leishmania</i> sp., em amostras de sangue total de equinos. M: Peso molecular 100 pb; C+: controle positivo da reação (DNA extraído de cultura da cepa MHOM/BR/70/BH46); C-: Controle negativo da reação (sem DNA); Canaletas 1 a 12: Amostras positivas, apresentando amplificação de fragmento de 90bp. Belo Horizonte, 2012.....	95
Figura 20-	Gel de poliacrilamida a 5 %, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR específico para o complexo <i>L. braziliensis</i> , em amostras de sangue total de equinos. M: Peso molecular 1Kb; C+: controle positivo da reação (DNA extraído de cultura da cepa MHOM/BR/75/M2904); C-: Controle negativo da reação (sem DNA); Canaletas 1, 2, 3, 4: Amostras positivas, apresentando amplificação de fragmento de 750bp. Belo Horizonte, 2012.....	95

Figura 21-	Gel de poliacrilamida a 5 %, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR específico para o complexo <i>L. donovani</i> , em amostras de sangue total de equinos. M: Peso molecular 100pb; C+: controle positivo da reação (DNA extraído de cultura da cepa MHOM/BR/70/BH46); C-: Controle negativo da reação (sem DNA); Canaletas 1, 2, 3 e 6: Amostras positivas, apresentando amplificação de fragmento de 100bp. Belo Horizonte, 2012.....	95
Figura 22-	Distribuição das amostras positivas na técnica da PCR para o gênero <i>Leishmania</i> , após repetição com iniciadores específicos para as espécies <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> , em investigação da infecção equina por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	96
Figura 23-	Distribuição dos resultados obtidos pela técnica da PCR, com iniciadores específicos para as espécies <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> , de acordo com as regionais administrativas, em investigação da infecção equina por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	97
Figura 24-	Distribuição dos resultados obtidos pela técnica da PCR, com iniciadores específicos para o gênero <i>Leishmania</i> sp. e para as espécies <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> , de acordo com o sexo, em investigação da infecção equina por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	98
Figura 25-	Reatividade humoral, independente da técnica sorológica, de acordo com o resultado da técnica da PCR de sangue total, em investigação da soroprevalência e infecção equina por <i>Leishmania</i> sp. Belo Horizonte, 2012...	101
Figura 26-	Distribuição das amostras reativas e não reativas, independente da técnica sorológica, de acordo com o resultado da PCR de sangue total, com iniciadores específicos para o gênero <i>Leishmania</i> sp., em investigação da soroprevalência e infecção equina por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012..	102
Figura 27-	Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com a técnica sorológica e de acordo com o resultado da PCR de sangue total, com iniciadores específicos para o gênero <i>Leishmania</i> sp., em investigação da soroprevalência e infecção equina por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012..	102
Figura 28-	Distribuição das amostras de acordo com a positividade nos testes sorológicos e no teste molecular da PCR, com iniciadores específicos para o gênero <i>Leishmania</i> em investigação da soroprevalência e infecção equina por <i>Leishmania</i> sp.. Belo Horizonte, 2012.....	103

LISTA DE ANEXOS

Anexo I -	Carta de consentimento.....	43
Anexo II -	Ficha de Exame Clínico.....	44
Anexo III -	Primeira bateria de exames para a padronização do ELISA.....	52
Anexo IV -	Segunda bateria de exames para a padronização do ELISA.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
bpm	Batimentos por minuto
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
ECC	Escore de Condição Corporal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EP	Erro padrão
FA	Fosfatase alcalina
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
GGT	Gama-glutamyltransferase
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IgG	Imunoglobulina G
IR	Índice de Reatividade
KW	Kruskall-Wallis
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
µg	Micrograma
mL	mililitro
mpm	Movimentos por minuto
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Orto-pheniledamidina
PBS	Salina Fosfatada Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PV-LTA	Programa de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana
PV-LV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
RDW	Grau de anisocitose
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RMBH	Região Metropolitana de Belo Horizonte
rpm	Rotações por minuto
SNK	Student Newman Keuls
TPC	Tempo de Preenchimento Capilar
TRALd	Teste Rápido de Antígeno para <i>Leishmania donovani</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
URPV	Unidade de Recolhimento de Pequenos Volumes
VGM	Volume Globular Médio
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

RESUMO

Avaliou-se a soroprevalência para imunoglobulinas IgG anti-*Leishmania* sp. em equinos de tração de sete regionais administrativas da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Utilizou-se antígeno da cepa MHOM/BR/75/M2904, de *L. (Viannia) braziliensis*, íntegro e inativado à 55°C por oito minutos para a técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e sonicado para o ensaio imunoenzimático (ELISA). A metodologia para o ELISA necessitou de padronização, cujo parâmetro de repetibilidade intralaboratorial revelou índice Kappa de 0,89, representando uma concordância quase perfeita. Não houve diferença ($p>0,05$) na frequência de distribuição de amostras reativas entre sexos e regionais. A concordância entre as técnicas sorológicas foi fraca, com índice Kappa 0,131. A soroprevalência pela combinação de ambas as técnicas foi de 30,48%. A soroprevalência estimada pelo valor preditivo positivo para a técnica da RIFI foi de 47,62%, enquanto para o ELISA, 41,43%. Os aspectos clínicos e clínico-laboratoriais dos grupos reativos e não reativos foram comparados para a detecção de formas assintomáticas, sintomáticas e sub-clínicas, as quais foram confirmadas para a espécie equina. Uma terceira etapa do estudo avaliou a presença do material genético do parasito no sangue periférico dos equinos por meio da PCR. Determinou-se prevalência de 16,22% (24/148) para o gênero *Leishmania* sp., 11,49% (17/148) para *L. braziliensis*, 6,08% (9/148) para *L. infantum* e ainda 4,05% (9/148) de infecção mista. Não houve concordância entre as técnicas sorológicas e a técnica molecular. Os resultados alertam para a importância das leishmanioses equinas tanto na Clínica Médica quanto na possível participação desta espécie mamífera como reservatório das diferentes espécies do parasito.

Palavras-chaves: Leishmaniose; *L. infantum*; *L. braziliensis*; equinos; diagnóstico; sorologia; PCR.

ABSTRACT

This study assessed the seroprevalence for IgG anti-*Leishmania* sp. in drafts horses from seven different administrative departments of the Belo Horizonte's county. The study was carried out with the strain MHOM/BR/75/M2904 of *L. (Viannia) braziliensis* as antigen, intact and inactivated at 55°C for eight minutes for the Indirect Fluorescent Antibody (IFA) test and the promastigotes were sonicated for the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). The methodology for the ELISA required standardization which achieved a Kappa index of 0.89, representing reliable in house reproducibility. No significant differences ($p > 0.05$) in the frequency distribution of reactive samples between genders and regions were detected. The agreement between the serological techniques was poor, with Kappa 0.131. The seroprevalence by combining both techniques was 30.48%. Seroprevalence estimated by positive predictive value for the IFA technique was 47.62%, and 41.43% for ELISA. The clinical and clinical-laboratory testing of reactive and non-reactive groups were compared aiming the detection of asymptomatic, symptomatic and subclinical forms, being the horse subject to present the three forms of infection. A third phase of the study evaluated the presence of genetic material of the parasite in the peripheral blood of horses using PCR test. It was determined prevalence of 16.22% (24/148) for the genus *Leishmania* sp., 11.49% (17/148) for *L. braziliensis*, 6.08% (9/148) for *L. infantum* and even 4.05% (9/148) of mixed infection. There was no correlation between serological techniques and molecular technique. The results emphasizes the importance of equine leishmaniosis in Equine Internal Medicine and as possible mammalian reservoir of different *Leishmania* species.

Keywords: Leishmaniasis; *L. infantum*; *L. braziliensis*; equines; diagnostic; serology; PCR.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, Ross, 1903, pertencentes à família Trypanosomatidae. Apresenta ciclo digenético e, nos hospedeiros vertebrados, é intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear (Bates, 2007). Desencadeia um complexo de doenças com variada sintomatologia e diversidade epidemiológica (Desjeux, 2004). Os principais vetores são do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (Rangel e Lainson, 2003).

De acordo com a espécie de *Leishmania* sp. envolvida, a alteração manifesta-se como uma de duas categorias, visceral ou tegumentar (Lynn e McMaster, 2008), com amplo espectro de manifestações clínicas que abrange desde cura espontânea, em algumas formas tegumentares, à doença fatal na infecção visceral (Convit et al., 1993; Marzochi e Marzochi, 1994).

As leishmanioses constituem um problema de saúde pública em 98 países afetando cerca de 14 milhões de pessoas. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção e doença pelas diversas espécies do parasito (Alvar et al., 2012).

Associadas a índices de pobreza, compõem o grupo das doenças consideradas negligenciadas e estão incluídas entre as seis mais importantes doenças parasitárias do mundo (WHO, 2010).

A incidência anual mundial de novos casos encontra-se em torno de dois milhões, 200 a 400 mil de leishmaniose visceral (LV) e 700 mil a 1,2 milhões de leishmaniose tegumentar (LT) (Alvar et al., 2012).

Mais de 90% de casos de LV se concentram em seis países, Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (WHO, 2010; Alvar et al., 2012). A forma visceral é considerada mais grave com alta letalidade quando não tratada adequadamente. Seus agentes são as espécies do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. No Novo Mundo, como na área do Mediterrâneo, a doença é uma zoonose causada por *L. (L.) infantum* = *L. (L.) chagasi* (Maurício et al., 1999). No Velho Mundo, tal doença é considerada resultante da infecção por *L. infantum*. Entretanto, perfis moleculares têm demonstrado que ambas espécies não apresentam distinção, sendo caracterizadas como a mesma espécie. No presente trabalho aderiu-se a denominação de *L. infantum* seguindo-se a lei de prioridade devido à ordem cronológica de descrição das espécies.

A LV é uma doença crônica, sistêmica, geralmente fatal, quando não tratada (Marsden, 1986). O quadro clínico da LV está associado à desnutrição e à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o que pode aumentar a mortalidade. Crianças são especialmente afetadas pela doença nas regiões endêmicas. A população com menor poder aquisitivo é a mais vulnerável à doença. Apesar de existirem métodos diagnósticos e tratamentos específicos, grande número de pessoas carece de condições para acessar esses procedimentos (Gontijo e Melo, 2004).

A urbanização desta doença ocorreu no Brasil a partir da década de 1980 e Belo Horizonte é um claro exemplo da alteração no padrão epidemiológico. Nos últimos anos, os casos em seres humanos têm aumentado a partir da introdução da doença no município no ano de 1993 e, desde então, tem se observado acelerada expansão da LV na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) e uma baixa capacidade de resolução diagnóstica em seus municípios (Luz et al., 2001; Oliveira et al., 2008).

Na área urbana, considera-se o cão doméstico (*Canis familiaris*) o principal reservatório e fonte de infecção para os flebotomíneos (Silva, 2010). A leishmaniose visceral canina (LVC)

caracteriza-se por doença crônica víscero-cutânea causada por *L. infantum*. Essa zoonose tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães apresenta-se com maior prevalência do que no homem (OIE, 2008).

Com relação aos equídeos, foram detectados, na Europa, episódios de leishmaniose equina causados pela *L. infantum*, apresentando-se com sintomatologia cutânea. Os casos de LV equina foram relatados na Espanha (Solano-Gallego et al., 2003), em Portugal (Rolão et al., 2005) e na Alemanha (Koehler et al., 2002).

Tais relatos apontam para a possibilidade dos equídeos albergarem o agente causador da LV também na América. Corroboram tal hipótese a detecção de testes imunológicos positivos em equídeos de áreas endêmicas para LV no Estado da Bahia (Cerqueira, 2001) e, pela infecção experimental de asininos com *L. infantum* (Cerqueira et al., 2003), quando detectaram formas amastigotas no fígado de dois animais, um ano após a inoculação.

A distribuição de LV se concentra nas Américas, Mediterrâneo, Ásia Ocidental e Central e no Oriente Médio. Setenta a 75% dos casos mundiais se concentram no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã,

Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru (WHO, 2010; Alvar et al., 2012).

Na América, onde a doença é genericamente chamada de leishmaniose tegumentar americana (LTA), é considerada uma doença em expansão onde a ocorrência de casos em regiões não endêmicas tem sido recorrente. No Brasil, a doença representa importante causa de morbidade para a população residente em áreas endêmicas (Marinho Júnior, 2010), sendo dez vezes mais frequente quando comparada à LV (Barroso-Freitas et al., 2009). Apresenta relevantes implicações clínicas (Barroso-Freitas et al., 2009) e é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, seu alto coeficiente de detecção e sua capacidade de produzir deformidades no caso de leishmaniose mucocutânea, com envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico (Gontijo e Carvalho, 2003).

O grande número de espécies de *Leishmania* sp. causadoras de leishmanioses cutâneas e de flebotomíneos vetores permitem a infecção de uma variedade de hospedeiros mamíferos, e a identificação destes é objeto de intenso estudo (Quaresma et al., 2011).

Espécies de animais que garantem a circulação das leishmanioses na natureza

são considerados reservatórios da LTA. Considera-se a interação reservatório-parasito um sistema complexo, na medida em que é multifatorial, imprevisível e dinâmico, formando uma unidade biológica que pode estar em constante mudança (Brasil, 2010).

Por quase 30 anos, as pesquisas em busca do principal reservatório silvestre de *L. braziliensis* foram pouco conclusivas (Brandão-Filho et al., 2003) com necessidade de sua identificação definitiva (Reithinger et al., 2007).

Roedores, edentados, marsupiais e canídeos já foram descritos como hospedeiros sendo considerados como possíveis reservatórios naturais (Arias e Naiff, 1981; Brandão-Filho et al., 1999; Brandão-Filho et al., 2003).

Apesar de ser originalmente associada a habitats de florestas e vegetações primárias, a LTA tem sofrido alterações em seu ciclo de transmissão com expansão para áreas previamente não endêmicas (Desjeux, 2001). O desmatamento desenfreado, a urbanização sem planejamento e o crescente acúmulo de lixo e matéria orgânica na periferia e nos centros urbanos permitiram a domesticação do inseto vetor (Passos et al., 1993; Desjeux, 2004).

A concomitante adaptação do parasito a novos reservatórios, principalmente aos animais domésticos como cães e equinos (Falqueto et al., 1986; Falqueto et al., 1987; Passos et al., 1993; Barbosa-Santos et al., 1994; Sessa et al., 1994; Reithinger et al., 2007), resultou no desenvolvimento de um perfil epidemiológico associado à transmissão peri e intradomiciliar, tanto nas áreas rurais quanto nas urbanas (Passos et al., 1990; Brandão-Filho et al., 1999; Reithinger e Davies, 1999; Desjeux, 2001).

Essas evidências alertam para o maior potencial de dispersão desta enfermidade (Passos et al., 1993) que no ano de 2003 já acometia de forma autóctone todas as regiões brasileiras (Grisard et al., 2000; Passos et al., 2001; Gontijo et al., 2002; Razera et al., 2005; Jesus et al., 2006; Curti et al., 2009).

Em Minas Gerais, na RMBH, com população residente predominantemente urbana, casos autóctones de LTA têm sido registrados pelos órgãos oficiais de saúde desde 1987 (Passos et al., 1990). A enfermidade continua em expansão na capital, sendo caracterizada como uma doença de transmissão urbana e domiciliar (Gontijo et al., 2002; Fantauzzi, 2009; Miranda et al., 2011).

Neste novo perfil epidemiológico, os canídeos, felídeos e equídeos podem

apresentar-se como possíveis reservatórios domésticos (Falqueto et al., 1987; Barbosa-Santos et al., 1994; Uchôa et al., 2001; Madeira et al., 2003; Jesus et al., 2006).

Com relação aos equinos, no Brasil, seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não foi definitivamente esclarecido (Brasil, 2010). Entretanto, na Venezuela, esses mamíferos são considerados reservatório doméstico de *L. braziliensis* (Aguilar et al., 1984; Barbosa-Santos et al., 1994).

No Brasil, a LTA em equídeos tem sido relatada desde os anos 50. Há casos nos Estados do Ceará (Alencar, 1959), da Bahia (Vexenat et al., 1986), do Rio de Janeiro (Aguilar et al., 1986; Aguilar et al., 1987; Barbosa-Santos et al., 1994), do Espírito Santo (Falqueto et al., 1987), de São Paulo (Yoshida et al., 1988), de Pernambuco (Brandão-Filho et al., 2003) e do Paraná (Vedovello et al., 2008). Dentre os casos citados não há padrão clínico característico, sendo descritos nódulos e pápulas, solitários ou múltiplos, lesões ulceradas, proliferativas ou crostosas.

O município de Belo Horizonte conta com extensa classe de trabalhadores denominada carroceiros, responsável pelo transporte e destino correto de grande parte do entulho originado da comunidade representando grande importância sócio-econômica. Essa

atuação estreitou o laço de convivência entre o homem e os equídeos, uma vez que, além do trabalho diário, a maioria destes animais vive em cocheiras junto à casa dos trabalhadores.

Considerando-se a predisposição dos equinos à infecção por *L. braziliensis* e *L. infantum*, a crescente expansão das leishmanioses em seres humanos e caninos na RMBH e a estreita convivência destes hospedeiros com equinos, o presente trabalho baseia-se na hipótese dos equinos serem potenciais hospedeiros reservatórios de *L. braziliensis* e *L. infantum* no município de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais. Desta forma, o estudo apresenta como objetivos a verificação da presença de infecção por estes parasitos em equinos, correlacionando os achados parasitológicos e sorológicos com as avaliações clínica e laboratoriais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Embora a LV tenha sido relatada em equinos em países europeus, na América, os relatos se restringem à *L. braziliensis*. Dessa forma, o presente trabalho e a revisão abordam principalmente esta espécie.

2.1 Agente etiológico e ciclo biológico

O parasito é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, à família

Trypanosomatidae. O gênero *Leishmania*, Ross, 1903, tem ciclo digenético (heteroxênico), apresentando duas formas principais, a promastigota, flagelada e encontrada no tubo digestório do inseto vetor e a amastigota, sem flagelo livre, intracelular obrigatória das células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero (Gontijo e Carvalho, 2003; Lynn e McMaster, 2008).

Dentre as várias espécies, cerca de vinte e duas são causadoras de afecções cutâneas ou viscerais em seres humanos (Gontijo e Carvalho, 2003; Desjeux, 2004). Todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da sub-família Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo, e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Gontijo e Carvalho, 2003).

O inseto vetor se infecta ao ingerir formas amastigotas presentes nas células mononucleadas do hospedeiro mamífero. Essas formas parasitárias transformam-se em promastigotas procíclicas que possuem moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície, permitindo a interação com lectinas intestinais e consequente adesão ao epitélio do tubo digestório, impedindo sua eliminação junto ao alimento. Tais formas evolutivas reproduzem-se no trato digestório dos flebotomíneos e passam pelo

processo de metaciclogênese, transformando-se em promastigotas metacíclicas entre oito e 20 dias (Oliver et al., 2005).

As promastigotas metacíclicas são a forma infectante para o hospedeiro mamífero. São finas, curtas, altamente ativas e com flagelo medindo mais que a metade do comprimento do corpo (Rangel e Lainson, 2003). Já não se reproduzem, sofrendo alterações bioquímicas na superfície, que resultam na perda de capacidade de adesão ao epitélio. Estas formas migram através da válvula do estomodeu para o esôfago, faringe e probóscida, havendo a transmissão no próximo repasto sanguíneo (Sacks e Kamhawi, 2001). São então fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear e no interior das mesmas se diferenciam em amastigotas, forma arredondada sem flagelo livre, dentro dos fagolisossomas e são capazes de proliferar estabelecendo a infecção (Goto e Lindoso, 2010).

Baseado no local em que o parasito se desenvolve no tubo digestório do inseto vetor, o gênero *Leishmania* é subdividido em dois subgêneros. As espécies que se desenvolvem restritamente no trato alimentar anterior até a junção do intestino médio com o posterior, fazem parte do subgênero *Leishmania*, enquanto as

espécies que se desenvolvem tanto no intestino médio quanto no posterior correspondem ao subgênero *Viannia* (Grimaldi Jr e Tesh, 1993), encontrado apenas no Novo Mundo (Gontijo e Carvalho, 2003).

No Novo Mundo, a *L. infantum* corresponde à única espécie causadora da forma visceral, contudo para a forma tegumentar, descrevem-se pelo menos 11 espécies de *Leishmania* como agentes etiológicos da LTA (Grimaldi Jr e Tesh, 1993).

No Brasil já foram descritas sete espécies responsáveis pela LTA, seis do subgênero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi*, *L.(V.) shawi*, *L.(V.) lindenbergi* e uma do subgênero *Leishmania*: *L.(L.) amazonenses*, sendo *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonenses* as mais prevalentes (Lainson, 2010).

L. braziliensis foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da LTA (Vianna, 1911) sendo a mais prevalente, não só no Brasil, mas em toda a América Latina (Gontijo e Carvalho, 2003).

Apresenta ampla distribuição geográfica, estando presente desde os Estados Unidos até o Norte da Argentina e, no Brasil, já foi

descrita em todos os Estados da Federação (Lainson, 2010). Seu ciclo epidemiológico relaciona-se tanto com áreas de colonizações antigas e recentes quanto ao ciclo peri e intra domiciliar, associado à presença de animais silvestres ou domésticos (Passos et al.,1993).

2.2 Hospedeiros

2.2.1 Hospedeiros invertebrados (vetores)

O principal vetor de *L. infantum* é *Lutzomyia longipalpis* que adapta-se facilmente a diversos ambientes e temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos (Silva, 2010). *L. cruzi* tem sido incriminada na transmissão no Mato Grosso do Sul (Santos et al., 1998).

Até o momento como transmissores de *L. braziliensis* foram incriminados: *L. complexa*, *L. whitmani*, *L. migonei*, *L. neivai*, *L. wellcomei*, *L. intermedia* (Lainson, 2010).

Destaca-se que *L. intermedia* tem sido encontrada nos domicílios e anexos, em plantações, principalmente as de subsistência, e em áreas de floresta, sendo a principal espécie incriminada como vetora nos Estados do Rio de Janeiro, de São Paulo e de Minas Gerais (Rangel e Lainson, 2003). Passos et al. (1993) descrevem que

nos ambientes altamente modificados pelo homem, tanto nos não-urbanizados quanto nos domésticos, a espécie *L. whitmani* parece ser a mais bem adaptada, mais prevalente e incriminada como vetor de *L. braziliensis*.

2.2.2 Hospedeiros mamíferos / reservatórios

No Novo Mundo, mais de 40 espécies de mamíferos de várias ordens são conhecidas como sendo hospedeiros de *Leishmania* sp. em diferentes ciclos de transmissão. Contudo, poucas espécies são consideradas como reservatório principal no ciclo de transmissão natural (Grimaldi Jr e Tesh, 1993).

Segundo Ashford (1997), a implicação de um hospedeiro como reservatório é complexa, pois, normalmente, este é específico ao contexto epizoológico local e sua classificação como tal depende de variáveis pouco estudadas, como abundância e distribuição do hospedeiro e infecciosidade ao vetor.

Canídeos domésticos e silvestres (*Cerdocyon thous*; *Lycalopex vetulus*; *Chrysocyon brachyurus*; *Speothos venaticus*) são considerados os mais importantes reservatórios de *L. infantum* na América. Outros estudos demonstram a participação de marsupiais do gênero

Didelphis na manutenção do parasito devido sua habilidade de viver em diferentes habitats permitindo um elo de ligação entre o ciclo silvestre e doméstico da doença. *D. albiventris* e *D. marsupialis* (Sherlock et al., 1988) e *D. aurita* (Carreira et al., 2012) já foram encontrados parasitados no Brasil.

O cão é considerado o principal reservatório doméstico de *L. infantum* tanto em áreas rurais como urbanas. Isso se deve ao alto grau de parasitismo na pele e à grande susceptibilidade à infecção (Harhay et al., 2011).

Entretanto, a importância epidemiológica dos cães no caso da LV zoonótica no Brasil, tem sido tema de intenso debate. Estudos têm evidenciado que a LVC é um fator de risco para a LV humana (Paranhos-Silva et al., 1998) enquanto outros minimizam esta relação ao demonstrarem que a eutanásia em massa de cães soropositivos tem baixo impacto na redução de casos de LV humana em regiões endêmicas do Brasil (Miles et al., 1999; Courtenay et al., 2002).

Os relatos de LV em equinos comprovando a infecção por *L. infantum*, se restringem à Europa (Koehler et al., 2002; Solano-Gallego et al., 2003; Rolão et al., 2005). Fernández-Bellon et al. (2006), em área endêmica da Espanha, determinaram 14,3% (16/112) de cavalos positivos sem alteração

clínica aparente, utilizando a técnica de ELISA (ensaio imunoenzimático) e antígeno de *L. infantum*.

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

Quanto à *L. braziliensis*, já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, endentados e canídeos silvestres (Arias e Naiff, 1981; Brandão-Filho et al., 2003; Lainson, 2010).

Na busca pelos principais reservatórios, os estudos têm focado pequenos mamíferos. No Brasil, foram encontradas evidências de infecção natural de *L. (V.) braziliensis* em várias espécies de roedores dos gêneros *Oryzomys* (Lainson et al., 1981), *Akodon*

(Brandão-Filho et al., 2003), *Holochilus* (Brandão-Filho et al., 2003), *Proechimys* (Lainson e Shaw, 1973), *Rattus* (Brandão-Filho et al., 1994), *Rhipidomys* (Lainson e Shaw, 1973), *Nectomys* (Brandão-Filho et al., 1994), *Bolomys* (Brandão-Filho et al., 1994) e o marsupial *Didelphis* sp. (Lainson e Shaw, 1973).

Nos animais domésticos os registros são crescentes, com relatos de infecção em cães (Marco et al., 2001; Uchôa et al., 2001; Brandão-Filho et al., 2003; Madeira et al., 2003; Jesus et al., 2006), felinos (Schubach et al., 2004) e equinos (Aguilar et al., 1986; Vexenat et al., 1986; Aguilar et al., 1987; Falqueto et al., 1987; Yoshida et al., 1988; Barbosa-Santos et al., 1994; Brandão-Filho et al., 2003; Vedovello et al., 2008) sugerindo um ciclo de transmissão peridoméstico (Lainson, 2010).

Brandão-Filho et al. (2003) sugerem que grande quantidade de espécies sejam potenciais reservatórios, havendo uma oscilação na relevância dos mesmos, de acordo com seus ciclos reprodutivos associados às mudanças climáticas. O pouco conhecimento sobre os reservatórios nas diferentes regiões endêmicas apresenta-se como um fator limitante na compreensão da epidemiologia da LTA (Quaresma et al., 2011).

Outros estudos demonstram que caninos e equídeos podem ser considerados reservatórios de *L. (V.) braziliensis* em ambiente peridoméstico (Aguilar et al., 1989; Reithinger e Davies, 2002; Reithinger et al., 2003).

A ecoepidemiologia da LTA associada à *L. (V.) braziliensis* vem assumindo características distintas no decorrer do tempo nos diferentes biomas do país. Embora o papel desempenhado pelos equinos no ciclo de transmissão ainda não tenha sido bem-definido (Brasil, 2010), o aumento de relatos de casos de lesões por *L. (V.) braziliensis* em equinos domésticos levanta a questão do possível envolvimento deste mamífero na epidemiologia da leishmaniose zoonótica (Gramiccia e Gradoni, 2005).

2.3 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a incidência anual da LV seja em torno de 200 a 400 mil novos casos (Alvar et al., 2006) e de 59 mil óbitos a cada ano, número só superado pelas mortes causadas por malária, no caso das doenças parasitárias (Desjeux, 2004; Alvar et al., 2006;). O número de óbitos anual devido à LV provavelmente é subestimado, tendo em vista que a doença só é notificada compulsoriamente em 33 países em que

ocorre, e que em muitos casos não é diagnosticada como tal (Desjeux, 2004).

O Brasil é o país mais afetado pela LV na América Latina com 90% dos casos humanos, sendo considerado o terceiro maior foco da doença no mundo (Miles et al., 1999; Maia-Elkhoury et al., 2008). A letalidade média no período de 1984 a 2004 foi de 6,3%, entretanto observou-se aumento de 100%, passando de 3,6% em 1994 para 7,4% em 2004 (Maia-Elkhoury et al., 2008).

Atualmente, é apontada como doença re-emergente, caracterizada por nítido processo de transição epidemiológica, apresentando incidência crescente nas áreas onde não ocorria tradicionalmente. A doença, anteriormente restrita à Região Nordeste do país, apresenta atualmente nítida expansão geográfica para os estados mais ao sul do país e franco processo de urbanização em cidades localizadas nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (Maia-Elkhoury, 2008).

No município de Belo Horizonte, o número de casos de LV humana registrados entre os anos de 2008 e 2011 (dados até junho) foi de 536. Quanto aos casos caninos, no mesmo período, 51132 animais foram positivos no inquérito sorológico por RIFI, sendo eutanasiados 42656 (BELO HORIZONTE, 2012).

A urbanização da doença está associada a diversos fatores como o aumento da densidade populacional nos grandes centros urbanos, o agravamento das desigualdades sócio-econômicas, a falta de moradias adequadas e de saneamento básico (Gontijo e Melo, 2004; Harhay et al., 2011). As mudanças antrópicas causadas pelo homem levaram à adaptação dos vetores às áreas suburbanas e urbanas, dificultando as ações de controle.

Quanto à LTA, apresenta-se prevalente desde o extremo sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Brasil, 2010).

No Brasil, é uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores, com diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle (Brasil, 2010).

É considerada, primariamente, uma zoonose apresentando os animais como principais fontes de infecção e o homem como hospedeiro secundário que, até o momento, parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitas na natureza (Gontijo e Carvalho, 2003).

Seu registro anual está entre um e 1,2 milhões de casos mundiais (WHO, 2006). Desjeux (2004) sugere que o número de

casos mundiais é consideravelmente maior do que oficialmente relatado. Tal hipótese considera o fato de que dos 88 países endêmicos, somente 33 apresentam notificação obrigatória, o índice de subdiagnósticos por apresentação assintomática ou diagnóstico diferencial errôneo e os casos confirmados, porém não relatados.

Considerada uma doença em expansão no Brasil representa importante causa de morbidade para a população residente em áreas endêmicas (Marinho Junior, 2010). O número de casos relatados aumentou de 21.800 em 1998 para 40.000 em 2002 (Desjeux, 2004), sendo, em 2003, considerada autóctone em todos os Estados da Federação (Grisard et al., 2000; Passos et al., 2001; Razera et al., 2005; Gontijo et al., 2002; Jesus et al., 2006; Curti et al., 2009; Brasil, 2010).

Considerando-se o indicador densidade de casos de LTA (número de casos/Km²), entre 2001 e 2003, identificou-se 24 circuitos de produção da doença. O maior índice foi o do circuito Pará/Tocantins/Maranhão com 551,84 de casos. O Estado de Minas Gerais está incluído em três destes circuitos. Dois abrangem somente o Estado apresentando densidade de 181,32 e 304,75 e, o circuito

Espírito Santo/Minas Gerais apresenta 236,04 (Brasil, 2010).

Segundo o Ministério da Saúde (MS) do Brasil, um município é considerado endêmico quando há notificação de um ou mais casos autóctones nos últimos dez anos (Brasil, 2010). Tendo sido notificados pelo menos 395 casos autóctones no município de Belo Horizonte entre os anos de 2001 e 2008, essa capital é classificada como endêmica para a enfermidade (Fantauzzi, 2009).

As análises epidemiológicas das últimas décadas apontam para uma alteração no perfil epidemiológico e de transmissão desta enfermidade (Passos et al., 1990; Brasil, 2010) e, oficialmente, o Brasil, considera três padrões epidemiológicos distintos (Brasil, 2010).

O padrão silvestre que, tradicionalmente, considera a LTA uma zoonose de animais silvestres ocorre em ambientes naturais, de florestas e vegetação primária. Acomete o homem de forma acidental, resultado da invasão voluntária a ambientes específicos (Passos et al., 1993; Marzochi e Marzochi, 1994; Brasil, 2010).

Ações antropogênicas como desmatamento desordenado, derrubada de matas e florestas, exploração de madeira, atividades agrícolas e ecoturismo aumentaram o

contato do homem com os insetos vetores, caracterizando um perfil epidemiológico ocupacional ou de lazer, classificando a LTA como antropozoonose (Desjeux, 2004; Brasil, 2010).

Verifica-se ainda, um terceiro perfil, com processo gradual de domesticação da doença em áreas com história de colonização antiga e periurbanas com poucos remanescentes de floresta primária. A ocupação de encostas, os processos migratórios e os aglomerados em centros urbanos, associados a matas secundárias ou residuais, permitem a adaptação dos flebotomíneos vetores ao ambiente peridoméstico e doméstico, havendo ainda a presença de hospedeiros reservatórios secundários facilitando a transmissão (Brandão-Filho et al., 1999; Desjeux, 2001; Brandão-Filho et al., 2003; Brasil, 2010). Esse contexto classifica a enfermidade como uma zoonose de matas residuais e como uma antropozoonose (Brasil, 2010).

Mundialmente, o aumento da incidência de leishmaniose tegumentar está relacionado à invasão a ambientes naturais para desenvolvimento da agricultura, às mudanças ambientais ocasionadas principalmente pelo desmatamento e urbanização não planejada, às migrações de áreas rurais para áreas urbanas, ao trânsito cada vez mais frequente entre áreas

endêmicas e não endêmicas, à progressiva domesticação dos vetores e à adaptação do parasito a novos hospedeiros (Passos et al., 1993; Marzochi e Marzochi, 1994; Brandão-Filho et al., 1999; Desjeux, 2001; Oliveira et al., 2004; Gramiccia e Gradoni, 2005; Brasil, 2010).

Historicamente, a LTA apresenta predomínio na população masculina em decorrência da maior exposição nas atividades rurais. Entretanto, as mudanças ocorridas nos padrões epidemiológicos resultaram em alterações no perfil de transmissão. Nas áreas de ambiente modificado, a transmissão ocorre no ambiente domiciliar, acometendo tanto homens quanto mulheres em proporções semelhantes e todos os grupos etários (Passos et al., 2001; Fantauzzi, 2009; Brasil, 2010).

No Estado de Minas Gerais, os casos de LTA são relatados desde a metade do século com surtos relacionados a desmatamento para construções de estradas e atividades agropecuárias. Na última década, tem-se relatado tanto o perfil de transmissão associado ao caráter ocupacional quanto aos ambientes urbano (Passos et al., 1993; Passos et al., 2001; Fantauzzi, 2009) e intra e peridomiciliar (Luz et al., 2001; Passos et al., 2001; Gontijo et al., 2002; Castro et al., 2005).

Dentre os agentes etiológicos da LTA, *L. braziliensis* apresenta a maior distribuição geográfica. Está presente na América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Paraguai, Peru e Venezuela), América Central (Belize, Guatemala, Nicarágua, Costa Rica, Honduras e Panamá) e México (Lainson, 2010).

No Brasil é o agente etiológico de maior prevalência, com distribuição geográfica em todas as regiões do país, cujas características eco-epidemiológicas e o modo de transmissão se expressam de acordo com as particularidades de cada região (Lainson, 2010).

Leishmaniose cutânea devido à *L. braziliensis* normalmente ocorre em comunidades de colonização antiga nas quais o ciclo infectivo parece envolver animais domésticos como reservatórios e flebotomíneos com habitats peridomiciliares (Queiroz et al., 1994).

2.4 Fisiopatogenia

A inoculação das promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos desencadeia no hospedeiro vertebrado uma resposta inflamatória aguda inespecífica com a ação de células *natural killer*, polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos e do sistema complemento,

destruindo grande parte dos parasitos inoculados (Oliveira et al., 2005).

Estudos descrevem uma resistência aumentada das promastigotas metacíclicas à ação da lise pelo complemento. A presença de substâncias anticoagulantes e peptídeos com poder vasodilatador na saliva do flebótomo potencializam a infecção (Castro-Sousa et al., 2001; Sacks e Kamhawi, 2001).

Moléculas de gp63 e lipofosfoglicano, encontradas na membrana dos parasitos, são responsáveis pela adesão da leishmania à membrana do macrófago e das células de Langerhans, tornando possível a fagocitose e transformação para as formas amastigotas no meio intracelular. Células apresentadoras de antígeno estimulam os linfócitos TCD4⁺, desencadeando o desenvolvimento de linfócitos T “*helper*” (Th) 1 e Th2 (Fearon e Locksley, 1996; Van Zandbergen, et al., 2004; Mattner et al., 2006; Brasil, 2010).

A localização intracelular das formas amastigotas no hospedeiro mamífero determina a ineficácia de anticorpos no controle deste parasitismo. As imunoglobulinas são facilitadoras da infecção, sendo os níveis de anticorpos circulantes diretamente proporcionais à gravidade da doença e à atividade da infecção. Os títulos de anticorpos

específicos são mais altos nas formas graves, como a leishmaniose cutânea difusa e a LV (Brasil, 2010).

2.5 Manifestações clínicas

Em seres humanos, a LV americana é considerada uma doença espectral, cujas apresentações clínicas variam de formas assintomáticas, subclínicas e até o quadro clássico da doença que, no período de estado, é caracterizado pela presença de febre, anemia, hepatoesplenomegalia, manifestações hemorrágicas, além de linfadenomegalia, perda de peso, taquicardia e, menos frequentemente, tosse seca e diarreia. Os sinais e sintomas de desnutrição se desenvolvem com a progressão da doença, incluindo edema periférico, queda de cabelos e alterações de pele e das unhas. Sem intervenção, a doença evolui para o período final com agravamento dos sinais e sintomas descritos sendo frequentes o surgimento de infecções bacterianas graves como pneumonia e sepse, podendo levar o indivíduo ao óbito (Moreno, 2002).

No cão doméstico, a doença é sistêmica e crônica porém, em alguns animais o desenvolvimento pode ser latente, inclusive, evoluindo para cura espontânea (Ferrer, 1999). Classicamente, a LVC pode apresentar um espectro de manifestações clínicas bem variadas, condicionadas

principalmente à imunocompetência do indivíduo. Entre os sinais clínicos mais comuns estão o emagrecimento e as alterações cutâneas. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se com frequência, onicogribose, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, hemorragias intestinais, apatia, anemia, febre, diarreia, vômito, edema de patas, entre outros achados inespecíficos (Silva, 2010). Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por longo período de tempo, sendo a forma assintomática relatada em proporções variando de 40 a 60% (Müller et al., 2009).

Os relatos de LV em equinos se restringem à Europa e não apresentam indícios de acometimento sistêmico. A sintomatologia desta enfermidade na espécie em questão é exclusivamente cutânea, sem padrão característico, sendo descritos nódulos, pápulas, lesões ulceradas, lesões crostosas e regiões de alopecia (Koehler et al., 2002; Solano-Gallego et al., 2003; Rolão et al., 2005). Os estudos realizados no Brasil se restringem à avaliação sorológica (Cerqueira, 2001; Duarte et al., 2001; Vilalobos et al., 2010) não oferecendo indícios da sintomatologia desta espécie nos equídeos.

O espectro de apresentação clínica das leishmanioses tegumentares, em seres humanos, já está bem descrito em três principais formas, sendo leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Convit et al., 1993; Brasil, 2010).

A LCL apresenta-se, normalmente, autolimitante em seres humanos (Marsden, 1986; Desjeux, 2004). Representa a forma simples da afecção e normalmente ocorre em pacientes imunocompetentes (Convit et al., 1993). Entretanto, há casos que evoluem para a forma cutânea disseminada com lesões múltiplas e debilitantes que podem inclusive desencadear um estigma estético nos pacientes (Grimaldi Jr e Tesh, 1993; Desjeux, 2004; Brasil, 2010).

Nas infecções pela *L. braziliensis* a linfadenopatia regional geralmente precede o surgimento de ulcerações por uma a doze semanas (Gontijo e Carvalho, 2003). A lesão inicia-se com uma pápula indolor sobre as partes do corpo expostas à picada do inseto vetor, mais comumente membros inferiores, superiores e face. Esses nódulos evoluem para ulceração característica de formato arredondado, variando de milímetros a centímetros de diâmetro, de fundo crostoso e eritematoso, associada a bordos bem delimitados, elevados e

endurecidos. A partir dessas úlceras ou isoladamente podem surgir lesões vegetantes e verrucosas (Medeiros e Roselino, 1999).

Após alguns meses, a cura pode ser espontânea deixando uma cicatriz. Uma séria complicação da infecção por *L. braziliensis*, descrita em 5% dos pacientes com LCL, é a metástase por via hematogênica ou linfática para as mucosas da nasofaringe levando à LMC (Brasil, 2010).

A LMC é uma forma grave da doença, representa o pólo hiperérgico da enfermidade e em alguns casos pode levar ao óbito (Brasil, 2010). Mutilante e deformante resulta em destruição extensa das cavidades oral e nasal (Grimaldi Jr e Tesh, 1993; Desjeux, 2004; Brasil, 2010) com agravos psicológicos e socioeconômicos (Desjeux, 2004; WHO, 2010). Inicia-se com um edema pustuloso na boca e/ou narinas, podendo ulcerar-se mais tarde estendendo-se à mucosa nasofaríngea. Ocorre posteriormente a destruição da cartilagem nasal e do palato, em consequência da infecção secundária, vasculite e reações tissulares severas (Convit et al., 1993; Medeiros e Roselino, 1999).

A LCD é uma apresentação crônica e progressiva que ocasiona lesões similares à

da hanseníase. Caracteriza o pólo anérgico da enfermidade e ocorre devido a uma deficiente resposta imune mediada por células (Grimaldi Jr e Tesh, 1993; Desjeux, 2004; Reithinger et al., 2007; Brasil, 2010).

Em caninos, a leishmaniose tegumentar é similar à LCL do ser humano, apresentando lesões ulceradas com bordas elevadas que podem progredir em número e extensão. Os locais predominantes são o pavilhão auricular, bolsa escrotal e membros. Assim como no ser humano, o prognóstico normalmente é variável, podendo evoluir para cura espontânea, reativação tardia ou comprometimento de mucosas nasal e oral (Pirmez et al., 1988; Marco et al., 2001). Não há relatos do desenvolvimento da forma difusa da doença nesta espécie mamífera.

Nos relatos de LTA em equinos, as lesões por *L. (V.) braziliensis* não apresentam um padrão clínico característico, sendo descritos desde nódulos e pápulas, solitários ou múltiplos (Vexenat et al., 1986; Falqueto et al., 1987; Barbosa-Santos et al., 1994; Vedovello et al., 2008) à lesões ulceradas, proliferativas ou crostrosas (Barbosa-Santos et al., 1994; Aguilar et al., 1986; Aguilar et al., 1987; Yoshida et al., 1988; Vedovello et al., 2008).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico precoce da doença é uma das principais medidas preventivas. Com o aumento do número de casos clínicos da leishmaniose a cada ano no Brasil, é primordial que os métodos de diagnóstico sejam eficientes, de baixo custo e possam ser realizados nas áreas endêmicas (Guimarães, 1987).

2.6.1 Diagnóstico clínico

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

Quanto à LTA, o diagnóstico clínico é baseado nas características das lesões, associadas ao histórico e à anamnese, nos quais os dados epidemiológicos são de grande importância (Gontijo e Carvalho, 2003; Costa et al., 2009; Mello et al., 2011). A suspeita de LTA comumente ocorre ao serem identificadas lesões compatíveis com as manifestações da doença em pacientes que moram ou viajaram para regiões endêmicas (Mello et al., 2011).

A leishmaniose tegumentar em seres humanos pode desenvolver um amplo espectro de lesões e suas manifestações são comumente confundidas com as de outras doenças, como infecções bacterianas, neoplasias, hanseníases, lúpus eritematoso, trauma local, entre outras (Reithinger et al., 2007).

Tais características torna o diagnóstico clínico complicado e não imediato, fazendo-se necessário um diagnóstico diferencial (Gontijo e Carvalho, 2003; Reithinger et al., 2007; Costa et al., 2009). Assim sendo, os métodos laboratoriais devem ser devidamente explorados para aprimorar o diagnóstico e a escolha do tratamento adequado (Reithinger et al., 2007).

Como auxílio diagnóstico, os exames complementares no ser humano podem apresentar comumente nos casos

confirmados, anemia e leucopenia. Reticulócitos estão normalmente aumentados. Há uma tendência de agranulocitose, monocitose e uma relativa linfocitose. As plaquetas estão moderadamente diminuídas. Nos testes bioquímicos a função hepática está normal e a proteína sérica total é elevada com relação albumina/globulina reversa (Butterworth, 1986).

A albumina é a principal proteína encontrada no soro representando de 35 a 50% do total de proteínas séricas. Apresenta importante papel na pressão coloidosmótica, sendo responsável por 80% da mesma e no transporte de proteínas. Caracteriza uma proteína negativa de fase aguda, apresentando índices diminuídos durante processos inflamatórios ou infecciosos (Eckersall, 2008).

2.6.2 Exames Parasitológicos

Em ambas as formas de leishmanioses, o diagnóstico conclusivo depende da demonstração do parasito ou da detecção de anticorpos, por meio de técnicas de imunodiagnóstico, ou de antígenos do parasito, com a utilização de anticorpos monoclonais, e técnicas de biologia molecular (Moreno, 2002). Dessa forma, o diagnóstico laboratorial da leishmaniose se constitui fundamentalmente de três grupos

de exames, os parasitológicos, os imunológicos e os moleculares.

A demonstração do parasito pode ser realizada por meio de exames direto ou indireto (Reithinger et al., 2007), sendo o diagnóstico definitivo dependente da identificação de amastigotas em tecido ou promastigotas em meio de cultura (Gontijo e Carvalho, 2003).

Para demonstração direta do parasito são utilizados os procedimentos de biópsia e punção aspirativa (Brasil, 2010). Realizam-se os exames de microscopia direta, do *imprint* da biópsia e do esfregaço do aspirado, corados sobretudo pelo Giemsa e exame histológico do fragmento do órgão eleito (Escobar et al., 1992).

A microscopia direta é o procedimento de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e de fácil execução (Gontijo e Carvalho, 2003). Apesar de 100% de especificidade, a sensibilidade desse método é baixa e altamente variável. O isolamento *in vitro* por meio da cultura é provavelmente o método indireto mais informativo, pois além da confirmação do agente etiológico, permite posterior identificação e caracterização da espécie envolvida (Reithniger et al., 2007).

Outro procedimento para demonstração indireta do parasito é o isolamento *in vivo*

por meio de inoculação em animais. O material obtido por biópsia ou raspado de lesão é triturado em solução salina estéril e inoculado via intradérmica, no focinho e/ou patas de animais de laboratório, sobretudo hamster (*Mesocricetus auratus*). As lesões no hamster em geral desenvolvem-se tardiamente, a partir de um mês. Esses animais devem ser acompanhados por três a seis meses. Pela complexidade e alto custo, esse método é pouco utilizado, apesar de apresentar elevada sensibilidade entre os demais métodos parasitológicos (Brasil, 2010).

Na LV, o diagnóstico parasitológico fundamenta-se na demonstração do parasito por meio de punção de medula óssea, baço ou fígado, visto que são os órgãos mais intensamente parasitados em humanos. Para os cães, além destes órgãos também utiliza-se a punção de gânglios ou biópsia de pele. Tais métodos, apesar de simples, são invasivos, além de apresentarem baixa sensibilidade (Moreno, 2002).

Na LTA, o exame parasitológico da lesão deve ser sempre o método de escolha primário para confirmar o diagnóstico clínico (Szargiki, 2005), sendo o padrão ouro devido a sua alta especificidade (Reithinger et al., 2007). Entretanto, a detecção de formas amastigotas do parasito nos *imprints* de lesões apresenta baixa

sensibilidade. A cultura e a inoculação em animais de laboratório são onerosas e demandam tempo, além de apresentarem as desvantagens de contaminação bacteriana e demora no desenvolvimento do parasito (Szargiki, 2005).

2.6.3 Exames imunológicos

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

Por serem mais rápidos, menos invasivos e permitirem utilização em grande escala, os exames sorológicos apresentam vantagens nos estudos epidemiológicos que visam o controle da doença em áreas endêmicas (Szargiki, 2005) e em pesquisas para

triagem e determinação de reservatórios (Zovein et al., 1984).

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

Diferentes trabalhos demonstraram altos índices de sensibilidade e especificidade para a RIFI em regiões endêmicas para a LV (Mancianti et al., 1995, Mettler et al., 2005, Maia et al., 2009). Esta técnica não necessita de elevado nível de infraestrutura, sendo o microscópio de fluorescência e o treinamento da mão-de-obra as maiores exigências. Dessa forma, esta técnica tem sido bastante utilizada como teste sorológico de escolha para o diagnóstico da LVC em diversos municípios brasileiros (Brasil, 2011).

O teste ELISA é considerado um importante avanço tecnológico para o diagnóstico da LV, pois permite a avaliação de um grande número de amostras em um curto espaço de tempo, seu protocolo pode ser facilmente adaptado para a utilização de diferentes antígenos e a leitura dos resultados é automatizada.

A utilização das técnicas sorológicas de RIFI e ELISA em inquéritos epidemiológicos da LVC apresenta taxas de sensibilidade e especificidades variadas, de acordo com o desenho utilizado no estudo. Há variações no padrão ouro utilizado, na escolha dos controles positivo e negativo, na prevalência da doença na região, no antígeno e no método empregado nas reações (Oliveira et al., 2005; Brasil, 2011).

Lira et al. (2006) demonstraram aumento da sensibilidade e diminuição da taxa de falsos positivos, quando da utilização paralela dos kits de Bio-Manguinhos/Fiocruz, primeiro com triagem pelo método de ELISA, seguido de confirmação pela RIFI. Assim, esta foi a recomendação do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) do MS até o ano de 2011.

Visando a validação do protocolo recomendado e, ainda, a avaliação do teste rápido imunocromatográfico (TR-DPP), idealizado por de Bio-Manguinhos/Fiocruz, o MS encomendou um estudo à Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, no qual analisou-se o painel sorológico de 1600 cães, oriundos de quatro municípios endêmicos e de quatro regiões diferentes do país. O relatório final apresentou índices de sensibilidade e especificidade dentro do esperado para o protocolo recomendado.

Entretanto, o cenário que utilizou o TR-DPP para triagem, seguido de confirmação pelo ELISA demonstrou melhor acurácia. Associando estes índices à fácil e simples operacionalização do TR-DPP e à automatização do ELISA, que permite a eliminação da subjetividade da RIFI, este protocolo é o atual recomendado pelo MS para diagnóstico da LVC (Brasil, 2011).

Na LTA, de uma forma geral os títulos de anticorpos são baixos, ressaltando-se que *L. braziliensis* induz uma maior reposta de anticorpos comparada com outras espécies responsáveis pela LTA (Romero et al., 2005).

Ainda não há um teste comercial disponível para a realização da técnica de ELISA para as leishmanioses tegumentares e, o MS recomenda sua utilização somente em pesquisas (Brasil, 2010).

Entretanto, os estudos têm apontado para bons índices de acurácia, suportando a recomendação deste teste como importante ferramenta diagnóstica (Romero et al., 2005; Szargiki, 2005; Barroso-Freitas et al., 2009).

No entanto, quando aplicado em estudos epidemiológicos na LTA, a especificidade do ELISA pode tornar-se baixa, devido à ocorrência de reações inespecíficas (Uchôa et al., 2001). Um dos problemas de acurácia

dos testes sorológicos em tal enfermidade está na gama de agentes etiológicos. Muitos esforços têm sido feitos na determinação de um antígeno que aumente os parâmetros estatísticos dos testes. Um passo nessa direção é a utilização de antígenos homólogos, de acordo com a epidemiologia da área afetada (Szargiki, 2005).

Szargiki et al. (2009) e Barros-Freitas et al. (2009) recomendam, para *L. braziliensis*, a utilização do antígeno específico no teste de ELISA como ferramenta diagnóstica nos casos suspeitos de LTA em áreas endêmicas. Quando aliado ao teste de imunofluorescência indireta, obtêm-se resultados com maior sensibilidade diagnóstica (Romero et al., 2005; Barroso-Freitas et al., 2009).

A revisão de literatura do presente trabalho não detectou estudos que utilizassem a técnica do ELISA para detecção de LTA em equinos. No Brasil, Duarte et al. (2001), na busca por resposta humoral contra *Leishmania* sp., realizou levantamento com *L. major*-like, cepa jof. Cerqueira et al. (2003) inocularam experimentalmente *L. infantum* em asininos e durante o acompanhamento utilizaram o ELISA com antígeno homólogo. Na Europa, onde houve surto epidêmico de leishmaniose equina com sintomatologia cutânea causada por *L. infantum*, Koehler et al. (2002), Solano-

Galego et al. (2003) e Fernández-Bellón et al. (2006) também realizaram o ELISA, todos com cepa de *L. infantum*. Entre os trabalhos, há discrepância na metodologia utilizada, não havendo homogeneidade nem na concentração de antígeno nem na diluição do soro.

Na LTA, dentre os métodos sorológicos, a RIFI é o mais utilizado. Representa uma técnica sensível, com a desvantagem de apresentar no ser humano reações falso-positivas em pacientes com outras doenças como LV, doença de Chagas, esquistossomose, pênfigo foliáceo, blastomicose, esporotricose e em indivíduos sadios provenientes de áreas endêmicas (Brito et al., 2000; Gontijo e Carvalho, 2003; Brasil, 2010).

O MS do Brasil admite que, em um caso individual, a RIFI poderia ter limitado valor diagnóstico e, não dever ser utilizada como critério isolado para diagnóstico de LTA. Nos casos sem demonstração de qualquer agente etiológico a acurácia diagnóstica está melhor representada quando associada à IDRM ou à técnicas parasitológicas, auxiliando o diagnóstico diferencial (Brasil, 2010). Além disso, Barroso-Freitas et al. (2009) apontam como desvantagem deste teste a necessidade de um técnico bem treinado à leitura.

Entretanto a simplicidade na execução e o baixo custo são vantagens expressivas da utilização de testes sorológicos como métodos diagnósticos e de triagem em áreas onde a biópsia e a histopatologia apresentam-se inviáveis (Barroso-Freitas et al., 2009).

Segundo o MS, nas lesões ulceradas por *L. braziliensis*, a sensibilidade da RIFI está em torno de 70% no primeiro ano da doença (Brasil, 2010).

A literatura aponta valores variáveis. Em estudo realizado na Região Metropolitana de Belo Horizonte, Passos et al. (2001) determinaram uma positividade de 79,3% (265/334) na RIFI, utilizando o título de 1:80 em pacientes com apresentação clínica. Romero et al. (2005), também em indivíduos doentes, demonstraram sensibilidade de 79,6%. Tais autores, entretanto não utilizaram antígenos homólogos para realização dos testes diagnósticos.

Trabalhando com a cepa de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), com antígeno de promastigotas intactas cultivadas em laboratório, Szargiki (2005) e Barroso-Freitas et al. (2009) obtiveram, para a RIFI, parâmetros descritivos de 91,7% e 81,5% de sensibilidade e 100% e 86,2% de especificidade, respectivamente.

Desta forma, esta é uma dificuldade apresentada por este método já que algumas espécies de *Leishmania*, como a *L. braziliensis*, são de difícil manutenção em cultivo. Antígenos recombinantes podem ser utilizados como alternativa nesses casos, sendo sua vantagem a obtenção de um produto de antígenos mais padronizado e uniforme (Goto e Lindoso, 2010).

Em relação aos casos equinos, Barbosa-Santos et al. (1994) relatam um caso de LMC em égua, por meio de diagnóstico clínico, direto e sorológico. A RIFI apresentou títulos de 1:320 durante a fase aguda da doença e 1:80, 11 meses após a cura clínica.

2.6.4 Exames moleculares: reação em cadeia de polimerase (PCR)

A presença do parasito nas lesões pode ser escassa e de grande dificuldade de detecção. Dessa forma, os métodos convencionais de pesquisa direta apresentam variável sensibilidade e, as técnicas de biologia molecular apresentam maior sensibilidade (Yarbu e Premoli de Percoco, 1999; Reithinger e Dujardin, 2007).

Como o comportamento das cepas de *Leishmania* é bastante diferente em relação à biologia e à evolução do quadro clínico, o diagnóstico molecular apresenta ainda a

vantagem de especificar o subgênero ou a espécie, permitindo melhores decisões no tratamento e nas medidas preventivas (Yarbu e Premoli de Percoco, 1999; Faber et al., 2003).

Os métodos moleculares têm sido amplamente desenvolvidos na última década e apesar de diferentes métodos moleculares apresentarem bons resultados para o diagnóstico das leishmanioses, a PCR é mais apropriado (Reithinger et al., 2007). Este método apresenta 100% de especificidade e permite um aumento na sensibilidade de 20-30% nos casos de LCL e de 55-70% na leishmaniose mucocutânea, quando comparado com os métodos parasitológicos convencionais (Reithinger e Dujardin, 2007).

O custo elevado e a necessidade de infraestrutura laboratorial específica e mão de obra especializada não permitem, ainda, a ampla utilização destes métodos diagnósticos no campo, entretanto, têm sido explorados exaustivamente em pesquisas na última década (Reithinger e Dujardin, 2007; Brasil, 2010).

2.7 Prevenção

Apesar do aumento da incidência mundial, mas por raramente serem fatais, as leishmanioses cutâneas estão incluídas no grupo das doenças negligenciadas, havendo

pouco interesse dos órgãos financiadores, autoridades de saúde pública e profissionais na implementação de atividades de pesquisa, prevenção e controle da doença (Reithinger et al., 2007).

Além de negligenciada pelas autoridades de saúde e pelos centros de pesquisas, a LTA acaba sendo subestimada também pela própria população acometida. Devido à característica da doença de muitas vezes apresentar pouca repercussão sem sérias sequelas e grande prevalência de casos subclínicos e/ou cura espontânea, a preocupação da população é mínima (Passos et al., 1993).

Esforços deveriam ser concentrados para o diagnóstico precoce, tratamento adequado e, sobretudo, controle da antropozoonose por meio da vigilância epidemiológica (Fantauzzi, 2009).

Propõe-se a vigilância e o monitoramento em unidades territoriais, definidas como áreas de maior produção da doença, bem como, suas características ambientais, sociais e econômicas, buscando um conhecimento amplo e intersetorial com estratégias de controle flexíveis, distintas e adequadas a cada padrão de transmissão (Brasil, 2010).

Com a finalidade de diagnosticar e tratar precocemente os casos detectados, o

Programa de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (PV-LTA) tem como objetivos específicos identificar e monitorar unidades territoriais de relevância epidemiológica, investigar e caracterizar surtos, monitorar formas graves com destruição de mucosa e identificar precocemente os casos autóctones em áreas consideradas não-endêmicas. O número de casos em áreas de transmissão domiciliar também é um foco de atenção e, objetiva-se a investigação epidemiológica e adoção de medidas de controle pertinentes a esse modelo (Brasil, 2010).

Para Desjeux (2004), além da detecção e tratamento dos casos, as principais estratégias de controle da leishmaniose tegumentar devem abranger o controle dos vetores, dos reservatórios e a diminuição do contato homem-vetor.

O objetivo geral da vigilância epidemiológica do PV-LTA é levantar as informações de caráter quantitativo e qualitativo sobre os flebotomíneos em áreas de transmissão, bem como naquelas sem transmissão, de forma a obter novos conhecimentos da bioecologia das espécies de flebotomíneos de importância médico-sanitária. Dessa forma, atua com a finalidade de conhecer as espécies de flebotomíneos nas novas áreas de transmissão de LTA no ambiente antrópico,

estabelecer curvas de sazonalidade para as espécies de flebotomíneos de importância médico-sanitária e monitorar as alterações de comportamento das principais espécies de flebotomíneos em relação aos seus ecótopos naturais (Brasil, 2010).

Devido aos custos operacionais, tempo e mão de obra necessários, aliado ao fato da leishmaniose cutânea não ser uma doença fatal, as estratégias de prevenção e controle têm sido baseadas no tratamento da doença humana e muito pouco no controle e eliminação de vetores e reservatórios (Reithinger et al., 2007).

No caso de transmissão peri e intradomiciliar, o controle dos vetores pode ser realizado pelo uso *spray* inseticida com poder residual e de telas protetoras. No caso das leishmanioses cutâneas, o controle de reservatórios pode ser realizado com iscas envenenadas objetivando roedores e pela manutenção dos ambientes limpos (Desjeux, 2004).

No Brasil, não há recomendações de ações objetivando a vigilância dos hospedeiros e reservatórios, nem de animais silvestres nem de animais domésticos. A prevenção e o controle da doença são difíceis devido à complexidade epizoológica das leishmanioses cutâneas e das poucas opções disponíveis para um efetivo controle do vetor (Reithinger et al., 2007). No Brasil, o

controle químico contra vetores está preconizado quando da ocorrência de mais de um caso humano de LTA, num período máximo de seis meses, em áreas novas ou em surto, associado a evidências de que a transmissão venha ocorrendo no ambiente domiciliar ou ainda, quando houver a ocorrência de casos humanos de LTA na faixa etária inferior a 10 anos (Brasil, 2010).

Na LV, as medidas de controle indicadas pelos Órgãos de Saúde Pública são a busca ativa dos casos humanos para rápido diagnóstico e tratamento, o uso de inseticidas de ação residual para combate aos vetores adultos e, o diagnóstico e eutanásia dos cães soropositivos, medida esta nem sempre bem aceita devido as reações diagnósticas detectarem cães que nem sempre estão com LVC (Silva et al., 2011). O programa de controle da LV no Brasil se iniciou na década de 50 e seu objetivo principal era romper os elos epidemiológicos da cadeia de transmissão da doença. Entretanto, os procedimentos de controle adotados têm sido questionados com base na falta de evidências da redução da incidência da LV humana no país. Diante disso, o MS e a Fundação Nacional da Saúde convocaram um comitê de especialistas para reavaliar o programa e redirecionar as estratégias de controle

(Costa e Vieira, 2001). Essa análise vem sendo direcionada com base em argumentos respaldados na literatura especializada e em aspectos operacionais como a falta de padronização dos métodos diagnósticos para a LV humana e canina, discordância entre a eliminação de cães soropositivos e a prevalência da infecção humana, necessidade da comprovação da existência de outros reservatórios além do cão, como marsupiais e canídeos silvestres, pouco entendimento sobre os reais efeitos das ações de combate ao vetor e possível existência de formas de transmissão sem a participação de flebotomíneos. Duas vacinas para cães estão comercialmente disponíveis, mas nenhuma mostrou suficientemente segura para prevenir a infecção dos animais. O uso de coleiras impregnadas com deltametrina tem mostrado redução no risco de infecção e tem sido aconselhado para controle da infecção dos cães (Chappuis et al., 2007).

Medidas propostas e úteis para ambas as formas de leishmanioses são o destino adequado do lixo orgânico e a limpeza periódica dos abrigos de animais domésticos, de crucial importância na diminuição da aproximação de mamíferos comensais, como marsupiais e roedores, prováveis fontes de infecção para os flebotomíneos. Sugere-se ainda a

manutenção de animais domésticos distantes do intradomicílio durante a noite, de modo a reduzir a atração dos flebotomíneos para este ambiente (Brasil, 2010).

O MS incentiva ainda medidas para os ambientes individuais ou coletivos a fim de evitar os riscos de transmissão, tais como o uso de repelentes quando exposto a ambientes onde os vetores habitualmente possam ser encontrados, evitar a exposição nos horários de atividades do vetor, uso de mosquiteiros de malha fina, bem como a telagem de portas e janelas. Com a finalidade de alterar as condições do meio que propiciem o estabelecimento de criadouros para formas imaturas do vetor, indica-se manejo ambiental por meio de limpeza de quintais e terrenos e a poda de árvores de modo a aumentar a insolação (Brasil, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) sob número 188/2012.

3.1 Delineamento experimental

O estudo foi descritivo e transversal e avaliou-se a correlação entre a presença de

infecção por *Leishmania* sp. e as alterações clínicas e laboratoriais em equinos no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

3.2 Seleção dos animais

Os animais selecionados para o estudo pertencem aos carroceiros cadastrados no Projeto de Extensão “Correção Ambiental e Reciclagem com Carroceiros de Belo Horizonte”. Os proprietários assinaram uma carta de consentimento permitindo a utilização das informações oriundas do seu animal em pesquisas da UFMG (Ver em ANEXO1). Por falta de acesso aos dados epidemiológicos referentes à leishmaniose em equídeos, foram aproveitados os números disponíveis em relação à LV em seres humanos e caninos (BELO HORIZONTE, 2012) para a determinação das Unidades de Recolhimento de Pequenos Volumes (URPV) a serem incluídas no estudo (Fig. 1). Associando tais prevalências, foram selecionadas sete regionais de maior prevalência (Tab.1 e 2). Após a escolha das regionais foram amostrados, de forma aleatória, 210 animais, totalizando 30 por regional. As coletas foram realizadas no período entre agosto de 2011 e junho de 2012.

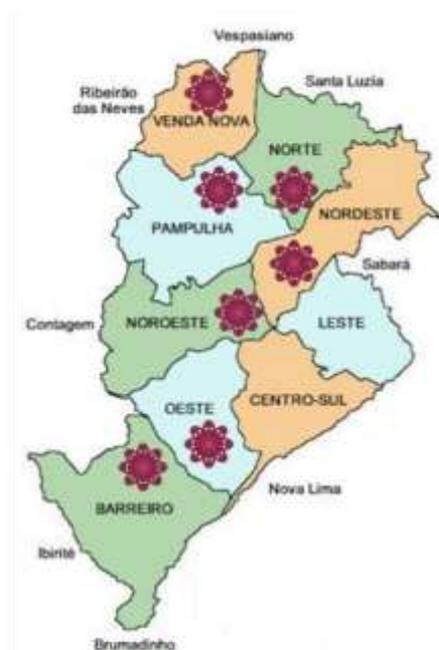


Figura 1: Regionais administrativas do município de Belo Horizonte e ilustração (asterisco) das sete regionais selecionadas para o estudo. Fonte: Adaptado de Belotur.

Tabela 1: Casos humanos de Leishmaniose Visceral ocorridos no município de Belo Horizonte/MG, por Distrito Sanitário de Residência entre os anos de 2008 e 2011.

Distrito/Ano	2008	2009	2010	2011	TOTAL	População	%
Barreiro	10	13	19	10	52	262.194	0,000198
Centro sul	9	7	2	6	24	260.524	0,000092
Leste	16	8	16	12	52	254.573	0,000204
Nordeste	41	17	25	11	94	273.892	0,000343
Noroeste	29	24	15	12	80	360.000	0,000222
Norte	13	20	11	10	54	193.764	0,000279
Oeste	9	16	18	9	52	268.124	0,000194
Pampulha	5	7	9	5	26	141.853	0,000183
Venda nova	25	25	13	15	78	245.334	0,000318
Indeterminado	4	11	6	3	24	-	-
Total	161	148	134	93	536	2.260.258	0,000237

Fonte: Adaptado de: Gerência de Epidemiologia e Informação GEEPI/SMSA (Belo Horizonte, 2012).

Tabela 2. Percentual de positividade de Leishmaniose Visceral Canina, em Belo Horizonte/MG, nos anos de 2007 e 2008.

Distrito/Ano	2007	2008	Média
Barreiro	7,3	8,3	7,8
Centro Sul	3,7	3,9	3,8
Leste	8,8	6	7,4
Nordeste	10,3	9,1	9,7
Noroeste	9,3	7,8	8,55
Norte	10	7,1	8,55
Oeste	8,2	6,8	7,5
Pampulha	9,4	7,1	8,25
Venda Nova	11,5	8,3	9,9
Belo Horizonte	9,3	7,63	8,465

Fonte: Adaptado de: Gerência de Epidemiologia e Informação GEEPI/SMSA (Belo Horizonte, 2012).

3.3 EXPERIMENTO I: Padronização da técnica do Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Realizaram-se 24 combinações variando-se a concentração do antígeno em 1µg/mL, 2,5µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL, a diluição do soro em 1:400 e 1:800 e a titulação do conjugado em 1:10000, 1:20000 e 1:30000. Cinco animais foram submetidos às 24 técnicas, sendo dois controles positivos e três potros de 24 horas de vida como controles negativos.

Calculou-se o S/N (*signal-to-noise*), razão entre as médias das absorbâncias dos controles positivos e negativos (Rajasekariah et al., 2001). As combinações que apresentaram maiores SN foram submetidas a um cálculo hipotético do ponto de corte (*cut-off*), sendo este a média

das absorbâncias dos negativos acrescida de três desvios padrões. Após a determinação da melhor combinação antígeno/soro/conjugado, foi necessária a confirmação de repetibilidade confiável da técnica. Para isso, foram testadas 69 amostras em triplicata e o resultado avaliado pelo teste de concordância do Kappa.

Os controles positivos se mantiveram os mesmos e aos negativos foram acrescentados mais três potros, totalizando dois de 48 horas e quatro de 24 horas de vida. O ponto de corte foi calculado como a média da absorbância dos controles negativos mais três desvios padrões e esse cálculo foi realizado para cada placa separadamente. Para critério diagnóstico foi utilizado o índice de Reatividade (IR), razão entre a média da absorbância do soro teste pelo

cut-off. Animais com IR maior que um eram considerados positivos.

3.4 EXPERIMENTO II: Avaliação clínica e laboratorial de equinos com enfoque na infecção por *Leishmania* sp..

Para a análise da soroprevalência de imunoglobulinas anti-*Leishmania* sp. nos equinos do município de Belo Horizonte, calculou-se o número amostral a partir da fórmula sugerida pelo Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZOO, 1973):

$$n = \frac{p \cdot (100 - p) \cdot z^2}{(d \cdot p/100)^2}$$

Onde: n = número amostral

p = prevalência esperada

d = erro esperado

z = grau de confiança

Baseando-se em análise prévia, realizada com o kit Bio-Manguinhos/Fiocruz¹, na qual analisaram-se 257 equídeos do município de Belo Horizonte (Soares et al., 2012), a prevalência esperada (p) foi de 63%. Trabalhou-se com erro esperado (d) de 11% e grau de confiança (z) de 95%. Dessa forma o número amostral deveria ser 186 animais. Distribuindo este número pelas sete regionais selecionadas, resultaria

em 27 animais. Optou-se então pela padronização de 30 animais/regional, totalizando assim 210 amostras.

As amostras foram analisadas por meio dos exames laboratoriais do eritrograma, leucograma e perfis renal e hepático, além dos exames sorológicos da RIFI e do ELISA. Dentre esses animais, 79 foram submetidos ao exame clínico.

3.4.1 Avaliação Clínica

Setenta e nove (79) animais foram submetidos ao exame clínico o qual foi procedido de acordo com (Speirs, 1997), avaliando-se o estado geral do animal, escore de condição corporal (ECC), comportamento e os índices paramétricos: temperatura retal (°C), frequência cardíaca (bpm), pulso (bpm), tempo de preenchimento capilar (segundos) e frequência respiratória (mpm). Em seguida, avaliaram-se as mucosas (oral, nasal e ocular) e linfonodos (sub-mandibulares, parotídeos, cervical superficial e subilíaco) (Ver ficha em ANEXO 2).

3.4.2 Avaliação laboratorial

A coleta de sangue venoso foi procedida por venopunção da jugular externa, após prévia antissepsia com algodão embebido em álcool 70°. Foram coletados três tubos à

¹ Kit IFI-Leishmaniose Visceral Canina / Bio-Manguinhos – Rio de Janeiro

vácuo², sendo dois com anticoagulante EDTA e um sem.

3.4.2.1 Hemograma

No mesmo dia da coleta de sangue, a partir de um dos tubos com EDTA, foram confeccionados, em duplicata, esfregaços sanguíneos, corados pelo método de Giemsa com o kit Panótico Rápido³ para posterior exame celular diferencial. Em centrífuga de micro-hematócrito⁴, foram preparados microtubos utilizados na determinação do hematócrito, das proteínas plasmáticas totais e do fibrinogênio. O hemograma foi realizado em contador automático de células⁵.

3.4.2.2 Análises bioquímicas

Após a retração do coágulo, o tubo sem anticoagulante foi centrifugado⁶ a 3000 rpm, durante dez minutos, e o soro congelado a -20°C, em alíquotas de 500µL e processado posteriormente em aparelho semiautomático de bioquímica sanguínea⁷ com kits específicos⁸. O perfil renal foi avaliado pela dosagem da uréia e da

creatinina e o hepático pela albumina e enzimas Gamaglutamiltransferase (GGT), Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) e Fosfatase alcalina (FA).

3.4.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os exames sorológicos foram utilizados para a detecção de imunoglobulinas G (IgG) anti-*Leishmania* sp.. Utilizou-se antígeno a partir de cepa de referência da OMS, *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904).

A preparação do antígeno foi realizada segundo Szargiki (2005). A fase líquida do meio de cultura foi filtrada em gaze estéril para retirada de restos de meio e lavada com solução salina. Posteriormente, foram realizadas três centrifugações em centrífuga refrigerada a 4°C a 750g seguidas de ressuspensões em Solução Salina Fosfatada Tamponada (PBS) pH 7,2. Para inativação dos protozoários e como forma de conservação, a última ressuspensão foi mergulhada em banho-maria a 55°C por oito minutos. A ressuspensão foi mantida refrigerada (4°C) e a sensibilização das lâminas realizada no momento do teste.

Utilizavam-se lâminas de vidro com 18 orifícios individuais, confeccionadas por serigrafia (*silk-screen*). As lâminas eram

² Vaccum II – Labnew – Campinas, Brasil

³ Panótico para colorações de esfregaço – Laborclin – Pinhais, Brasil

⁴ H-240 - Centribio

⁵ Abacus Júnior Vet – Hematology Analyser, Diatron – São Paulo, Brasil

⁶ Excelsa Baby – Fanem Ltda – São Paulo, Brasil

⁷ Analisador Semi automático

⁸ Bioclin – Quibisa Química Básica – Belo Horizonte, Brasil

sensibilizadas com 10µL de suspensão/orifício e secas a temperatura ambiente. Em todas as lâminas eram colocados os controles positivo e negativo.

Os soros eram diluídos em microtubos com solução PBS, 0,01M, pH7,2. Foram realizadas as diluições 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320. Dez microlitros de cada diluição eram distribuídos nos orifícios das lâminas sensibilizadas, incubando-as posteriormente por 35 minutos a 37,5°C, em câmara úmida.

Após esse período, as lâminas eram lavadas três vezes consecutivas com PBS, 0,01M, pH 7,2, deixando-as cobertas por cinco minutos na última lavagem. Era realizada uma quarta lavagem com água destilada.

Após secagem sob ventilação adicionava-se em cada orifício 10µL do conjugado anti-imunoglobulina G com isotiocianato de fluoresceína⁹ diluído em solução de Azul de Evans¹⁰ (1:5000 em PBS-Tween 80¹¹ a 2%), em título previamente estabelecido na diluição em bloco.

Eram repetidas as operações de incubação, lavagens e secagem descritas acima. As lâminas eram montadas com glicerina tamponada e lamínula, realizando-se a

leitura em microscópio de fluorescência¹², sendo positivas as amostras que apresentassem fluorescência (Fig. 2).

3.4.2.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para o teste sorológico de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), as promastigotas foram submetidas à ruptura por ultrassom¹³ em três ciclos de 50ω e centrifugadas à 1360g por 10 minutos. A concentração protéica foi dosada por meio do método de Lowry (Lowry et al., 1951), e ajustada para 10µg por mililitro em PBS e armazenado em freezer à -20°C em alíquotas, até o momento de uso.

As microplacas de 96 poços eram sensibilizadas por incubação *overnight* a 4°C com 100 µL/orifício de tampão carbonato, 0,05M, pH 9,6 contendo 1µg do antígeno diluído. A solução com antígenos era descartada e as placas lavadas quatro vezes com uma almotolia contendo solução de lavagem constituída de 0,9% (p/v) de cloreto de sódio e 0,05% (v/v) de Tween 20¹⁴, para retirada do excesso de tampão. Eram adicionados 150µL/poço da solução

⁹ Anti-horse IgG-FITC-rabbit (F3762) - SIGMA-Aldrich

¹⁰ Evans Blue - SIGMA-Aldrich

¹¹ Tween 80- Merck

¹² Microscópio de Fluorescência - Olympus BX41

¹³ Sonicador Ultrassônico – BRANSON 1510, Branson Ultrasonics Co., EUA

¹⁴ Tween 20 – P1379 - SIGMA-Aldrich

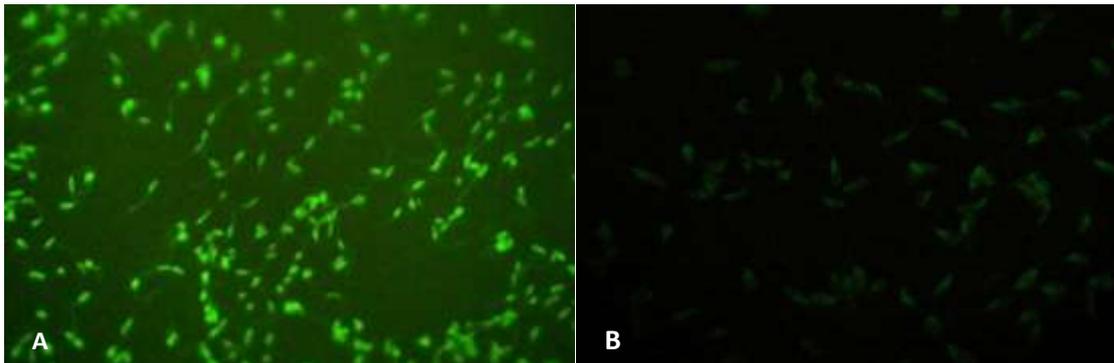


Figura 2: Amostras reativa (A) e não reativa (B) no teste da RIFI utilizando promastigotas da cepa *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 em investigação da soroprevalência equina por infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

de bloqueio, contendo 2% (p/v) de caseína¹⁵ em PBS, seguindo-se uma incubação de 30 minutos a 37°C. Duas lavagens eram realizadas para retirada do excesso.

Os soros eram diluídos em tampão de incubação, constituída por 0,05% (v/v) de Tween 20 e 0,25% de caseína (p/v), no título de 1:400. Aplicava-se 100µL da solução em cada poço. A placa era levada à incubação por 45 minutos a 37°C. Nova série de quatro lavagens era realizada para retirada do excesso.

Cada orifício recebia 100µL do conjugado anti-imunoglobulina G de equino ligada à enzima peroxidase¹⁶ diluído em PBS-Tween 20, no título 1:10000. As placas eram novamente incubadas e lavadas. A revelação era realizada com a adição de

100µL/poço da solução reveladora composta por Orto-pheniledamidina (OPD)¹⁷, ácido cítrico e peróxido de hidrogênio. Procedia-se um descanso em temperatura ambiente por 15 minutos, no escuro. Após esse intervalo a reação era interrompida com adição de 25µL de H₂SO₄ a 4N em cada orifício.

As leituras eram realizadas em leitora de ELISA¹⁸ a 492nm e os resultados expressos em valores de absorbância para o cálculo do ponto de corte. A partir desse, calculava-se o IR de cada soro testado.

¹⁵ Casein blocking buffer – C7594 - SIGMA-Aldrich

¹⁶ Anti-Horse IgG - Peroxidase / Goat - KPL

¹⁷ Ortophenyiledamidina (OPD) - P6787-SIGMA-Aldrich

¹⁸ Epoch – Biotek

3.5 EXPERIMENTO III: Estudo comparativo das técnicas RIFI, ELISA e PCR

Neste estudo foram avaliados 148 animais, 86 machos e 62 fêmeas visando a comparação dos métodos diagnóstico da PCR, ELISA e RIFI. Nos testes da PCR utilizou-se sangue total como amostra biológica. Realizou-se a reação para o gênero *Leishmania* e, em seguida, somente nos animais positivos, realizaram-se os testes específicos para *L. braziliensis* e *L. infantum*. Para os testes de ELISA e RIFI, utilizaram-se amostras de soro, conforme descrito nos itens 3.5.2.3.1 e 3.5.2.3.2, respectivamente.

3.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As alíquotas de sangue total foram descongeladas e submetidas à extração do DNA, por meio de kit comercial Kit NucleoSpin Tissue²⁵ para extração de DNA de tecidos, seguindo-se as orientações do fabricante.

A amplificação do material genético foi realizada com o preparo de uma mistura com 5µL de Mix Green²⁶, 1µL de água ultra pura, 2 µL da amostra de DNA e 5µL do iniciador, que apresenta como alvo a enzima DNA Polimerase de *Leishmania* sp.

(Bretagne et al., 2001). Como controle positivo, foram utilizados 2 µL de solução com 1ng/µL de DNA da cepa *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/75/PP/75). Para o controle negativo, utilizou-se um tubo contendo todos os reagentes mas sem DNA.

A programação do termociclador²⁷ foi de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação; 30 ciclos de 30 segundos a 55°C para anelamento; 30 ciclos de 30 segundos a 72°C para extensão; um ciclo de dez minutos a 72°C para extensão final.

Após a reação no termociclador, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata. Utilizou-se um marcador de peso molecular com 100 pares de base²⁸, considerando-se respostas positivas as que apresentaram bandas de 90 pares de base.

Para garantir a qualidade da PCR, evitando a contaminação por amplicons e consequentes falsos positivos, as etapas de extração do material genético e pipetagem da mistura para amplificação procedidas em ambientes distintos. Esta última etapa era ainda realizada em capela com fluxo laminar pertencente ao laboratório de amebíase, no qual não se trabalha com

²⁵ Kit NucleoSpin Tissue – Macherey-Nagel

²⁶ Green Master Mix (M7122) - Promega

²⁷ PTC-100 Pelthier Thermal Cycler - MJ Research, Minesota, EUA

²⁸ BenchTop 100bp DNA Ladder (G8291) - Promega, Madison, WI, USA

Leishmania, e a manipulação do material amplificado realizada em uma terceira sala.

Os resultados positivos na reação da PCR para o gênero *Leishmania* foram avaliados em testes específicos para as espécies *L. braziliensis* e para a espécie *L. infantum*. Para essa finalidade, foram repetidos os processamentos descritos, com modificação dos iniciadores (Fig. 3), na mistura para amplificação e na programação do termociclador.

A amplificação do kDNA de minicírculos de *L. braziliensis* foi realizada de acordo com Bruijn e Barker com modificações. Utilizaram-se 1µl de tampão RB 10x, 0,8 µl DNTPs, 4,1 µl de água ultra pura, 2,5 UI da *Taq* DNA Polimerase, 100 pmol dos primers B1 e B2 (Fig. 3) e 2 µl de DNA. A programação do termociclador²⁹ foi de seis minutos a 96°C para desnaturação; 30 ciclos de um minuto a 67,5°C para anelamento; 30 ciclos de um minuto a 72°C para extensão.

A análise para a espécie *L. infantum* foi procedida segundo Piarroux et al. (1993). Para a mistura da reação de amplificação utilizaram-se 10pmol de cada primer, LV1 e LV2 (Fig. 3), 5µl de Go Taq Green Master Mix³⁰, 2µl de DNA, diluídos com água ultra pura até completar um volume

total de 10µl. O passo inicial de desnaturação foi conduzido por cinco minutos a 95°C, seguido por 33 ciclos de anelamento (30 segundos a 59°C), extensão (30 segundos a 72°C) e desnaturação (30 segundos a 94°C) e uma extensão final de dois minutos por 72°C.

Após a reação no termociclador, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata. Consideraram-se respostas positivas os fragmentos amplificados que apresentaram bandas de 750bp para *L. braziliensis* e 120 bp para *L. infantum*.

3.5.2 Comparação entre o diagnóstico molecular e as técnicas sorológicas

Os resultados encontrados na técnica molecular da PCR foram comparados aos obtidos nas técnicas sorológicas da RIFI e do ELISA, de forma separada e agrupada. A concordância foi calculada por meio do Índice Kappa.

3.6 Análise Estatística

Os dados foram tabulados no programa Excel® e analisados pelo programa estatístico SAS (1997) e pelos testes de concordância Kappa (Landis e Koch, 1977). Considerou-se a significância de $p < 0,05$ – 95% de probabilidade.

²⁹ PTC-100 Pelthier Thermal Cycler - MJ Research, Minesota, EUA

³⁰ Kit Go Taq® Green Master Mix - Promega, Madison, WI, USA

Espécie	Iniciadores	Alvo	Referência
<i>Leishmania sp.</i>	A – 5'-TGTCGTTTGCAGACCAGATG-3' B – 5'-GCATCGCAGGTGTGAGCAC-3'	Enzima DNA Polimerase	Bretagne et al. (2001)
<i>L. braziliensis</i>	B1- 5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3' B2 - 5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'	Minicírculos do kDNA	Bruijn e Barker (1992)
<i>L. infantum</i>	LV-P1 - 5'-ACGAGGTCAGCTCCACTCC-3' LV-P2 - 5'- CTGCAACGCCTGTGTCTACG-3'	Minicírculos do kDNA	Piarroux et al. (1993)

Figura 3: Iniciadores e seus respectivos alvos utilizados para a PCR de sangue total de equinos, no município de Belo Horizonte, 2012.

3.6.1 EXPERIMENTO I e III

No experimento I, os resultados obtidos nas análises triplicatas de 69 animais foram submetidos à análise de Concordância e avaliadas pelo teste de Kappa (Landis e Koch, 1977). De maneira semelhante, no experimento III, analisou-se a concordância entre o diagnóstico molecular e sorológico.

3.6.2 EXPERIMENTO II

Os resultados dos testes diagnósticos sorológicos foram utilizados para os cálculos do Índice de Concordância Kappa e da soroprevalência da infecção por *Leishmania sp.*.

As observações clínicas e laboratoriais dos quatro diferentes grupos, a saber, negativos ou positivos em ambas as técnicas sorológicas e positivo em uma das duas, foram comparadas de acordo com a natureza da variável.

As variáveis dicotômicas foram avaliadas por dispersão de frequência e submetidas ao teste de Qui-quadrado (linfonodos – normal e reativo; mucosas – hipocoradas, normocoradas e hiperporadas).

As respostas quantitativas foram submetidas ao teste de normalidade (Tab.3). Quando a distribuição das respostas apresentou normalidade, foram submetidas ao PROC GLM (SAS, 1997) e o teste estatístico Student Newman Keuls (SNK), aplicado para a comparação de três ou mais médias. Para a comparação entre dois grupos aplicou-se o teste T de Student.

Visando uma maior homocedasticidade das respostas, os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos à transformação pelo Log (x+1), para os dados contínuos e pelo Arco seno \sqrt{x} , para os dados percentuais. Quando, após a transformação, para dados que apresentaram distribuição normal,

aplicaram-se os testes de SNK ou T de Student.

Naqueles casos em que as variáveis permaneceram com distribuição não paramétrica utilizaram-se os testes de

Kruskall-Wallis para a comparação de três ou mais médias e o teste de Wilcoxon para a comparação de duas médias. Os testes não paramétricos também foram utilizados para a avaliação do ECC, variável essa de caráter qualitativo ordinal.

Tabela 3: Valores de probabilidade, no teste de normalidade, brutos e após transformação, para as variáveis dos experimentos II e III e teste estatístico aplicado.

Variável	Valores de probabilidade (p)		Teste estatístico utilizado
	Teste de normalidade		
	Dados brutos	Após transformação	
Escore corporal		0,0001	KW ou Wilcoxon
Temperatura retal	0,4965		SNK ou Teste T
Frequência cardíaca	0,0209	0,1132	SNK ou Teste T
Pulso	0,6542		SNK ou Teste T
Frequência respiratória	0,0001	0,0474	SNK ou Teste T
TPC	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Plaquetas	0,462		SNK ou Teste T
Hematócrito	0,0075	0,0027	KW ou Wilcoxon
Hemoglobina	0,4329		SNK ou Teste T
Eritrócitos	0,9758		SNK ou Teste T
VGM	0,3744		SNK ou Teste T
CHCM	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
HCM	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
RDW	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Leucócitos Totais	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Basófilo absoluto	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Eosinófilo absoluto	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Neutrófilo absoluto	0,0001	0,8734	SNK ou Teste T
Bastonete absoluto	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Linfócito absoluto	0,0001	0,8519	SNK ou Teste T
Monócito absoluto	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Relação N:L	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Basófilo relativo	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Eosinófilo relativo	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Neutrófilo relativo	0,1991		SNK ou Teste T
Bastonete relativo	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Linfócito relativo	0,0050	0,5217	SNK ou Teste T
Monócito relativo	0,0001	0,0043	KW ou Wilcoxon
Uréia	0,0001	0,1226	SNK ou Teste T
Creatinina	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
GGT	0,0001	0,0042	KW ou Wilcoxon
AST	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
ALT	0,0001	0,0001	KW ou Wilcoxon
Fosfatase alcalina	0,0001	0,5667	SNK ou Teste T
Albumina	0,6765		SNK ou Teste T
Proteína Total	0,0110	0,1056	SNK ou Teste T
Fibrinogênio	0,0001	0,0010	KW ou Wilcoxon

KW = Kruskall-Wallis; SNK = Student Neumann Keuls

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento I: Padronização da técnica do Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Devido à ausência de kits comerciais para o diagnóstico da leishmaniose equina, a padronização de um teste torna-se inerente ao processo. Considerando a variação metodológica apresentada pela literatura referente à utilização do ELISA na pesquisa de imunoglobulinas anti-*Leishmania* sp. na

espécie equina, buscou-se a padronização das diluições mais apropriadas, do antígeno, do soro e do anticorpo secundário.

Os trabalhos com *Leishmania* do complexo *L. donovani*, na Europa (Koehler et al., 2002; Solano-Galego et al., 2003; Fernández-Béllon et al., 2006) e no Brasil (Duarte et al., 2001; Cerqueira et al., 2003), utilizam variações metodológicas no preparo e concentração do antígeno, na diluição do soro dos animais e na titulação do conjugado (Fig. 4).

Autor	Antígeno		Conjugado		Soro
	Espécie	[] (µg/mL)	Tipo	Diluição	
Duarte et al. (2001)	<i>L. major</i> -like	-	-	-	1:20
Cerqueira et al. (2003)	<i>L. infantum</i>	10	IgG	1:10000	1:100
Cerqueira et al. (2003)	Proteína rk39	0,25	IgG	1:10000	1:100
Solano-Galego et al. (2003)	<i>L. infantum</i>	20	PtnA	1:1000	1:50
Fernández-Bellón et al. (2006)	<i>L. infantum</i>	20	IgG	1:4000	1:200
Fernández-Bellón et al. (2006)	<i>L. infantum</i>	20	PtnA	1µg/ml	1:100

Figura 4: Metodologias utilizadas pela técnica sorológica do ELISA para pesquisa de imunoglobulinas IgG anti-*Leishmania* sp. em equinos.

Os controles positivos utilizados apresentavam lesão ativa em um dos membros posteriores. Um deles apresentou amastigotas no *imprint* da lesão e o outro no esfregaço do aspirado de medula óssea. Ambos foram positivos na técnica da PCR

utilizando como amostra clínica a biópsia da lesão e o iniciador para *L. braziliensis* (Fig. 5). O segundo animal apresentou ainda resultado positivo para *L. infantum* nas duas amostras biológicas.

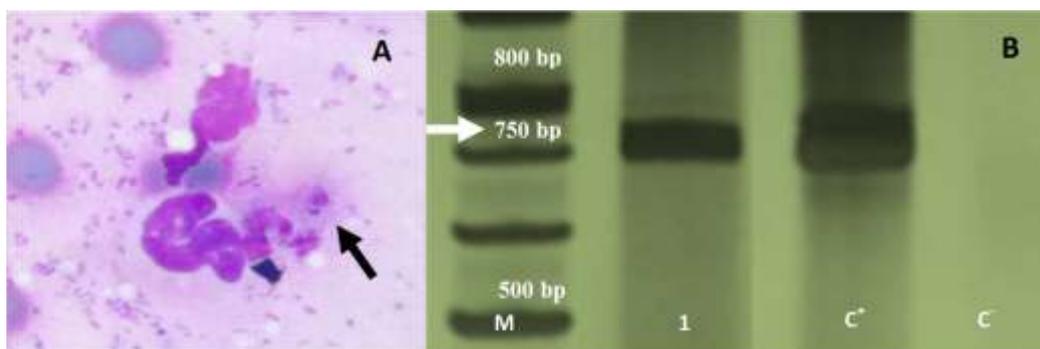


Figura 5: Controle positivo para padronização da técnica do ELISA. (A) Amastigota (seta) de *Leishmania* sp. em esfregaço por aposição, corado pelo Panótico, de biópsia de lesão em membro posterior de equino; (B) Gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR específico para o complexo *L. braziliensis*. M: Peso molecular 1 Kb; C⁺: controle positivo da reação (DNA extraído de cultura da cepa MHOM/BR/75/M2904); C⁻: Controle negativo da reação (sem DNA); Canaleta 1: material extraído de biópsia das lesões ativas em membro posterior de equino utilizado como controle positivo.

A primeira bateria de exames apresentou maiores índices S/N, razão entre as médias das absorbâncias dos controles positivos e negativos (Rajasekariah et al., 2001), nas combinações com antígeno a 10 µg/mL, soro 1:400 e conjugado 1:10000 e 1:20000 e antígeno 20 µg/mL, soro 1:800 e conjugado 1:10000 (Ver em ANEXO 3). Foram repetidas as concentrações destes antígenos, combinadas com as duas diluições de soro. Nessa bateria de exames, foram acrescentados mais um potro de 24 horas

e dois de 48 horas de vida como controles negativos. Os resultados do SN dessa segunda bateria (Ver em ANEXO 4) demonstraram maiores SN nas técnicas com antígeno na concentração de 20 µg/mL. Entretanto, na utilização do conjugado 1:30000, não foi possível diferenciar os animais positivos dos negativos. As diluições 1:10000 e 1:20000, a despeito de maiores SN, apresentaram o mesmo desempenho em diferir os controles quando comparados à utilização de 10 µg/mL de

antígeno, diluição do soro 1:400 e título do conjugado 1:10000. Dessa forma, optou-se por esta última combinação por se utilizar menos antígeno, visto que, de uma forma geral, as cepas de *L. braziliensis* apresentam certa dificuldade de cultivo e pela vantagem de utilizar um mesmo lote para todos os exames.

Para a avaliação de repetibilidade da combinação utilizada, foram analisados 69 animais em triplicata. Os resultados foram avaliados pela intensidade de concordância,

quando se obteve um índice Kappa de 0,89 (Tab.4), traduzido para uma concordância quase perfeita (Landis e Koch, 1977).

A técnica padronizada para o teste sorológico do ELISA apresentou excelente reprodutibilidade podendo ser utilizada em inquéritos epidemiológicos na pesquisa da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp..

Tabela 4: Intensidade de concordância para amostras de soro equino na padronização do teste de ELISA.

Resultado	Repetição das amostras			Teste de Kappa
	1	2	3	
Positiva	42	42	41	Kappa geral: 0,899 Valor p: 0,001 Intervalo de confiança: Superior: 1,0 - Inferior: 0,763
Negativa	27	27	28	
Total	69	69	69	

4.2. Experimento II – Avaliação clínica e laboratorial de equinos com enfoque na infecção por *Leishmania* sp.

4.2.1. População estudada

O município de Belo Horizonte disponibiliza à população as URPVs, que recebem resíduos não recolhidos pela coleta convencional de lixo domiciliar. Este material é caracterizado, principalmente, por entulhos da construção civil, madeira, podas de árvores e jardins, pneus e móveis sem mais utilidade. Tal política foi

implementada com o objetivo de dar destinação correta a esse material, evitando o acúmulo em locais errôneos, o que poderia ocasionar o aparecimento de roedores e insetos transmissores de doenças (BELO HORIZONTE, 2012).

Para transportar esse lixo até às URPVs, muitas vezes contratam-se carroceiros, resultando em uma categoria de prestadores de serviços em expansão no município. A Escola de Veterinária da UFMG

desenvolve, junto à Prefeitura Municipal de Belo Horizonte um Projeto de Extensão denominado: “Correção Ambiental e Reciclagem com Carroceiros de Belo Horizonte”, no qual os carroceiros são providos de assistência médico-veterinária por menores custos nos serviços prestados pelo Hospital Veterinário da UFMG e vacinação antirábica gratuita, além de periodicamente assistirem a palestras informativas referentes ao manejo e sanidade de seus animais. A vacinação dos equinos carroceiros é realizada em visitas semanais às múltiplas URPVs distribuídas pelas Regionais.

Desde 1983, a Prefeitura é estratificada em nove unidades administrativas chamadas Regionais. Cada Regional compreende e é responsável pela administração de uma determinada área na cidade (BELO HORIZONTE, 2012).

Foram utilizadas 20 URPVs, distribuídas entre as sete regionais (Tab. 5). Após esse intervalo, as regionais que não totalizaram 30 animais foram completadas com amostras de soros dos anos de 2010 e 2011, coletadas e armazenadas pelo projeto “Correção Ambiental e Reciclagem com Carroceiros de Belo Horizonte”. Desta forma, foram utilizadas 21 amostras de 2010, 167 de 2011 e 22 de 2012.

Dos 210 equinos avaliados, 41,43% (87/210) eram machos e 58,57% (123/210) eram fêmeas. A distribuição, de acordo com o sexo e a Regional administrativa de Belo Horizonte, encontra-se descrita na Tab.6.

4.2.2 Avaliação sorológica pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Como controle positivo desta reação, utilizou-se soro de um equino com lesão ativa no membro pélvico esquerdo, da qual foi realizada biópsia para o teste da PCR, apresentando resultado positivo para *L. braziliensis* além da detecção de formas amastigotas no aspirado de medula óssea. Os controles negativos foram um potro de três semanas, nascido na Clínica de Equídeos da Escola de Veterinária da UFMG e um potro jovem, de dois anos e meio, residente em área não-endêmica para LTA.

Inicialmente foi seguido o padrão utilizado no Laboratório de Sorologia de Leishmania do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG para humanos e cães. Nestes testes, as lâminas foram sensibilizadas com suspensão formolizada de promastigotas inteiras, secadas à temperatura ambiente e posteriormente armazenadas congeladas (-20°C), sendo utilizadas quando da necessidade diagnóstica.

Tabela 5: Distribuição dos animais amostrados de acordo com as URPV's e Regionais.

Regional	URPV	Data	Frequência	Porcentagem
Barreiro	Flávio de Oliveira	02/09/2011	18	8,6
	Túneo e Lindóia	25/11/2011	10	4,8
	Túneo e Lindóia	01/06/2012	2	0,9
Norte	Aeroporto	26/08/2011	11	5,2
	Bacurus	30/05/2011	11	5,2
	Saramenha	07/05/2010	8	3,9
Noroeste	Delta	20/04/2012	15	7,1
	Pedro II	02/12/2011	2	0,9
	Pindorama	23/09/2011	13	6,2
Nordeste	São Gabriel	16/09/2011	17	8,1
	São Paulo	09/05/2011	7	3,3
	São Paulo	14/05/2010	6	2,9
Oeste	Barão Homem de Melo	16/03/2012	2	0,9
	Nova Cintra	11/11/2011	6	2,9
	Silva Lobo	18/05/2012	6	2,9
	Tereza Cristina	30/09/2011	16	7,6
Pampulha	Castelo	27/06/2011	12	5,7
	Garça	04/11/2011	11	5,2
	Santa Amélia	22/11/2010	7	3,3
V. Nova	Rio Branco	13/06/2011	12	5,7
	São João Batista	07/10/2011	7	3,3
	Vilarinho	11/04/2011	11	5,2
Total			210	100,0

Tabela 6: Distribuição dos animais por sexo e regionais, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp. Belo Horizonte, 2012.

Regional	Fêmeas		Machos		Total	
	n	%	N	%	n	%
Barreiro	16	53,33	14	46,67	30	14,30
Nordeste	13	43,33	17	56,67	30	14,30
Noroeste	11	36,67	19	63,33	30	14,30
Norte	15	50,00	15	50,00	30	14,30
Oeste	12	40,00	18	60,00	30	14,30
Pampulha	9	30,00	21	70,00	30	14,30
V. Nova	11	36,67	19	63,33	30	14,30
Total	87	41,43	123	58,57	210	100,00

Esta metodologia não apresentou resultados satisfatórios para a espécie equina, visto que a repetibilidade era baixa, com expressiva variação na positividade do controle positivo. Outras metodologias foram então testadas, optando-se pela preparação do antígeno segundo Szargiki (2005). Esta metodologia apresentou reatividade no soro do animal positivo no título 1:80 e negativo nos controles negativos, além de repetibilidade satisfatória.

Foram considerados positivos na RIFI os animais que apresentaram reação nas diluições iguais ou superiores a 1:40, conforme os experimentos em seres humanos (Pedras et al. 2003; Marques et al., 2006; Szargiki et al., 2009; Fantauzzi, 2009) e caninos (Pirmez et al., 1988; Madeira et al., 2003; Santos et al., 2005;

Jesus et al., 2006; Távora et al., 2007; Reis et al., 2011).

Por essa técnica, determinaram-se 137/210 (65,20%) animais positivos e 73/210 (34,80%) negativos, não havendo diferença ($p>0,05$) no percentual de sororreagentes entre os sexos (Tab.7).

O maior título encontrado foi de 1:160, presente em 6,00% (8/137) dos animais positivos. A distribuição da frequência das titulações dos animais positivos está demonstrada na Fig. 6.

Dentre as regionais administrativas, a que apresentou maior positividade na RIFI foi a Noroeste (73,33%) (Fig. 7). Nesta localidade, juntamente com a regional Barreiro, não foram detectados animais com título de 1:160 (Tab. 8).

Tabela 7: Distribuição das amostras reativas e não reativas pela técnica da RIFI, de acordo com o sexo, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

RIFI	Sexo		Total
	FEM (n, %)	MASC (n, %)	
Não reagentes	27 (31,00)	46 (37,00)	34,80% (73/210)
Reagentes	60 (69,00)	77 (63,00)	65,20% (137/210)
Total	87 (100,00)	123 (100,00)	100,00 (210/210)

Teste do Qui-quadrado, $p=0,340$.

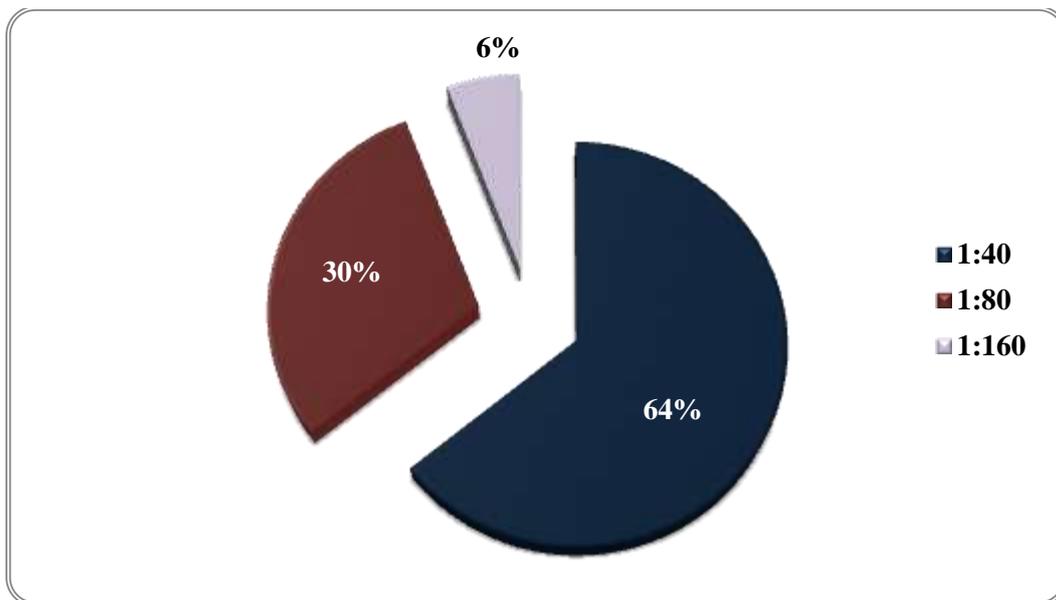


Figura 6: Frequência das diluições dos soros em amostras reativas na RIFI, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

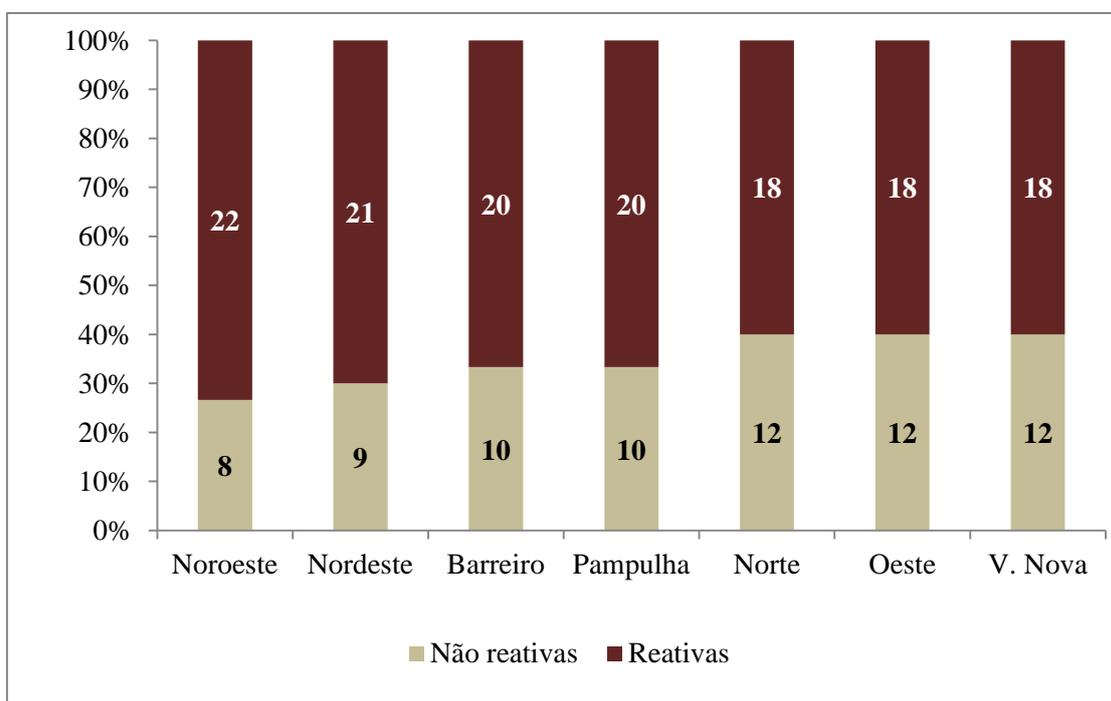


Figura 7: Distribuição dos animais reativos e não reativos na técnica da RIFI, de acordo com a regional, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Tabela 8: Distribuição das amostras reativas e não reativas na RIFI, de acordo com a regional e a diluição do soro, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Regional (n)	Titulação das amostras reativas (n, %)				Amostras não reativas
	1:40	1:80	1:160	Total	
Barreiro	15 (50,00)	5 (16,67)	0	20 (66,67)	10 (33,33)
Nordeste	14 (46,67)	5 (16,67)	2 (6,67)	21 (70,00)	9 (30,00)
Noroeste	13 (43,33)	9 (30,00)	0	22 (73,33)	8 (26,67)
Norte	8 (26,67)	9 (30,00)	1 (3,33)	18 (60,00)	12 (40,00)
Oeste	13 (43,33)	3 (10,00)	2 (6,67)	18 (60,00)	12 (40,00)
Pampulha	14 (46,67)	5 (16,67)	1 (3,33)	20 (66,67)	10 (33,33)
Venda Nova	11 (36,67)	5 (16,67)	2 (6,67)	18 (60,00)	12 (40,00)
Total	88 (41,90)	41 (19,52)	8 (3,81)	137 (65,24)	73 (34,76)

n=210; p>0,05 Teste Qui-quadrado

Supondo que os animais estivessem infectados com *L. (V.) braziliensis*, a espécie mais encontrada no Brasil e outros países da América que estudaram leishmaniose em equinos, os baixos títulos encontrados estão de acordo com os relatos da literatura, em seres humanos e caninos, nos quais as respostas humorais nas leishmanioses tegumentares, principalmente na forma cutânea localizada não são tão expressivas quanto na LV (Passos et al., 2001; Dantas-Torres, 2007; Arraes et al., 2008; Brasil, 2010; Silva et al., 2011). Na literatura referente aos equinos, Barbosa-Santos et al. (1994) relataram título de 1:320. Entretanto, a paciente em questão apresentava múltiplas lesões incluindo úlcera nasal mucocutânea. Os estudos em seres humanos já esclareceram serem as formas mucocutâneas e mucosas

caracterizadas por concentrações mais elevadas de anticorpos e resposta imune incapaz de debelar a infecção (Convit et al., 1993; Pedras et al., 2003; Marques et al., 2006; Reithinger et al., 2007; Fantauzzi, 2009; Brasil, 2010).

Em levantamento realizado na Região de Bauru, estado de São Paulo, foi relatado 40,00% dos equinos positivos na técnica sorológica da RIFI, sendo sugerido pelos autores exposição e infecção por *L. infantum* (Villalobos et al., 2010). Entretanto, além da metodologia descrita não sinalizar qual cepa foi utilizada no estudo, a região estudada é sabidamente positiva para LTA. Dessa forma, os anticorpos detectados no estudo podem ser referentes a espécies desencadeadoras de leishmanioses cutâneas.

Apesar de não ter sido detectada diferença entre as regionais ($p > 0,05$), ressalta-se um percentual superior a 60,00% em todas as regionais estudadas, de animais sororreagentes no teste da RIFI. Questiona-se o valor diagnóstico da RIFI, realizado de forma isolada, para a LTA. Este teste deveria estar associado a outras técnicas parasitológicas, como auxílio no diagnóstico diferencial (Brasil, 2010). Em situações em que a biópsia e a histopatologia apresentam-se inviáveis, a RIFI poderia ser utilizada como teste de triagem (Barroso-Freitas et al., 2009), por sua fácil exequibilidade e baixo custo. Além disso, há que se ponderar os possíveis falso-positivos, oriundos de reações cruzadas, ainda não determinadas no equino, porém de conhecimento amplo no ser humano e caninos (Brito et al., 2000; Gontijo e Carvalho, 2003).

4.2.3 Avaliação sorológica pela técnica do ELISA

As amostras foram analisadas em triplicata, calculada a média e a razão entre esta e o

cut-off, sendo considerados positivos no ELISA os animais com IR igual ou superior a um. As Fig. 8 e 9 demonstram a distribuição das absorbâncias e dos índices de reatividade entre as amostras reativas e não reativas, divididas pelas placas de execução. As médias dos índices de reatividade estão demonstradas na Tab. 9.

Detectaram-se 87/210 (41,43%) animais positivos e 123 (58,57%) negativos (Tab.10). A regional que apresentou maior reatividade foi a Pampulha, com 60% (18/30) quando comparada com as regionais Barreiro (33,33% - 10/30) e Noroeste (16,67% - 3/30) ($p < 0,05$). As regionais Norte e Venda Nova, ambas com 53,33% (16/30) animais positivos, diferiram ($p < 0,05$) apenas da regional Noroeste (16,67% - 5/30). As regionais Nordeste (36,67% - 11/30), Oeste (36,67% - 11/30), Barreiro e Noroeste foram semelhantes ($p > 0,05$) entre si (Fig. 10). Da mesma forma que a RIFI, o ELISA não apresentou diferença ($p > 0,05$) na distribuição das amostras reativas entre os sexos (Fig. 11).

Tabela 9: Comparação dos valores médios do índice de reatividade do ELISA, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

	Índice de Reatividade ($\bar{X} \pm EP$)	Número de amostras (%, n)
Todas as amostras	1,021 \pm 0,726	100,00 (210)
Reativas (IR \geq 1,000)	1,677 \pm 0,686	41,43 (87/210)
Não reativas (IR < 1,000)	0,557 \pm 0,219	58,57 (123/210)

X: Média; EP: Erro padrão

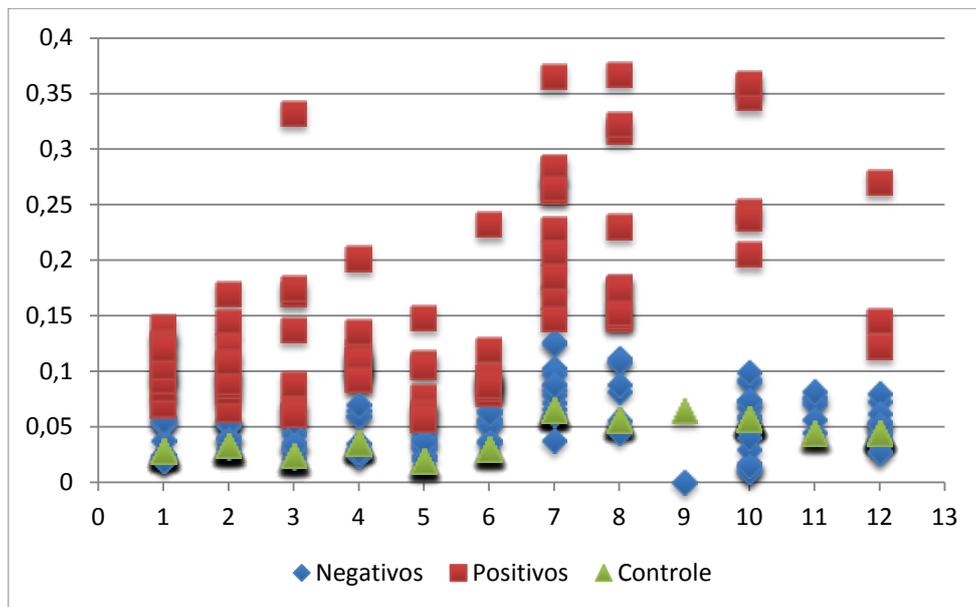


Figura 8: Distribuição das absorvâncias entre as amostras reativas e não reativas no ELISA, separadas por placas de realização (1 a 12), em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

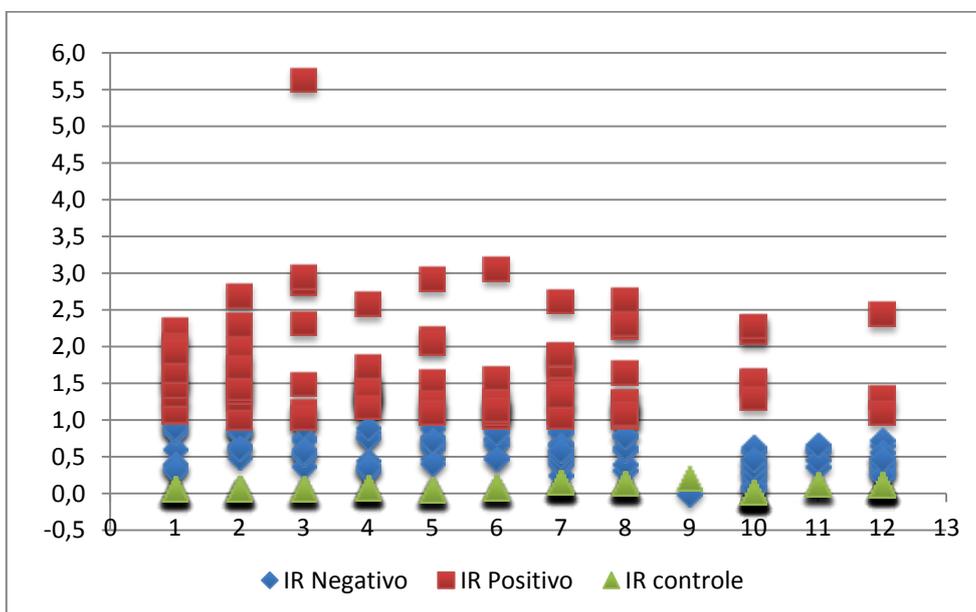


Figura 9: Distribuição dos Índices de Reatividade (IR) entre as amostras reativas e não reativas no ELISA, separadas por placas de realização (1 a 12), em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Tabela 10: Distribuição das amostras reativas e não reativas no ELISA, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

ELISA	Frequência	Porcentagem
Positivo	87	41,43
Negativo	123	58,57
Total	210	100,00

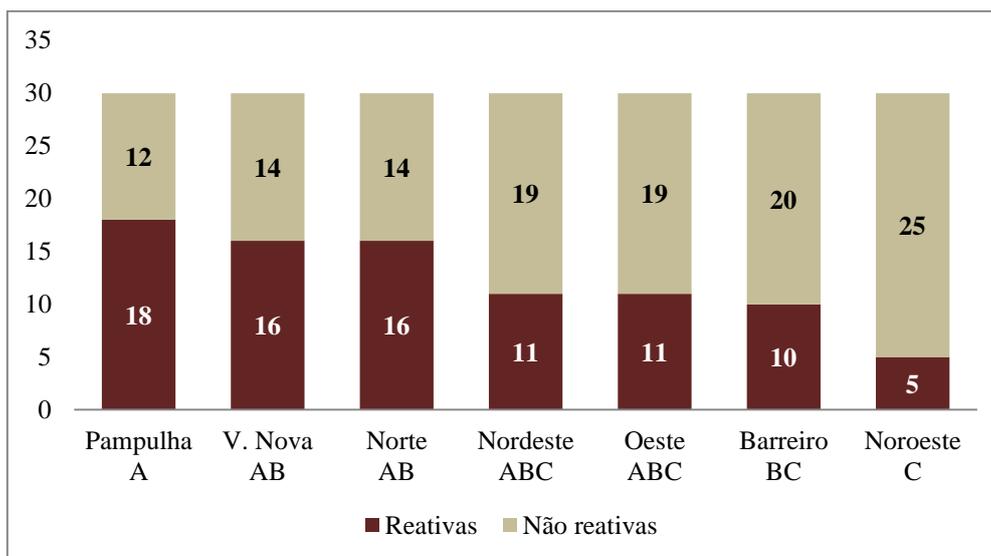


Figura 10: Distribuição das amostras reativas e não reativas no ELISA, de acordo com a regional, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012. (Regionais seguidas por letras diferentes, diferem, $p < 0,05$ – Qui-quadrado).

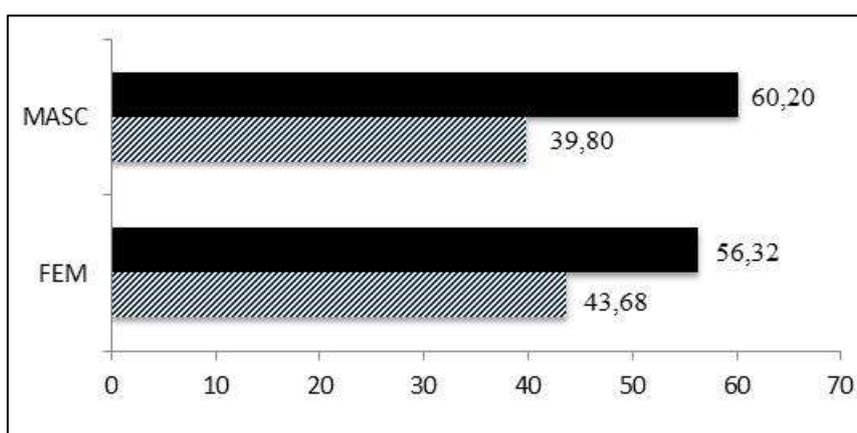


Figura 11: Distribuição das amostras reativas e não reativas no ELISA, de acordo com o sexo, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012. (Teste do Qui-quadrado, $p = 0,578$).

Os resultados de positividade obtidos diferem dos encontrados por inquérito epidemiológico realizado em cavalos saudáveis em região endêmica para *L. infantum* da Espanha, na qual foi relatado surto de sintomatologia cutânea ocasionado por esta espécie em equinos. Fernandez-Bellón et al. (2006) não detectaram diferença nas absorbâncias de cavalos oriundos de área endêmica (n=111) ou não endêmica (n=33) por meio do ELISA com anti-IgG conjugada à peroxidase. Quando da alteração metodológica para Proteína A conjugada à peroxidase, a positividade foi de 14,3%, índice ainda inferior ao determinado no município de Belo Horizonte.

No Brasil, no município do Rio de Janeiro, região endêmica para LT e LV, Duarte et al. (2001) relatam 11,6% de equinos positivos no ELISA sendo este resultado limitado à infecção por *Leishmania* sp. visto que os autores não identificaram a espécie infectante tampouco avaliaram os animais clinicamente. O percentual abaixo do encontrado neste estudo pode ser devido à menor circulação do parasito nos equinos daquele município ou à utilização da espécie *L. major-like* como antígeno. Barroso-Freitas et al. (2009), comparando os resultados de casos em seres humanos acometidos pela LTA, determinaram

sensibilidade de 95,7% pelo antígeno homólogo (*L. braziliensis*) e 78,7% quando na utilização de antígeno heterólogo (*L. major-like*).

Contrapondo à resposta humoral no ELISA de 14,3%, Fernández-Bellón et al. (2006) obtiveram 36,40% (20/55) de positividade no ensaio de linfoproliferação. Da mesma forma, Solano-Gallego et al. (2003) relatam perfil imunológico similar, com baixas concentrações de anticorpos (IR= 1,05) e elevada resposta imune celular, em equino com lesão ativa e parasitologicamente confirmado por *L. infantum*. Ambos os trabalhos sugerem ser baixa a resposta humoral em equinos contra *Leishmania* sp., apresentando resposta imune celular eficaz, com possível infecção sem desenvolvimento de doença ou com sinais brandos.

Os animais reativos no presente estudo apresentaram IR médio três vezes superior aos animais não reativos (Tab.9), demonstrando boa capacidade de distinção entre positivos e negativos. Desta forma, a maior detecção de imunoglobulinas anti-*Leishmania* sp. encontrada no município de Belo Horizonte, em relação aos demais estudos brasileiros e europeus, provavelmente deve-se à maior circulação do parasito na área estudada.

4.2.4 Comparação entre as técnicas sorológicas

Entre as técnicas sorológicas, a positividade foi maior ($p < 0,05$) na RIFI (65,20%) quando comparada ao ELISA (41,43%) (Tab. 11).

Dentro de cada regional comparou-se a reatividade para os testes de RIFI e ELISA. A regional Barreiro apresentou 66,67%

(20/30) contra 33,33% (10/30) de animais sororreativos para RIFI e ELISA, respectivamente ($p = 0,055$). Apesar da maior distância entre os percentuais ter sido observada na regional Noroeste (70,00% - 21/30 RIFI positivo x 36,67% - 11/30 ELISA positivo), não foi detectada diferença ($p > 0,05$) entre a reatividade para as técnicas utilizadas (Fig. 12).

Tabela 11: Distribuição de amostras reativas, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Técnica sorológica	Amostras reativas	
	N	%
RIFI	137	65,27 ^A
ELISA	87	41,43 ^B

n= 210, Teste Qui-quadrado, $p = 0,033$

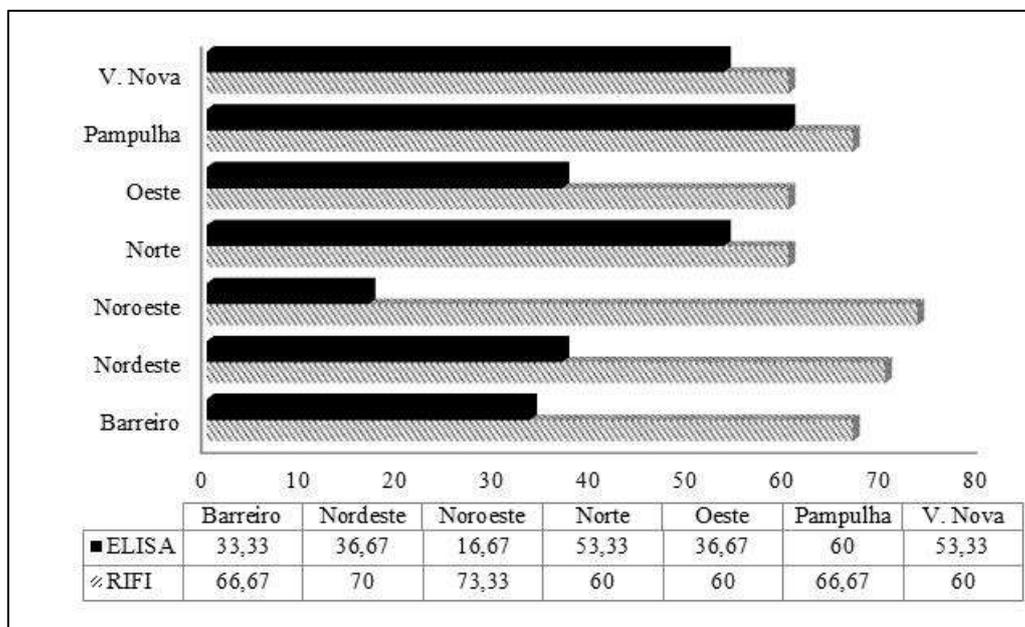


Figura 12: Reatividade das amostras, de acordo com a regional e a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012. (Teste do Qui-quadrado, $p > 0,05$).

Apesar de terem sido utilizados 30 animais em cada regional, o teste de Qui-quadrado poderia não ser o mais indicado neste caso, já que em 50% das células ocorreu um n inferior a 5 (apenas cinco animais ELISA positivo), deixando visível a sobreposição do intervalo de confiança. Assim, avaliou-se a concordância entre as técnicas

sorológicas, representada como fraca pelo índice Kappa de 0,131 (Tab.12).

Ao se considerar positivas as amostras reativas em pelo menos uma das duas técnicas, a soroprevalência foi de 76,20% (160/210), não havendo diferença ($p>0,05$) na positividade entre sexos (Tab.13) ou Regionais (Fig.13).

Tabela 12: Concordância entre as técnicas sorológicas da RIFI e do ELISA, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

ELISA	RIFI			Kappa (IC=95%)
	Positivo	Negativo	Total	
Positivo	64 (30,48%)	23 (11%)	87 (41,43%)	0,131 (0 - 0,19) Fraca
Negativo	73 (34,76%)	50 (23,8%)	123 (58,57%)	
Total	137 (65,2)	73 (34,8)	210 (100)	

Tabela 13: Distribuição da frequência entre animais sororreagentes e não sororreagentes, independente da técnica sorológica e de acordo com o sexo, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Sexo	Não reagentes	Reagentes
Fêmeas	22,99 (20/87)	77,01 (67/87)
Machos	24,39 (30/123)	75,61 (93/123)
Total	23,81 (50/210)	76,19 (160/210)

Teste Qui-quadrado, $p=0,814$.

Os resultados foram desmembrados, agrupando as amostras em quatro grupos distintos, a saber: positivas em ambas as técnicas sorológicas, positivas somente em uma das técnicas e não reativas. Dessa forma, obteve-se 30,48% (64/210) de positividade nas duas técnicas simultaneamente e 23,80% (50/210) de amostras não reativas. Amostras reativas no

ELISA e não reativas na RIFI representaram 11% (23/210), enquanto o inverso apresentou um índice superior em mais de três vezes, 34,76% (73/210) (Fig.14).

Nesse reagrupamento, continuou sem haver diferença ($p>0,05$) na distribuição das amostras em relação ao sexo (Fig.15) ou às regionais administrativas (Tab.14).

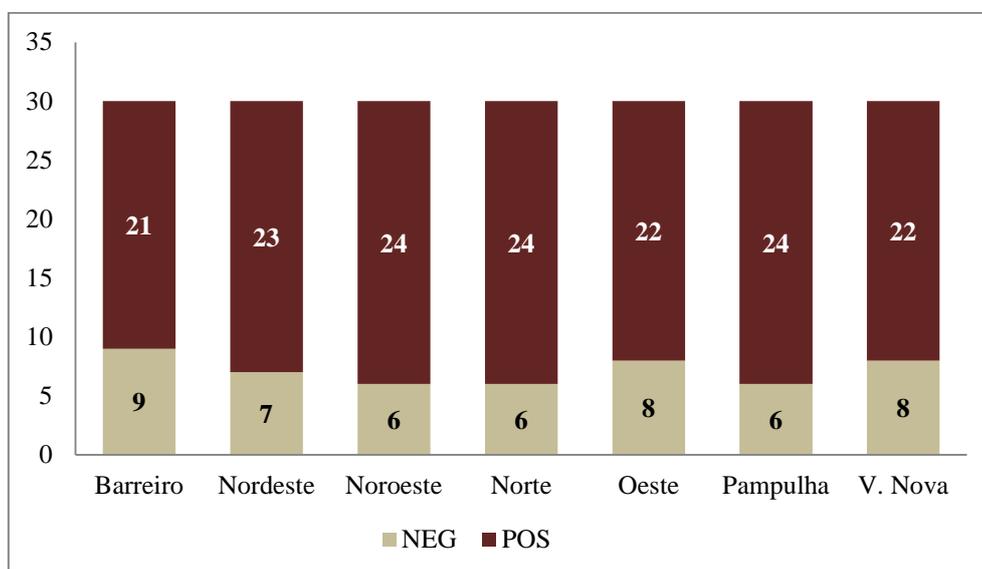


Figura 13: Distribuição das amostras reativas e não reativas, independente da técnica sorológica e de acordo com a Regional administrativa, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012. (Teste Qui-quadrado, $p=0,915$).

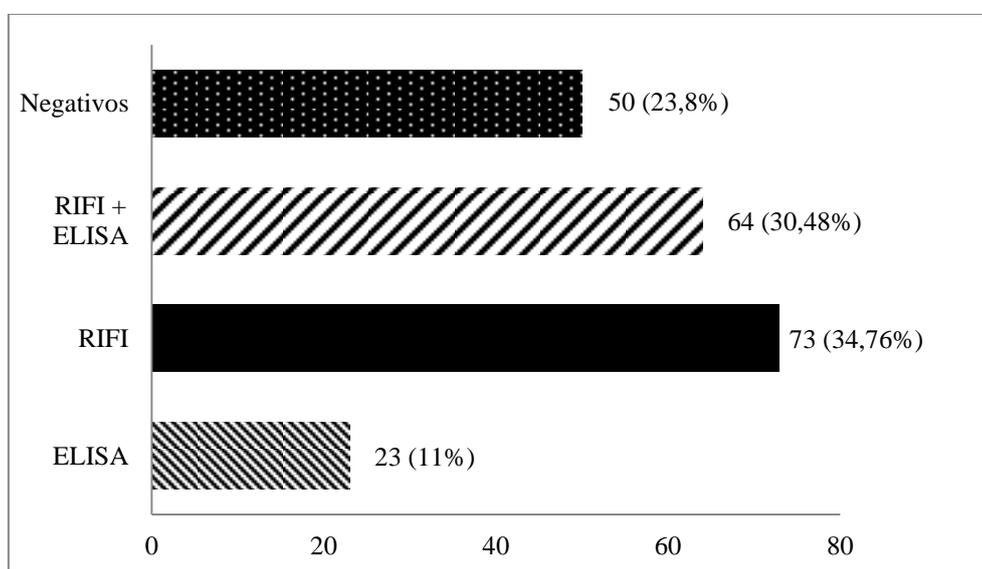
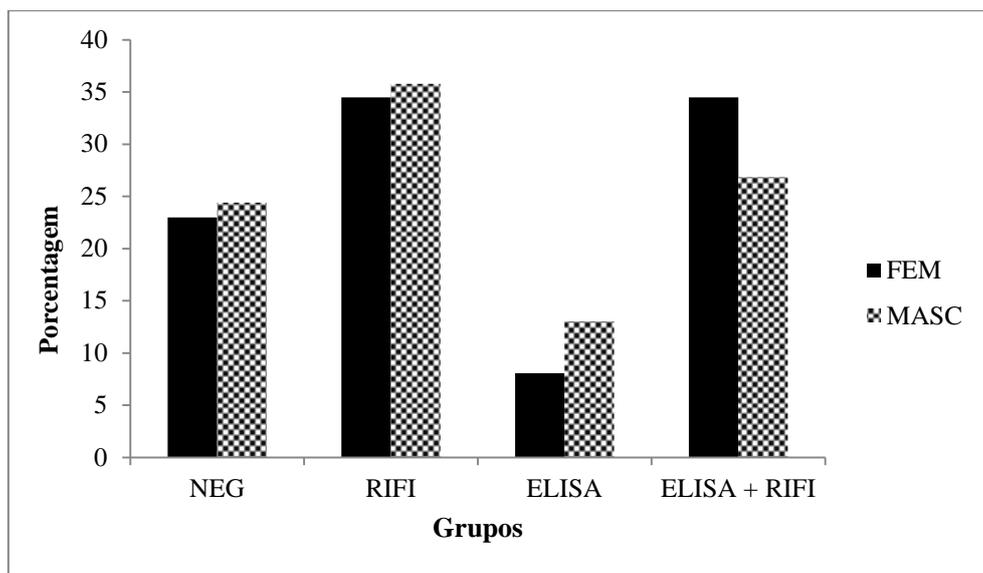


Figura 14: Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.



	NEG	RIFI	ELISA	ELISA + RIFI
FEM (% , n)	22,99 (20/87)	33,33 (29/87)	8,05 (7/87)	35,63 (31/87)
MASC (% , n)	24,39 (30/123)	35,77 (44/123)	13,01 (16/123)	26,83 (33/123)

Figura 15: Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com sexo e técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção de *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012. (Teste do Qui-quadrado, $p=0,463$).

Tabela 14: Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com as regionais e os grupos, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Regional	Amostras reativas			
	Não reativa (%, n)	RIFI	ELISA	ELISA + RIFI
Barreiro	30,00 (9/30)	36,67 (11/30)	3,33 (1/30)	30,00 (9/30)
Nordeste	23,33 (7/30)	40,00 (12/30)	6,67 (2/30)	30,00 (9/30)
Noroeste	20,00 (6/30)	63,33 (19/30)	6,67 (2/30)	10,00 (3/30)
Norte	20,00 (6/30)	26,67 (8/30)	20,00 (6/30)	33,33 (10/30)
Oeste	26,67 (8/30)	36,67 (11/30)	13,33 (4/30)	23,33 (7/30)
Pampulha	20,00 (6/30)	23,33 (7/30)	13,33 (4/30)	43,33 (13/30)
Venda Nova	26,67 (8/30)	20,00 (6/30)	13,33 (4/30)	40,00 (12/30)
Total	23,81 (50/210)	35,24 (74/210)	10,95 (23/210)	30,00 (63/210)

Teste do Qui-quadrado, $p=0,091$.

A não associação entre infecção e sexo, independente da técnica utilizada, está de acordo com os estudos em seres humanos (Moreno, 2002; Barroso-Freitas et al., 2009; Fantauzzi, 2009), supondo que os animais se achavam infectados com *L. braziliensis*. Ao relatarmos o ciclo urbano e doméstico, observa-se a característica histórica da LTA em acometer majoritariamente indivíduos do sexo masculino, estando mais relacionada com a exposição do que com a susceptibilidade.

Do mesmo modo, a semelhança ($p > 0,05$) entre as Regionais administrativas, indica o mesmo padrão de fatores de risco para a infecção, como a presença de roedores, o acúmulo de lixo, o esgoto a céu aberto próximo às casas, a densidade populacional, o tipo de construção das casas e a presença de animais atrativos aos flebotomíneos (Moreno, 2002; Marcelino et al., 2011).

Quanto à comparação das técnicas sorológicas, estudos avaliando RIFI e ELISA vêm sendo amplamente realizados. Apontam, em sua maioria, para elevadas sensibilidade, especificidade, além de expressiva concordância entre as técnicas (Pedras et al., 2003; Ferreira et al., 2007; Szargiki et al., 2009; Barroso-Freitas et al., 2009; Arjona-Jiménez et al., 2012).

Entretanto, isso parece se aplicar a estudos com escolha muito rigorosa dos indivíduos

utilizados. A comparação entre pacientes sintomáticos e/ou parasitologicamente positivos e controles negativos, oriundos de áreas não endêmicas, canis experimentais, livres de patógeno específicos ou previamente negativos em outros testes sorológicos e parasitológicos predispõe a obtenção de melhores índices de acurácia.

Na avaliação da confiabilidade e acurácia de métodos diagnósticos faz-se necessária a abordagem de alguns percalços, sendo o verdadeiro desafio do teste sorológico representado nos trabalhos de campo, nos quais o histórico de infecção e exposição não está objetivamente documentado.

Ferreira et al. (2007) relataram queda na concordância entre testes sorológicos quando se abordam grupos distintos. Nos pacientes sintomáticos para LVC, o índice Kappa entre RIFI e ELISA foi de 0,72 (boa), enquanto nos oligosintomáticos e assintomáticos foi de 0,57 (regular) e 0,18 (fraca) respectivamente. Quanto à especificidade dos testes, o índice diminuiu ($p < 0,05$) na RIFI e no ELISA, de 100% para 45% e 60%, respectivamente, quando comparados um grupo composto somente por pacientes sintomáticos para LVC e outro grupo misto, com pacientes infectados por outros patógenos.

Em região endêmica pra LTA, Reithinger et al. (2003) determinaram positividade de

76,90% no ELISA entre cães sintomáticos enquanto nos assintomáticos o valor encontrado foi de 23,60%. Em seres humanos, a avaliação sorológica de pacientes confirmados apresentou positividade de 84,20% no ELISA e 80,40% na RIFI, enquanto no grupo dos pacientes suspeitos esses índices foram de 68,00% e 66,50% (Marques et al., 2006).

Um dos motivos da fraca concordância aqui apresentada deve-se à característica do estudo e à população avaliada, na qual provavelmente coexistem animais em distintos momentos de infecção e/ou doença.

As características intrínsecas dos testes também podem ter contribuído para a discordância entre os mesmos. Especula-se o fato do ELISA ter sido padronizado de forma a torná-lo muito específico. Considerando-se que os controles negativos utilizados para a padronização da técnica eram potros de fêmeas residentes na área endêmica do estudo, a chance das mesmas apresentarem anticorpos anti-*Leishmania* é expressiva. Dessa forma, apesar de apresentarem somente 24 e 48 horas de vida, o colostro já havia sido mamado pelos potros, havendo dessa forma a transferência de imunidade passiva. Corroborando essa hipótese, Barbosa-Santos et al. (1994) relatam que o potro nascido de égua

positiva, apresentou títulos na RIFI de 1:40 e 1:80 logo após o nascimento e um mês depois, respectivamente.

Já a técnica da RIFI apresenta a característica de subjetividade que, aliada à pouca experiência do avaliador pode resultar em maiores reações inespecíficas (Szargiki et al., 2009). Além disso, o ponto de corte escolhido em 1:40 foi baseado na maioria dos estudos em seres humanos e, principalmente na recomendação do MS para o diagnóstico da LVC. Entretanto, há alguns autores que utilizam o título de 1:80 em pacientes humanos (Passos et al., 2000). Dentre os casos caninos há extensa discussão na literatura acerca da utilização deste título para o diagnóstico em áreas endêmicas. Assim, caso o título escolhido nesse trabalho para diagnóstico positivo na RIFI fosse alterado para 1:80, o índice do kappa entre RIFI e ELISA apresentaria uma concordância moderada. Como este trabalho representa um dos poucos trabalhos em equinos que utilizam esta técnica no diagnóstico da leishmaniose equina, a decisão do ponto de corte mais confiável para um inquérito sorológico representa uma tarefa complexa.

Outra hipótese para a discrepância entre a positividade dos testes sorológicos está relacionada ao momento de infecção. Não se discute que a principal linha de defesa

contra leishmanioses cutâneas é a resposta imune celular. Entretanto, ainda há discrepâncias quanto ao momento de início e, principalmente quanto à manutenção da resposta imune humoral.

Na LV, dentro da população canina, pode ocorrer grande variabilidade quanto à resposta imune frente à infecção por *L. infantum*. Há cães com elevada concentração de anticorpos, facilmente detectados pelas metodologias disponíveis. Por outro lado, há animais com sinais típicos da doença, porém com sorologia duvidosa ou negativa devido à imunossupressão (Fisa et al., 2001). Existem cães sem manifestações clínicas da LV com concentrações variáveis de anticorpos e manifestação da doença após longo período. Há, também, aqueles animais infectados e resistentes, caracterizados por apresentarem altas concentrações séricas de interferon-gama e ausência de sinais clínicos por toda a vida (Alvar et al., 2004). Este panorama complexo certamente gera importantes variações nas medidas de acurácia e concordância dos testes sorológicos.

Alguns autores relatam a ocorrência da defesa humoral somente durante a fase ativa da doença, com o aparecimento de baixos títulos de imunoglobulinas, desaparecendo alguns meses após o final do tratamento,

representando uma resposta temporária em seres humanos (Romero et al., 2005; Zeyrek et al., 2007).

No trabalho de Pedras et al. (2003), essa queda só foi perceptível pela técnica do ELISA, para imunoglobulinas IgG totais e do subtipo IgG3, não sendo detectada no teste da RIFI que se manteve positivo após cura das lesões.

Guevara et al. (1994), trabalhando com seres humanos naturalmente infectados e sob tratamento, não detectaram queda de títulos após cicatrização completa das lesões. Em infecção experimental canina, Pirmez et al. (1988) acompanharam os animais até 20 meses após a inoculação e demonstraram a dinâmica das imunoglobulinas que variaram durante as coletas mensais sem no entanto negativarem.

No caso equino relatado por Barbosa-Santos et al. (1994), no qual foi utilizada a RIFI como uma das técnicas diagnósticas, o título decaiu de 1:320 na fase aguda e sintomática da enfermidade, para 1:80, 11 meses após tratamento e cicatrização total das lesões.

Por se tratar de zona endêmica para LTA, o provável contato da maioria dos equinos do município de Belo Horizonte com o parasito, pode ter resultado em manutenção

de títulos na RIFI sem, no entanto, sustentação de reatividade detectável no ELISA padronizado nesse estudo.

A diferença ($p < 0,05$) encontrada entre as regionais no teste do ELISA (Fig.10) e o nível de significância muito próximo à 0,05 (Fig.12) também apontam pra a tendência de detecção de anticorpos de infecção recente no ELISA e de infecção anterior na RIFI. Essa hipótese é sustentada pelo possível momento de introdução da doença na população. As Regionais que apresentaram maior positividade na RIFI e menor no ELISA são localidades de menor poder aquisitivo, com índices socioeconômicos mais baixos e com provável introdução da doença em momento anterior às demais localidades. As Regionais Pampulha e Venda Nova são localidades com melhores índices sócio econômicos. Entretanto, recentemente veem passando por alterações com maiores índices de densidade populacional, tráfego de pessoas, acúmulo de lixo e moradias na periferia com menores serviços de saneamento básico. Dessa forma, sugere-se que a introdução das leishmanioses nessas regionais possa ser mais recente, resultando na detecção de maiores índices no ELISA.

Corroborando esta hipótese, no Estado do Paraná, Castro et al. (2007) detectaram positividade no teste do ELISA em 20,50%

e 18,40% na população canina das Regiões Central e Noroeste, localidades estas que apresentam relatos de LTA humana desde o ano de 2002 e 1990, respectivamente. Já na Região do Vale do Ribeira, onde a doença é prevalente desde a década de 1920, a positividade em cães foi inferior às demais, com 6,30% de animais positivos. No citado trabalho não foi realizada a RIFI, não havendo dados para comparação entre as técnicas.

A sensibilidade de um teste representa a probabilidade de um resultado ser positivo quando a doença está realmente presente. A especificidade indica esta proporção em relação aos testes negativos, indicando o percentual de indivíduos sem a doença que apresentam teste negativo. O valor preditivo positivo (VPP) expressa a probabilidade de um resultado positivo representar realmente a presença da doença, enquanto o valor preditivo negativo (VPN) representa a probabilidade da doença não estar presente quando um teste apresenta resultado negativo (Barroso-Freitas et al., 2009).

Os índices de sensibilidade e especificidade apresentam maior relevância quando se trata do diagnóstico em pacientes suspeitos e na busca de um diagnóstico definitivo, enquanto nos ensaios epidemiológicos os índices de VPP e VPN são mais informativos.

Utilizando a mesma metodologia do presente trabalho, com cepa de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) como antígeno, Barroso-Freitas et al. (2009) obtiveram para a RIFI, 73,4% de valor preditivo positivo e 94,7% de valor preditivo negativo. Tais índices no ELISA foram de 100% e 97,5%.

Extrapolando os valores encontrados por Barroso-Freitas et al. (2009) para o presente estudo, determina-se que 100% dos animais positivos no ELISA são verdadeiramente positivos (87) e 73,4% dos animais positivos na RIFI (100). Assim, estima-se uma soroprevalência para infecção por *L. braziliensis* de 41,43% (87/210) pelo método do ELISA e de 47,62% (100/210) pelo o método da RIFI no município de Belo Horizonte.

4.2.5 Avaliação clínica

Nos dias em que foram realizadas as coletas, realizaram-se exame clínico no maior número possível de animais. A realização em todos foi impossibilitada, ora

pela alta demanda de vacinações, ora pela falta de estrutura adequada para contenção do animal, nas URPV's.

4.2.5.1 Inspeção

Setenta e nove (79) animais foram submetidos ao exame clínico. À inspeção observou-se 81,01% (n=64) dos animais com comportamento alerta, 16,50% (n=13) apáticos e 2,50% (n=2) agressivos. Analisando-os de acordo com os grupos não reativos e reativos nas técnicas sorológicas, não foi determinada diferença ($p>0,05$) na distribuição de frequência para o comportamento (Tab.15). Independente do resultado apresentado pela sorologia, 81,01% (64/79) dos animais estavam alertas e apenas 16,46% (13/79) apáticos.

Quanto ao ECC, 52 (65,82%) animais apresentavam índice igual ou superior a três e 27 (34,18%) estavam na faixa considerada abaixo do ideal com índice menor que três. Não houve diferença na distribuição entre os grupos dos resultados sorológicos (Tab.16).

Tabela15. Comparação do comportamento entre os animais não reativos e reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Amostras Comportamento	Não reativo (n,%)	RIFI (n,%)	ELISA (n,%)	RIFI +ELISA (n,%)
Alerta	10 (66,67)	28 (84,85)	8 (88,90)	18 (81,80)
Apático	3 (20,00)	5 (15,15)	1 (11,10)	4 (18,20)
Agressivo	2 (13,33)	0	0	0
Total	15 (100)	33 (100)	9 (100)	22 (100)

Teste do Qui-quadrado, $p=0,153$.

Tabela 16: Comparação do escore de condição corporal (ECC) entre os animais não reativos e reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Amostras ECC	Não reativo	RIFI	ELISA	RIFI + ELISA
< 3	4/27 (14,81%)	10/27 (37,04%)	5/27 (18,52%)	8/27 (29,63%)
≥ 3	11/52 (21,15%)	24/52 (46,15%)	4/52 (7,70%)	13/52 (25,00%)

Teste do Qui-quadrado, $p > 0,05$

Trinta e quatro animais (43,03%) apresentaram lesão ou alteração dermatológica como nódulo ou alopecia. Analisando-os dentro dos grupos sorológicos, não houve diferença ($p > 0,05$) na resposta humoral entre animais com ou sem lesão, com as técnicas agrupadas ou separadamente (Tab.17 e18).

Quanto à localização, os membros foram mais acometidos com 38,24% (13/34), seguidos de distribuição difusa (20,59%), cabeça (17,65%), dorso (17,65%) e

cernelha (5,88%) (Fig.16; Fig.17). A distribuição é similar àquela encontrada no ser humano com LT e próxima das descritas pelos pesquisadores europeus em equinos com LV. A maior ocorrência de lesões, seja por *L. braziliensis* ou *L. infantum*, ocorre nos membros inferiores e superiores, cabeça, tronco, abdome e genitália (Aguilar et al., 1984; Nogueira e Sampaio, 2001; Passos et al., 2001; Marques et al., 2006; Brasil, 2010).

Tabela17: Comparação dos animais com ou sem lesão, de acordo com a reatividade, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Amostras Lesão	Ausente	Presente	Total
Não reativas	9 (60,00)	6 (40,00)	15 (100,00)
Reativas	36 (56,25)	28 (43,75)	64 (100,00)

Teste do Qui-quadrado, $p = 0,792$

Tabela 18: Comparação dos animais com ou sem lesão, de acordo com a reatividade e técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp. Belo Horizonte, 2012.

Técnica sorológica	Lesão		Total
	Ausente	Presente	
Não-reativas	9 (60,00)	6 (40,00)	15 (100,00)
RIFI	18 (54,55)	15 (45,45)	33 (100,00)
ELISA	6 (66,67)	3 (33,33)	9 (100,00)
RIFI + ELISA	12 (54,55)	10 (45,45)	22 (100,00)
Total	45	34	79

Teste Qui-quadrado, $p = 0,912$

Müller et al. (2009), estudando cavalos da Alemanha e Suíça, detectaram 66,67% (6/9) de nódulos causados por *L. infantum* localizados na cabeça. A região genital, tanto em fêmeas quanto em machos, apresenta-se como um dos locais de predileção entre os casos relatados de equinos (Vexenat et al., 1986; Yoshida et al., 1988; Barbosa-Santos et al., 1994; Solano-Gallego et al., 2003).

Dentre os asininos (*Equus asinus*), Bonfante-Garrido et al. (1981) determinaram 76,5% (13/17) de lesões na bolsa escrotal, sendo descrito também casos no pênis, cauda e orelha (Aguilar et al.,

1984). Morales et al. (2010) descrevem lesões típicas de LTA, comprovadas por imuno-histoquímica, no prepúcio, nos membros e nas regiões cervical, axilar e glútea.

A não detecção de lesões na região genital pode estar relacionada à falta de diagnóstico, pois na realização do exame físico, as circunstâncias poucas vezes permitiram a análise da genitália em fêmeas e a tornava impraticável nos machos. A propensão para o maior relato nessa região pode estar relacionada à maior facilidade de repasto sanguíneo dos flebotomíneos vetores em regiões glabras.



Figura 16: Lesão sugestiva de leishmaniose. Equino examinado na URPV Delta, na Regional Noroeste, apresentando lesão no chanfro, com formato arredondado, crostosa e com bordas elevadas. Belo Horizonte, 2012.

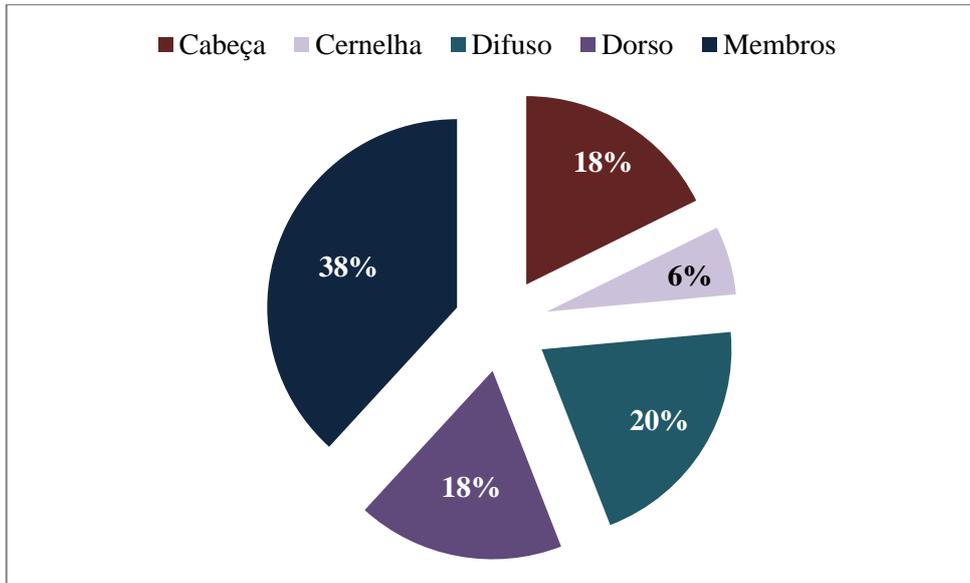


Figura 17: Distribuição da localização das lesões encontradas em 34 equinos de tração no município de Belo Horizonte, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Quando se analisou os animais com lesão, seis (17,65%) foram negativos em ambas as técnicas sorológicas e 28 (82,35%) foram positivos. Dez (29,41%) foram positivos em ambas as técnicas apresentando títulos na

RIFI de 1:40 (6/9), 1:80 (3/9) e 1:160 (1/9). Quinze (44,12%) foram positivos somente na RIFI e três (8,82%) somente no ELISA (Fig.18).

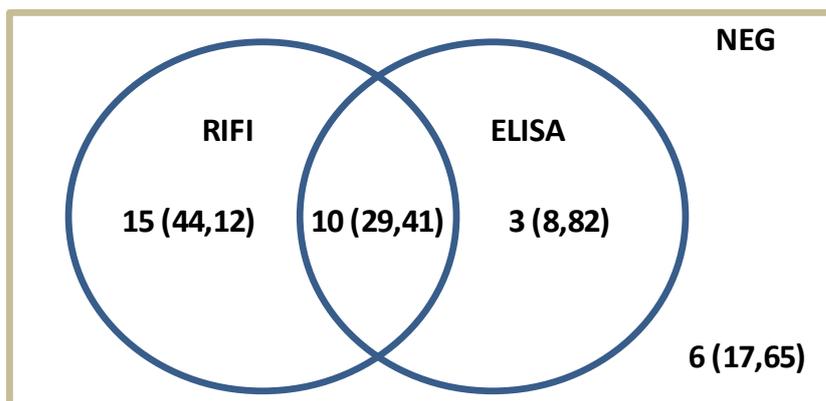


Figura 18: Distribuição das amostras reativas e não reativas, dos animais que apresentavam lesão ao exame clínico, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp. de acordo com a técnica sorológica. Belo Horizonte, 2012 (n=34).

Deve-se considerar a *L. braziliensis* como um possível agente etiológico de lesões cutâneas em equinos, pois 82,35% dos animais suspeitos apresentaram positividade em pelo menos uma técnica sorológica e 29,41% em ambas. Considerando o fato dos casos descritos no país serem, até o momento, exclusivos por esta espécie, sugere-se a inclusão de tal afecção como diagnóstico diferencial na rotina da Clínica Médica Equina de áreas endêmicas para LTA.

Apesar da alta reatividade nos animais com lesão, na análise dos animais sorologicamente positivos, 43,75% (28/64) apresentaram alteração dermatológica, embora estivesse ausente em 56,25% (36/64). Salienta-se, ainda, proporção de animais sorologicamente positivos em ambas as técnicas mas sem alteração dermatológica aparente (54,55%), corroborando com a hipótese dos equinos do município de Belo Horizonte estarem em contato com os agentes *L. braziliensis* e *L. infantum*, apresentando a infecção, tanto nas formas clínicas quanto oligossintomática, assintomática e/ou auto limitante, podendo representar um mantenedor do ciclo de ambos os parasitos na natureza.

4.2.5.2 Índices paramétricos

A média da frequência cardíaca e a temperatura retal apresentaram diferença ($p < 0,05$), quando se comparou os animais reativos e não reativos à *Leishmania* sp. (Tab.19). Ao desmembrar os grupos sorológicos, os animais sororreagentes continuaram semelhantes, entretanto o grupo ELISA positivo apresentou maior frequência cardíaca quando comparado aos soronegativos (Tab. 20).

Considerando-se os índices paramétricos como abalizadores da condição clínica e metabólica do animal, observa-se um aumento em relação aos valores basais, tanto no grupo reativo quanto no não reativo, da FC, pulso e FR. Apesar dos animais reativos terem apresentado uma maior FC, este fato não pode ser atribuído somente à leishmaniose causada por *Leishmania* sp.. Há que se considerar o momento do exame clínico, realizado nas URPV's, muitas vezes durante o trabalho destes animais. O tempo decorrido entre a espera para a realização do exame e atividades decorrentes do cadastro e marcação dos animais, pode não ter sido suficiente para o retorno destes índices aos valores basais. Sabidamente o exercício é um dos fatores com interferência fisiológica nestes índices.

Tabela 19: Comparação dos índices paramétricos entre grupos de animais reativos e não reativos, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Parâmetro avaliado	Grupos experimentais		Valores de p
	Não reativos X ± SE	Reativos X ± SE	
TRetal (n=44)	37,66 ± 0,11 ^B	38,02 ± 0,06 ^A	0,0125
FC (n=78)	44,40 ± 1,33 ^B	47,86 ± 0,80 ^A	0,0533
Pulso (n=64)	43,58 ± 1,65	45,06 ± 0,93	0,4846
FR (n=69)	28,60 ± 3,05	26,81 ± 1,92	0,3468
TPC (n=78)	2,13 ± 0,13	2,13 ± 0,06	0,9807

X: Média; SE: Erro padrão; TRetal: Temperatura retal; FC: Frequência Cardíaca; FR: Frequência Respiratória; TPC: Tempo de preenchimento capilar.

Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si, $p < 0,05$.

Tabela 20: Comparação dos índices paramétricos entre grupos de animais reativos e não reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Parâmetro avaliado	Grupos experimentais			
	Não reativas X ± SE	RIFI X ± SE	ELISA X ± SE	RIFI + ELISA X ± SE
TRetal (n=44)	37,66 ± 0,11	38,06 ± 0,09	37,95 ± 0,22	37,97 ± 0,09
FC (n=78)	44,40 ± 1,33 ^B	48,09 ± 1,2 ^{AB}	51,25 ± 1,25 ^A	46,27 ± 1,28 ^{AB}
Pulso (n=64)	43,58 ± 1,65	45,54 ± 1,44	46,50 ± 2,82	43,90 ± 1,30
FR (n=69)	28,60 ± 3,05	28,77 ± 2,96	23,00 ± 3,45	24,83 ± 2,71
TPC (n=78)	2,13 ± 0,13	2,09 ± 0,1	2,37 ± 0,26	2,09 ± 0,06

X: Média; SE: Erro padrão; TRetal: Temperatura retal; FC: Frequência Cardíaca; FR: Frequência Respiratória; TPC: Tempo de preenchimento capilar.

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si. Teste de Student Newman Keuls, $p = 0,047$.

4.2.5.3 Avaliação clínica das mucosas e linfonodos

Na comparação dos grupos não reativos e reativos, não foi encontrada diferença ($p > 0,05$) na avaliação das mucosas (Tab. 21) nem dos linfonodos (Tab. 22). Observa-se um pequeno número de animais em cada grupo, o que interfere na realização do teste de Qui-quadrado, pela sobreposição do intervalo de confiança. Além disso, ressalva-se que a poluição presente no

centro urbano e o trabalho característico dos animais avaliados no presente estudo podem contribuir para alteração da coloração das mucosas, principalmente ocular e nasal, representando mais um fator para não distinção dos grupos.

Romero et al. (2005) relataram associação significativa entre maiores níveis de anticorpos e linfonodos aumentados, em seres humanos sintomáticos e com teste parasitológico confirmado para infecção por

L. braziliensis. Em inoculação experimental realizada por Cerqueira et al. (2003), com *L. infantum* em asininos, foi observado aumento dos linfonodos pré-escapulares, à necrópsia. Os resultados aqui apresentados diferem dos da literatura, provavelmente

por se tratar de um levantamento, o qual normalmente inclui fração representativa de animais assintomáticos. Além disso, novamente alerta-se para a condição oligossintomática dos equinos sororreagentes.

Tabela 21: Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com o exame físico das mucosas, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Mucosa	Não reativas (n, %)	Amostras reativas		
		RIFI (n, %)	ELISA (n, %)	RIFI + ELISA (n, %)
➤ Mucosa Oral				
Hipercorada	2 (13,33)	4 (12,12)	1 (12,50)	2 (9,10)
Hipocorada	3 (20,00)	3 (9,10)	0	1 (4,55)
Normal	10 (66,67)	26 (78,78)	7 (87,50)	19 (86,36)
Total	15 (100,00)	33 (100,00)	8 (100,00)	22 (100,00)
➤ Mucosa Ocular				
Hipercorada	8 (53,33)	23 (74,20)	4 (50)	10 (45,45)
Hipocorada	2 (13,33)	1 (3,23)	1 (12,50)	1 (4,55)
Normal	2 (13,33)	0	1 (12,50)	2 (9,10)
Ictérica	3 (20,00)	7 (22,57)	2 (25,00)	9 (40,40)
Total	15 (100)	31 (100)	8 (100)	22 (100)
➤ Mucosa Nasal				
Hipercorada	7 (50,00)	13 (43,33)	4 (50,00)	6 (27,27)
Normal	7 (50,00)	17 (56,67)	4 (50,00)	16 (72,73)
Total	14 (100,00)	30 (100,00)	8 (100,00)	22 (100,00)

Teste do Qui-quadrado, $p > 0,05$.

Tabela 22: Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com o exame físico dos linfonodos, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Linfonodo	Não reativas (n, %)	Amostras reativas		
		RIFI (n, %)	ELISA (n, %)	RIFI + ELISA (n, %)
➤ Linfonodo Submandibular				
Reativo	6 (40,00)	15 (45,45)	3 (33,33)	7 (31,82)
Normal	9 (60,00)	18 (54,55)	6 (66,67)	15 (68,18)
Total	15 (100,00)	33 (100,00)	9 (100,00)	22 (100,00)
➤ Linfonodo Parotídeo				
Reativo	2 (15,38)	13 (39,39)	2 (25,00)	8 (36,36)
Normal	11(84,62)	20 (60,61)	6 (75,00)	14 (63,63)
Total	13 (100,00)	33 (100,00)	8 (100,00)	22 (100,00)
➤ Linfonodo Cervical Superficial				
Reativo	1 (6,67)	7 (21,21)	0	4 (18,18)
Normal	14 (93,33)	26 (78,79)	8 (100,00)	18 (81,82)
Total	15 (100,00)	33 (100,00)	8 (100,00)	22 (100,00)
➤ Linfonodo subilíaco				
Reativo	7 (46,67)	20 (62,50)	3 (37,50)	6 (28,57)
Normal	8 (53,33)	12 (37,50)	5 (62,50)	15 (71,43)
Total	15 (100,00)	32 (100,00)	8 (100,00)	21 100,00)

4.2.6 Hemograma

4.2.6.1 Eritrograma e plaquetograma

Na avaliação do eritrograma e índices hematimétricos, comparando-se a reatividade nos testes de ELISA e RIFI, todos os grupos apresentaram valores dentro da referência (Tab. 23). As coletas foram pontuais, não sendo possível a avaliação de elevação ou queda dos valores, em relação à reatividade ou não nos testes sorológicos para LTA. Apesar disto, as médias encontradas devem ser analisadas

sob a perspectiva clínica, já que os valores de referência possuem grande amplitude pela necessidade de contemplarem diferentes amostras em relação ao sexo, tipo de trabalho, faixas de idade e métodos laboratoriais distintos.

O grupo RIFI positivo apresentou médias maiores ($p < 0,05$), em relação ao volume globular médio (VGM), quando comparado aos grupos ELISA positivo e animais não reativo (Tab.23; $p < 0,05$). O VGM expressa o tipo de anemia presente (normocítica,

macrocítica ou microcítica). Possivelmente, os animais estudados tenham apresentado uma tendência à anemia normocítica normocrômica (Tab.23), desencadeada por uma afecção crônica, que afetaria a disponibilidade de ferro para a eritropoese e o tempo médio de vida dos eritrócitos. Parece haver uma predisposição dos anticorpos detectados na técnica da RIFI referirem-se à infecções anteriores, enquanto as imunoglobulinas detectadas no ELISA apontariam para infecção recente e/ou aguda. Apesar desta observação, ressalva-se que todos os grupos apresentaram valores dentro da normalidade, demonstrando não ser um padrão de utilidade diagnóstica individual.

Os valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) diferiram entre os grupos RIFI e RIFI + ELISA, quando comparados com os das amostras não reativas ($p < 0,05$). O grau de anisocitose (RDW) diferiu entre os grupos reativos, sendo o grupo ELISA positivo maior que os grupos RIFI positivo e positivo em ambas as técnicas.

Comparando-se os animais de forma separada em amostras não-reativas e reativas em qualquer uma das técnicas, o grupo reativo apresentou maiores ($p < 0,05$) índices no hematócrito, VGM e HCM (Tab.24).

Tabela 23: Valores médios (média \pm erro padrão) do eritrograma e da plaquetometria entre os grupos de animais reativos e não reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Parâmetro avaliado	Amostras reativas			Amostras não-reativas (X \pm SE)
	RIFI (X \pm SE)	ELISA (X \pm SE)	RIFI + ELISA (X \pm SE)	
Hematócrito (%)	30,98 \pm 0,52	30,04 \pm 0,89	30,22 \pm 0,53	28,84 \pm 0,63
Hemoglobina (g/dl)	12,35 \pm 0,27	11,86 \pm 0,39	12,13 \pm 0,26	11,80 \pm 0,27
Eritrócitos (x10⁶ cels/μl)	7,29 \pm 0,17	7,04 \pm 0,22	7,05 \pm 0,13	7,4 \pm 0,20
VGM (fl)	41,14 \pm 0,47 ^A	39,57 \pm 0,67 ^B	40,95 \pm 0,55 ^{AB}	39,23 \pm 0,59 ^B
CHCM (pg)	41,61 \pm 0,56	42,64 \pm 0,25	42,24 \pm 0,25	41,49 \pm 0,41
HCM (pg)	17,12 \pm 0,33 ^A	16,88 \pm 0,32 ^{AB}	17,27 \pm 0,24 ^A	16,24 \pm 0,24 ^B
RDW (%)	19,26 \pm 0,19 ^B	20,04 \pm 0,12 ^A	19,57 \pm 0,14 ^B	19,71 \pm 0,20 ^{AB}
Plaquetas (x10³ cels/μl)	201,60 \pm 8,30	196,17 \pm 9,33	175,15 \pm 9,10	191,27 \pm 10,69

X: Média; SE: Erro padrão. Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$). Valores de referência: Hematócrito: 24-44; Hemoglobina: 8-14; Eritrócitos: 5,5-9,5; Volume globular médio(VGM): 37-58,5; Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM): 31-38; Hemoglobina Corpuscular Média (HCM): 12,3-19,7; Índice de anisocitose (RDW): 19-20%; Plaquetas: 120-256. Fonte: Jain (1993); Oliveira (2007).

Tabela 24: Valores médios (média \pm erro padrão) do eritrograma e da plaquetometria entre os grupos de animais reativos e não reativos, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Parâmetro avaliado	Amostras	
	Reativas	Não reativas
Hematócrito (%)	30,54 \pm 0,34 ^A	28,84 \pm 0,63 ^B
Hemoglobina (g/dl)	12,19 \pm 0,17	11,80 \pm 0,27
Eritrócitos (x 10 ⁶ céls/ μ l)	7,16 \pm 0,10	7,40 \pm 0,20
VGM (fl)	40,83 \pm 0,32 ^A	39,23 \pm 0,59 ^B
CHCM (pg)	42,02 \pm 0,27	41,49 \pm 0,41
HCM (pg)	17,14 \pm 0,18 ^A	16,24 \pm 0,24 ^B
RDW (%)	19,50 \pm 0,11	19,71 \pm 0,20
Plaquetas (x 10 ³ céls/ μ l)	190,20 \pm 5,48	191,27 \pm 10,69

X: Média; SE: Erro padrão. Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem (p<0,05).

Valores de referência: Hematócrito: 24-44; Hemoglobina: 8-14; Eritrócitos: 5,5-9,5; Volume globular médio(VGM): 37-58,5; Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM): 31-38; Hemoglobina Corpuscular Média (HCM): 12,3-19,7; Índice de anisocitose (RDW): 19-20%; Plaquetas: 120-256. Fonte: Jain (1993); Oliveira (2007).

Por mostrar resultados inespecíficos, mesmo para LVC, ainda há discussão na literatura acerca do valor dos exames hematológicos no diagnóstico das leishmanioses, apresentando maior relevância na avaliação do *status* clínico do animal (Reis et al., 2006). Os achados hematológicos mais constantes são anemia normocítica, normocrômica e não regenerativa (Reis et al., 2006) e trombocitopenia (Medeiros et al., 2008). A característica regenerativa encontrada no presente estudo e a ausência de trombocitopenia provavelmente estão relacionadas com o menor acometimento das células medulares por *Leishmania* sp. nos equinos.

4.2.6.2 Leucograma

Na avaliação do leucograma, os neutrófilos relativos foram maiores (p<0,05) no grupo ELISA positivo quando comparado ao grupo RIFI positivo. Em relação aos neutrófilos absolutos, o grupo RIFI positivo foi menor (p<0,05) do que todos os demais grupos Tab. 25).

Quanto aos linfócitos relativos, o grupo RIFI positivo apresentou maior (p<0,05) número quando comparado aos grupos reativo somente no ELISA e reativos em ambas as técnicas. Também observa-se diferença (p<0,05) na relação neutrófilo/linfócito, sendo esta maior nos grupos reativos somente no ELISA e reativo em ambas as técnicas quando

comparados ao grupo RIFI positivo (Tab. 25).

Na avaliação do leucograma entre as amostras não reativas e reativas em qualquer uma das técnicas, não houve diferença na maioria dos parâmetros avaliados ($p > 0,05$) (Tab. 26), com exceção para as médias de linfócitos absolutos ($p < 0,05$). Os grupos apresentaram neutrofilia e linfopenia relativas com

aumento da relação neutrófilo/linfócito (Tab.25). Este resultado pode representar um leucograma de estresse, decorrido ou de um estresse crônico do animal, ou do ambiente e momento da coleta. A agitação do animal libera corticosteróides que diminuem a leucodiapedese dos neutrófilos, aumentando sua concentração. O estresse crônico leva ainda à linfocitólise e impedimento da liberação dos linfócitos dos órgãos linfoproliferativos.

Tabela 25: Valores médios (média \pm erro padrão) do leucograma entre os grupos de animais reativos e não reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Parâmetro Avaliado	Amostras reativas			Amostras não reativas X \pm SE
	RIFI X \pm SE	ELISA X \pm SE	RIFI + ELISA X \pm SE	
Leucócitos Totais	10223,94 \pm 239,72	11275,22 \pm 681,86	11712,86 \pm 419,00	11606,33 \pm 606,71
Bas. Abs.	62,70 \pm 13,20	59,13 \pm 14,72	56,19 \pm 11,47	83,47 \pm 20,60
Bas. Relat.	0,60 \pm 0,12	0,57 \pm 0,14	0,54 \pm 0,11	0,67 \pm 0,15
Eos. Abs.	471,15 \pm 41,67	510,57 \pm 112,89	555,43 \pm 64,50	407,16 \pm 57,58
Eos. Relat.	4,59 \pm 0,49	4,35 \pm 0,73	4,89 \pm 0,56	3,39 \pm 0,36
Neut. Abs.	5974,00 \pm 201,80 ^B	7458,91 \pm 574,48 ^A	7439,51 \pm 345,50 ^A	7170,88 \pm 428,57 ^A
Neut. Relat.	58,39 \pm 1,32 ^B	65,30 \pm 2,35 ^A	62,90 \pm 1,29 ^{AB}	61,49 \pm 1,64 ^{AB}
Bast. Abs.	73,00 \pm 14,87	90,04 \pm 29,09	162,33 \pm 29,96	96,00 \pm 24,72
Bast. Relat.	0,72 \pm 0,15	0,83 \pm 0,27	1,40 \pm 0,26	0,98 \pm 0,28
Linf. Abs.	3163,90 \pm 140,22	2533,43 \pm 246,42	2822,25 \pm 145,86	3231,22 \pm 249,76
Linf. Relat.	31,03 \pm 1,20 ^A	23,43 \pm 2,12 ^B	24,49 \pm 1,02 ^B	27,96 \pm 1,51 ^{AB}
Mon. Abs.	479,14 \pm 39,03	622,91 \pm 91,76	677,46 \pm 60,17	615,55 \pm 66,22
Mon. Relat.	4,66 \pm 0,35	5,52 \pm 0,72	5,78 \pm 0,46	5,49 \pm 0,56
Relação N:L	2,30 \pm 0,16 ^B	3,70 \pm 0,51 ^A	3,03 \pm 0,19 ^A	2,88 \pm 0,33 ^{AB}

X: Média; SE: Erro padrão; Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$).

Valores de referência (Jain, 1993): Leucócitos Totais: 5200-13900 cels/ μ l; Basófilo absoluto (Bas.Abs.): 0-290 cels/ μ l; Basófilos relativo (Bas. Relat.): 0-4%; Eosinófilo absoluto (Eos. Abs.): 100-1000 cels/ μ l; Eosinófilo relativo (Eos. Relat.): 0-10%; Neutrófilo absoluto (Neut.Abs.): 2200-8500 cels/ μ l; Neutrófilo relativo (Neut. Relat.): 35-75%; Bastonete absoluto (Bast.Abs.): 0-1000 cels/ μ l; Bastonete relativo (Bast. Relat.): 0-2%; Linfócito absoluto (Linf. Abs.): 1500-7000 cels/ μ l; Linfócito relativo (Linf. Relat.): 15-50%; Monócito absoluto (Mon.Abs.): 0-1000 cels/ μ l; Monócito relativo (mon.Relat.): 0-7%; Relação Neutrófilo/Linfócito (N:L): 1:2-1:3.

O percentual de linfopenia nos animais positivos nos testes de ELISA e da RIFI, foi de 21,74% e 10,96%, respectivamente. No estudo de Medeiros et al. (2008) foi observada linfopenia em 34,50% dos cães sororreagentes para LV. Acredita-se que a linfopenia ocorra pelo confinamento temporário dos linfócitos no baço e/ou linfonodos enquanto respondem ao agente infeccioso ou pela destruição linfocitária diretamente pelas *Leishmania* sp..

Embora não tenha sido detectada diferença ($p < 0,05$) entre os animais não reativos e reativos somente no teste de ELISA, 30,43% dos animais positivos apresentaram leucocitose e 34,78% neutrofilia. Ao se considerar apenas os positivos na RIFI, 17,81% e 6,85% apresentaram leucocitose e leucopenia, respectivamente. Estes achados apontam para a presença de uma resposta inflamatória sistêmica nestes animais.

Tabela 26: Valores médios (média \pm erro padrão) do leucograma entre os grupos de animais reativos e não reativos, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Parâmetro avaliado	Amostras	
	Reativas	Não reativas
Leucometria Total	10975,41 \pm 228,88	11606,33 \pm 606,71
Basófilo absoluto	59,57 \pm 7,81	83,47 \pm 20,60
Basófilo relativo	0,57 \pm 0,08	0,67 \pm 0,15
Eosinófilo absoluto	510,75 \pm 35,90	407,16 \pm 57,58
Eosinófilo relativo	4,68 \pm 0,30	3,39 \pm 0,36
Neutrófilo absoluto	6779,60 \pm 193,79	7170,88 \pm 428,57
Neutrófilo relativo	61,22 \pm 0,88	61,49 \pm 1,64
Bastonete absoluto	111,34 \pm 14,73	96,00 \pm 24,72
Bastonete relativo	1,01 \pm 0,13	0,98 \pm 0,28
Linfócito absoluto	2934,45 \pm 94,73 ^B	3231,22 \pm 249,76 ^A
Linfócito relativo	27,29 \pm 0,79	27,96 \pm 1,51
Monócito absoluto	579,78 \pm 33,41	615,55 \pm 66,22
Monócito relativo	5,24 \pm 0,27	5,49 \pm 0,56
Relação N:L	2,80 \pm 0,13	2,88 \pm 0,33

X: Média; SE: Erro padrão; Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$).

Valores de referência (Jain, 1993): Leucócitos Totais: 5200-13900 cels/ μ l; Basófilo absoluto: 0-290 cels/ μ l; Basófilos relativo: 0-4%; Eosinófilo absoluto: 100-1000 cels/ μ l; Eosinófilo relativo: 0-10%; Neutrófilo absoluto: 2200-8500 cels/ μ l; Neutrófilo relativo: 35-75%; Bastonete absoluto: 0-1000 cels/ μ l; Bastonete relativo: 0-2%; Linfócito absoluto: 1500-7000 cels/ μ l; Linfócito relativo: 15-50%; Monócito absoluto: 0-1000 cels/ μ l; Monócito relativo: 0-7%; Relação Neutrófilo/Linfócito (N:L): 1:2-1:3.

4.2.7 Perfil protéico

Apesar dos valores encontrados na avaliação da proteína total estarem dentro dos de referência citados por Robinson (1997), observou-se médias superiores nos animais ELISA positivos, quando comparados àqueles animais cujas amostras não foram reativas ($p < 0,05$). O aumento observado no grupo ELISA positivo (Tab.27), possivelmente está relacionado à

infecção recente e altas concentrações de imunoglobulinas. Esta suposição poderia ser confirmada pela realização do perfil eletroforético e diferenciação das α , β e δ globulinas.

Na avaliação das amostras, entre positivas em qualquer um dos testes e negativas, observou-se diferença ($p < 0,05$) na concentração das proteínas totais, albumina e fibrinogênio (Tab. 28).

Tabela 27: Valores médios (média \pm erro padrão) do perfil protéico entre os grupos de animais reativos e não reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Variável	Amostras reativas			Amostras não-reativas
	RIFI (X \pm SE)	ELISA (X \pm SE)	RIFI + ELISA (X \pm SE)	
Albumina	2,83 \pm 0,05	2,84 \pm 0,06	2,82 \pm 0,05	2,64 \pm 0,07
Proteínas totais	7,20 \pm 0,05 ^{AB}	7,44 \pm 0,15 ^A	7,37 \pm 0,09 ^{AB}	7,09 \pm 0,09 ^B
Fibrinogênio	265,15 \pm 31,10 ^{AB}	259,09 \pm 54,52 ^{AB}	218,33 \pm 31,40 ^B	328,26 \pm 36,47 ^A

X: Média; SE: Erro padrão. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem ($p < 0,05$).

Valores de referencia (Robinson,1997); Albumina: 2,4-4,0 mg/dl; Proteínas totais: 5,2-7,9 mg/dl; Fibrinogênio: 100 – 400 mg/dl

Tabela 28: Valores médios (média \pm erro padrão) do perfil protéico entre os grupos de animais reativos e não reativos, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Parâmetro avaliado	Amostras		Significância P
	Reativas	Não reativas	
Albumina	2,83 \pm 0,03 ^A	2,64 \pm 0,07 ^B	0,0318
Proteínas totais	7,31 \pm 0,05 ^A	7,09 \pm 0,09 ^B	0,0265
Fibrinogênio	245,27 \pm 20,44 ^B	328,26 \pm 36,47 ^A	0,0129

Valores de referência (Robinson,1997); Albumina: 2,4-4,0 mg/dl; Proteínas totais: 5,2-7,9 mg/dl; Fibrinogênio: 100 – 400 mg/dl

Em 45,83% dos animais RIFI positivo e em 34,78% dos animais ELISA positivo, observou-se uma diminuição da concentração de albumina. É interessante observar que, em 26,09% dos animais ELISA positivo, a concentração de proteína total estava acima dos valores de referência (7,9 mg/dL), contrapondo aos resultados dos animais RIFI positivo, nos quais 9,59% dos animais se encontravam com a proteína aumentada e 2,74% abaixo dos valores de referência.

Nos cães infectados com *L. infantum*, a disproteinemia é uma característica marcante, caracterizada por hiperproteinemia. Os autores são unânimes quanto à composição do perfil eletroforético, havendo ativação policlonal das frações β e, responsável pelo aumento geral das gamaglobulinas. A diminuição da albumina nesses pacientes seria devido a perdas por nefropatia, doença hepática, subnutrição crônica ou até mesmo a combinação destes fatores (Costa-Val et al., 2007) ou por mecanismo compensatório pelo aumento das gamaglobulinas (Koutinas, 1999).

Como este estudo avaliou animais de forma aleatória, sem conhecimento prévio da presença da infecção por *Leishmania* sp. ou do momento desta nos casos positivos, as médias obtidas tanto para as concentrações

de proteína total, quanto aquelas para albumina e fibrinogênio, permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie. Desta forma, nos animais estudados as concentrações séricas de imunoglobulinas anti-*Leishmania* sp., não estão relacionadas com os valores protéicos obtidos. Há que se considerar que as leishmanioses tegumentares apresentam resposta imune humoral em menor grau quando comparadas à LV. Somando-se a isto, há necessidade de estudos em equinos com uma maior amostragem de animais positivos e presença da forma clínica ativa, para se afirmar quais seriam as características protéicas mais marcantes.

4.2.8 Bioquímica de sangue

Na comparação dos perfis renal e hepático entre os grupos de animais reativos e não-reativos, de acordo com a técnica sorológica utilizada, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) nas concentrações séricas de uréia, creatinina, AST, ALT, GGT e FA (Tab. 29). A detecção de enzimas no soro como marcadores de danos teciduais é uma ferramenta básica nos testes laboratoriais. Esta análise auxilia no diagnóstico e prognóstico de doenças, além da indicação de funções anormais de determinados órgãos.

Apesar de não ter sido detectada diferença ($p>0,05$) na concentração sérica de uréia

entre os grupos, observa-se valores mais elevados da concentração sérica, de acordo com os valores de referência, em todos os grupos. Este aumento não foi acompanhado pelo aumento da concentração sérica de creatinina, que se manteve dentro dos limites de normalidade. Diante destes achados pode-se afirmar que os animais não apresentavam lesão renal, detectável por estes métodos. Entretanto, há que se ponderar ser a associação das dosagens séricas de uréia e creatinina um bom marcador renal, sem no entanto refletir o grau de lesão. Apenas quando a perda da função renal é superior a 60% a associação destes testes é eficaz em predizer o grau de injúria renal.

A concentração sérica de gama-glutamilttransferase apresentou-se elevada em todos os grupos, apesar de semelhante ($p>0,05$), sendo os valores encontrados indicativos de injúria orgânica. Em função desta enzima estar presente em vários tecidos, torna-se difícil precisar a sua origem, principalmente porque em todos os grupos a resposta média esteve cerca de 15

a 20% acima dos limites de normalidade.

Na comparação das enzimas hepáticas e renais, agrupando-se as amostras reativas nos testes de ELISA e RIFI, apenas as concentrações séricas de uréia diferiram ($p<0,05$) (Tab.30). Os valores médios, nos dois grupos, permaneceram acima dos valores de referência. Alguns autores consideram uma tolerância, dentro da normalidade, até a concentração de 51,5 mg/dl, embora este valor seja considerado elevado por outros autores (Meyer et al., 1995; Eckersall, 2008; Robinson, 1997). A elevação da uréia, sem alteração renal, ou seja, com valores de creatinina dentro dos limites de normalidade e ausência de proteinúria, pode indicar desidratação ou desequilíbrio metabólico com maior consumo endógeno de proteínas musculares (Braun e Lefebvre, 2008).

Outra hipótese levantada para os valores mais elevados de uréia seriam as perdas por suor ou menor ingestão de água, pois os animais se encontravam no momento da coleta do material em horário de trabalho.

Tabela 29. Comparação dos perfis renal e hepático entre os grupos de animais reativos e não reativos, de acordo com a técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Parâmetro avaliado	Amostras reativas			Amostras não-reativas
	RIFI (X ± SE)	ELISA (X ± SE)	RIFI + ELISA (X ± SE)	
Uréia	47,26 ± 1,73	49,13 ± 3,33	48,00 ± 1,64	53,04 ± 4,91
Creatinina	1,28 ± 0,03	1,22 ± 0,04	1,23 ± 0,03	1,37 ± 0,07
GGT	15,78 ± 0,74	14,52 ± 1,21	16,53 ± 0,94	15,54 ± 0,70
AST	276,01 ± 7,86	251,39 ± 21,00	291,84 ± 26,80	387,74 ± 111,91
ALT	7,04 ± 0,36	20,57 ± 10,62	7,04 ± 0,46	10,14 ± 2,85
FA	108,15 ± 4,32	106,26 ± 9,38	119,05 ± 7,18	112,24 ± 6,14

X: Média; SE: Erro padrão; (p>0,05). Valores de referencia (Meyer et al., 1995; Kaneko et al., 1997; Robinson, 1997): Uréia: 11-24 mg/dl; Creatinina: 0,9-2,0 mg/dl; GGT (gama glutamiltransferase): 4-13,4 UI/l; AST (Aspartato aminotransferase): 226-366 UI/l; ALT (Alanina aminotrasferase: 3-23 UI/l); FA (Fosfatase alcalina): 86-295 UI/l

Tabela 30: Valores médios (média ± erro padrão) dos perfis renal e hepático entre os grupos de animais reativos e não reativos, independente da técnica sorológica, em investigação da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp. Belo Horizonte, 2012.

Parâmetro avaliado	Amostras (x ± SE)		Significância P
	Reativas	Não reativas	
Uréia	47,82 ± 1,13 ^B	53,04 ± 4,91 ^A	0,0210
Creatinina	1,25 ± 0,02	1,37 ± 0,07	0,1487
GGT	15,90 ± 0,53	15,54 ± 0,70	0,6544
AST	278,81 ± 11,68	387,74 ± 111,91	0,2365
ALT	8,99 ± 1,56	10,14 ± 2,85	0,1420
FA	112,24 ± 3,74	112,24 ± 6,14	0,4519

X: Média; SE: Erro padrão. Valores de referencia (Meyer et al., 1995; Kaneko et al., 1997; Robinson, 1997): Uréia: 11-24 mg/dl; Creatinina: 0,9-2,0 mg/dl; GGT: 4-13,4 UI/l; AST: 226-366 UI/l; ALT: 3-23 UI/l); FA: 86-295 UI/l

Apesar de trabalhos descreverem alterações nos perfis renal e hepático de cães nos estádios avançados da LVC, tais achados são inespecíficos e, a ausência dos mesmos no presente estudo, provavelmente deve-se à diferença no parasitismo dos animais avaliados, que pode ser resultado tanto da infecção por *L. infantum* quanto por *L. braziliensis*.

Além disso, os perfis renal e hepático avaliados no presente estudo utilizaram parâmetros suficientemente confiáveis para detecção de alguma alteração nos devidos órgãos. Dessa forma os resultados sugerem o não acometimento renal e hepático de *Leishmania* sp. nos equinos de tração do município de Belo Horizonte.

4.3 Experimento III: Estudo comparativo das técnicas de RIFI, ELISA e PCR.

4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase

O diagnóstico molecular foi realizado em 148 animais por meio da técnica da PCR, em sangue total. No teste utilizando o iniciador para o gênero *Leishmania*, 16,20% (24/148) dos animais apresentaram banda de 90 pares de base (bp) referente à amplificação de gene codificador da enzima DNA Polimerase (Fig.19). Em todas as regionais houve a presença de animais positivos para o gênero *Leishmania* sp. (Tab. 31).

Os animais positivos foram testados, novamente, com iniciadores específicos para as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*, com 70,80% (17/24) e 37,50% (9/24) animais positivos, respectivamente (Fig.20; Fig.21). Destes animais, 25,00% (6/24) apresentaram infecção mista por ambas as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*, 45,83% (11/24) apenas para *L. braziliensis*, 12,5% (3/24) apenas para *L. infantum* e, 16,67% (4/24) foram negativos em ambos os testes específicos (Fig.22).

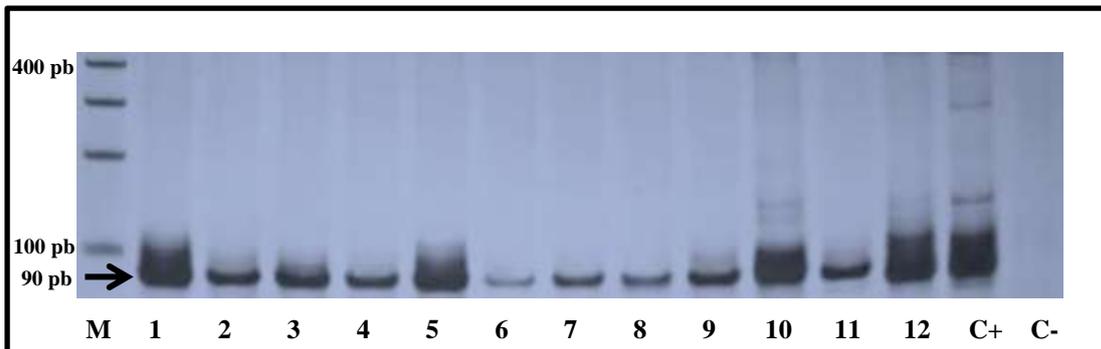


Figura 19: Gel de poliacrilamida a 5 %, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR específico para o gene da DNA Polimerase de *Leishmania* sp., em amostras de sangue total de equinos. M: Peso molecular 100 pb¹; C⁺: controle positivo da reação (DNA extraído de cultura da cepa MHOM/BR/70/BH46); C⁻: Controle negativo da reação (sem DNA); Canaletas 1 a 12: Amostras positivas, apresentando amplificação de fragmento de 90bp. Belo Horizonte, 2012.

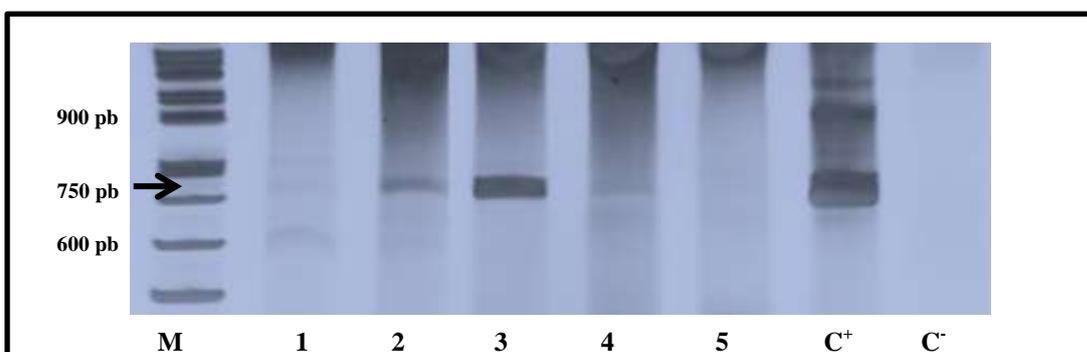


Figura 20: Gel de poliacrilamida a 5 %, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR específico para o complexo *L. braziliensis*, em amostras de sangue total de equinos. M: Peso molecular 1Kb; C⁺: controle positivo da reação (DNA extraído de cultura da cepa MHOM/BR/75/M2904); C⁻: Controle negativo da reação (sem DNA); Canaletas 1, 2, 3, 4: Amostras positivas, apresentando amplificação de fragmento de 750bp. Belo Horizonte, 2012.

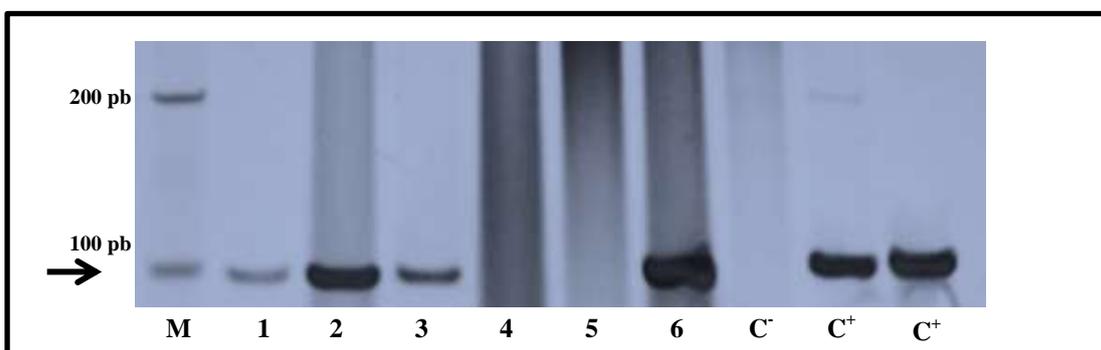


Figura 21: Gel de poliacrilamida a 5 %, corado pela prata, representativo da amplificação por PCR específico para o complexo *L. donovani*, em amostras de sangue total de equinos. M: Peso molecular 100pb; C⁺: controle positivo da reação (DNA extraído de cultura da cepa MHOM/BR/70/BH46); C⁻: Controle negativo da reação (sem DNA); Canaletas 1, 2, 3 e 6: Amostras positivas, apresentando amplificação de fragmento de 100bp. Belo Horizonte, 2012.

Tabela 31. Distribuição das amostras testadas pela técnica da PCR, com iniciadores para o gênero *Leishmania* sp., de acordo com as Regionais, em investigação da infecção equina por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Regional	Negativos (n,%)	Positivos (n,%)	Total (n, %)
Barreiro	14 (82,35)	3 (17,65)	17 (11,49)
Nordeste	19 (79,17)	5 (20,83)	24 (16,22)
Noroeste	21 (87,50)	3 (12,50)	24 (16,22)
Norte	20 (86,96)	3 (13,04)	23 (15,54)
Oeste	14 (82,35)	3 (17,65)	17 (11,49)
Pampulha	20 (80,00)	5 (20,00)	25 (16,89)
Venda Nova	16 (88,90)	2 (11,11)	18 (12,16)
Total	124 (83,78)	24 (16,22)	148 (100,00)

Teste Qui-quadrado, p=0,963.

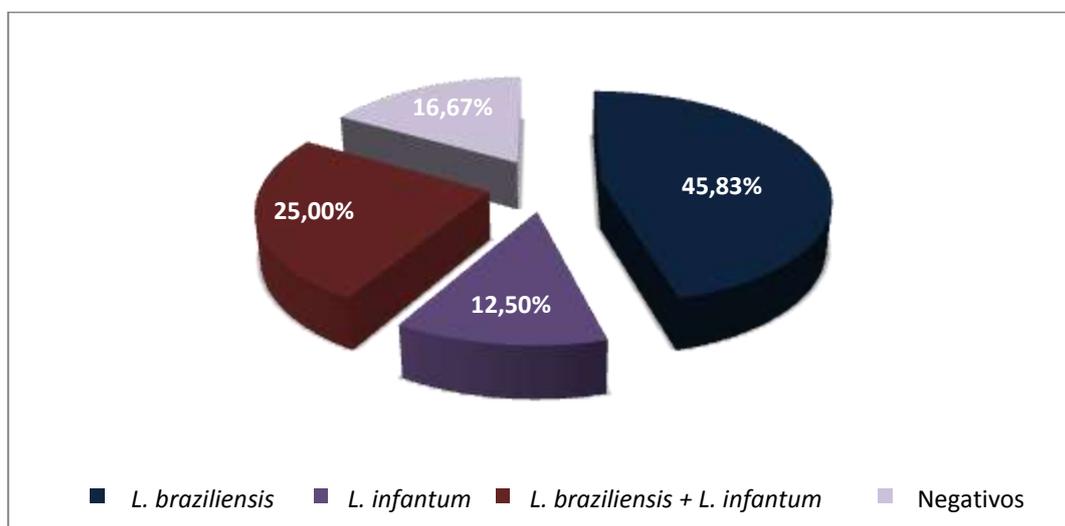


Figura 22: Distribuição das amostras positivas na técnica da PCR para o gênero *Leishmania*, após repetição com iniciadores específicos para as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*, em investigação da infecção equina por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Em todas as regionais administrativas foram encontrados animais positivos para *L. braziliensis* (70,83% - 17/24), sendo a Regional Nordeste (23,53% - 4/17) a mais prevalente, seguida da regional Pampulha (17,64% - 3/17) (Fig. 23).

Para o iniciador *L. infantum*, 37,50% (9/24) foram positivos. Em todas as regionais, exceto na Nordeste, foram detectados animais positivos. A maior positividade foi na regional Oeste (33,33% - 3/9), seguida pela Norte (22,22% - 2/9) e pelas regionais Barreiro, Noroeste, Pampulha e Venda

Nova (11,11% - 1/9) (Fig.23). A infecção exclusiva por tal espécie foi encontrada em 12,50% (3/24) dos animais positivos.

A infecção mista, para *L. braziliensis* e *L. infantum*, foi detectada em 25,00% (6/24) dos animais positivos, sendo dois na regional Oeste e um nas regionais Noroeste, Norte, Pampulha e Venda Nova.

Na avaliação da distribuição das amostras positivas, de acordo com o sexo, na técnica

de PCR para o gênero *Leishmania* sp., não foram observadas diferenças ($p > 0,05$). Entretanto, na avaliação para *L. infantum* o percentual de fêmeas positivas (77,78 – 7/9) foi superior ao de machos (22,22% - 2/9) ($p = 0,035$), não sendo verdadeiro o mesmo achado para os animais com *L. braziliensis* ($p > 0,05$ – Fig. 24).

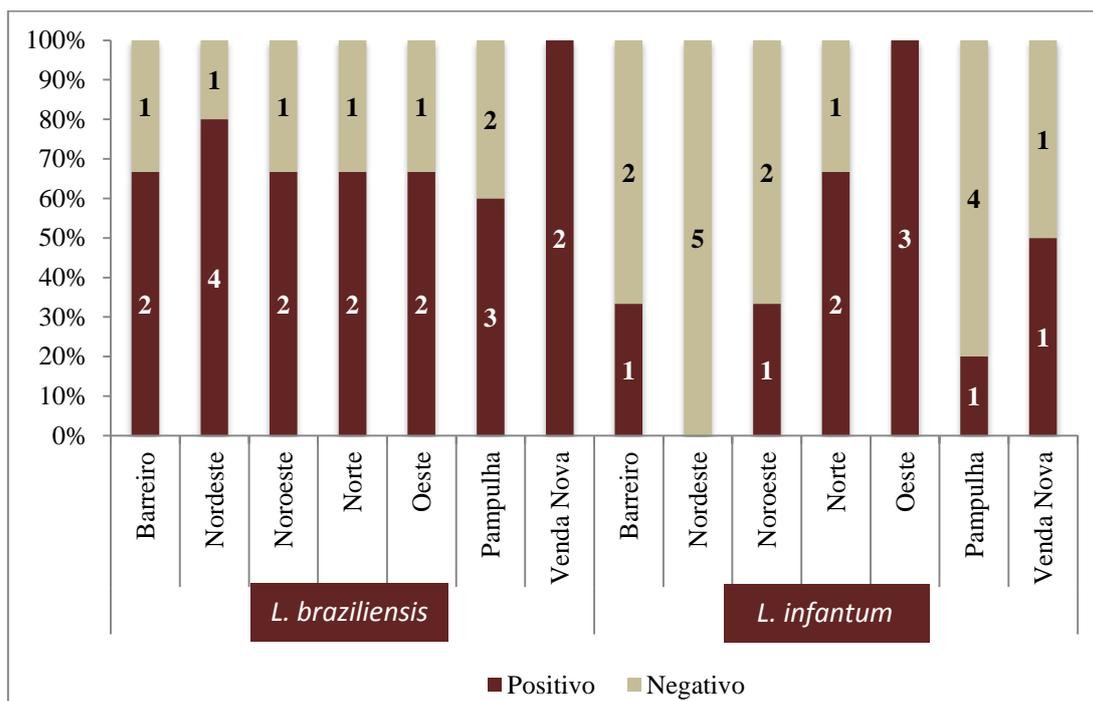


Figura 23: Distribuição dos resultados obtidos pela técnica da PCR, com iniciadores específicos para as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*, de acordo com as regionais administrativas, em investigação da infecção equina por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

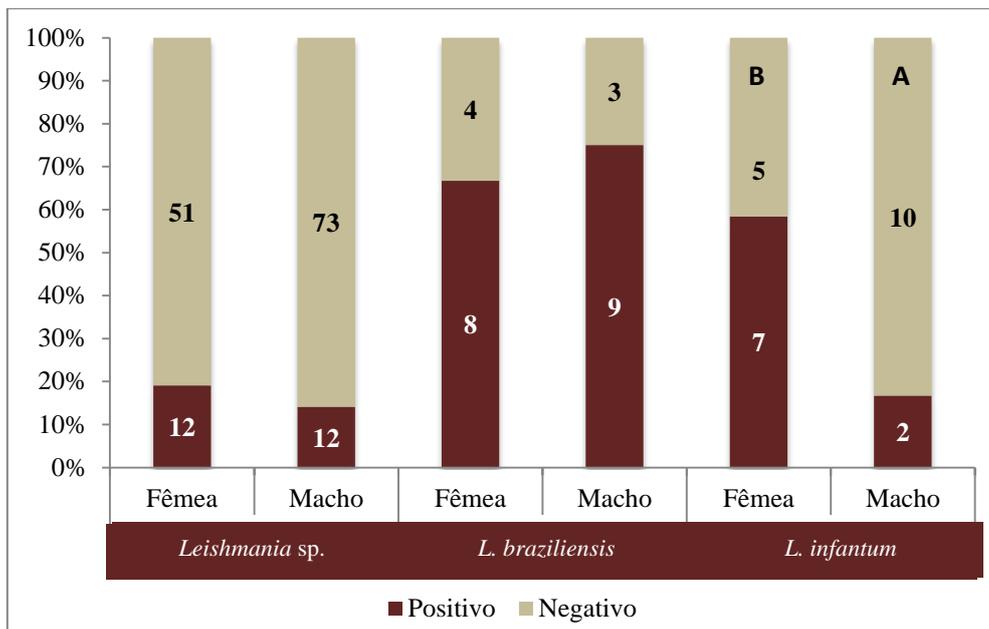


Figura 24: Distribuição dos resultados obtidos pela técnica da PCR, com iniciadores específicos para o gênero *Leishmania* sp. e para as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*, de acordo com o sexo, em investigação da infecção equina por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012. Letras distintas, diferem entre si ($p < 0,05$).

Os resultados indicam a circulação das espécies testadas nos equinos de Belo Horizonte com frequência de 16,22% (24/148) para o gênero *Leishmania*, 11,47% (17/148) para a espécie *L. braziliensis* e de 6,08% (9/148) para *L. infantum*. Aponta, ainda, para a hipótese da presença de outra espécie do gênero *Leishmania*, à semelhança dos relatos de Müller et al. (2009) e Reuss et al. (2012) que detectaram casos autóctones de equinos infectados por *L. siamensis*, na Alemanha e na Flórida, respectivamente. Esta espécie é reconhecida até o momento como causadora de dois casos de LV em seres humanos na Tailândia (Sukmee et al., 2008; Suankratay

et al., 2010) e de um caso de leishmaniose cutânea bovina na Suíça (Lobsiger et al., 2010). Ressalva-se que os resultados negativos nos testes subsequentes para avaliação específica também podem ter ocorrido por degradação do DNA, hipótese essa não descartada por ausência de avaliação para genes equinos constitutivos.

Tanto a infecção por *L. infantum*, quanto a infecção mista, confirmadas pela técnica da PCR, representam um achado inédito nesta espécie mamífera no Continente Americano.

Ressalta-se que apesar da infecção por *L. infantum* ocorrer na Europa, a infecção

mista não foi relatada anteriormente. No homem, já detectou-se a infecção por duas espécies de *Leishmania* no mesmo indivíduo, tanto no Velho como no Novo Mundo (Oliveira-Neto et al., 1986; Ibrahim et al., 1994; Martinez et al., 2002). No Brasil, Madeira et al. (2006) e Silva et al. (2011), no Rio de Janeiro, e Quaresma et al. (2011), em Minas Gerais encontraram cães com infecção natural mista por *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Em áreas como o município de Belo Horizonte, onde há sobreposição das infecções no homem e no cão, sobretudo por *L. infantum*, estudos mais abrangentes são necessários para o entendimento do equino na cadeia epidemiológica das leishmanioses. O isolamento dos parasitos e as caracterizações biológica, bioquímica e molecular permitirão a avaliação da variabilidade inter e intra específica em comparação com as espécies isoladas do homem e de cães da mesma região.

Durante a realização da pesquisa, a equipe médica veterinária da Clínica de Equídeos do Hospital da Universidade Federal de Minas Gerais realizou biópsia de lesões de três animais que apresentavam lesões sugestivas de leishmaniose ou com dificuldade de cicatrização. Os três pacientes foram positivos para leishmaniose

pela técnica da PCR utilizando esta amostra biológica. Um animal foi positivo para *L. braziliensis* e dois apresentaram infecção mista por *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Um dos animais com infecção mista apresentou ainda reação positiva na PCR para *L. infantum* em amostra de sangue. Devido a esse resultado, foi realizada a punção aspirativa de medula óssea, a qual também apresentou resultado positivo para ambas as espécies testadas.

Em estudo prévio com enfoque em problemas articulares nos cavalos dos carroceiros (Fantini, 2010), foi detectada pelo grupo de pesquisa uma estrutura similar à amastigota na amostra de líquido sinovial de uma égua. Essa suspeita não foi confirmada, mas o interesse de se estudar esses animais para pesquisa de *Leishmania* sp. resultou na presente dissertação. Durante a realização do estudo, essa mesma égua foi levada à Clínica de Equídeos por razão de síndrome cólica em seu potro, estando a égua em condições normais. Foi então solicitada ao proprietário a autorização para coleta de aspirado de medula óssea e realização da PCR, a qual resultou em infecção mista por *L. braziliensis* e *L. infantum*. Para treinamento das coletas de medula óssea foram utilizados dois animais da Escola de

Veterinária, nos quais também foi realizada PCR, apresentando resultados negativos.

Os resultados encontrados na Clínica de Equídeos estão ilustrados na Tab.32 e corroboram a hipótese de que os equinos do

município de Belo Horizonte e regiões adjacentes estão sob o risco de infecção para espécies de *Leishmania* sp., e que ainda, podem apresentar doença clínica ou infecção assintomática.

Tabela 32: Características das lesões e exames realizados em pacientes da Clínica de Equídeos da Escola de Veterinária suspeitos para leishmaniose. Belo Horizonte, 2012.

Animal	Apresentação Clínica	Imprint		PCR		
		Lesão	M.O.	Lesão	M.O.	Sangue
1	DC	NR	Positivo	<i>L.b/L.i.</i>	<i>L.b/L.i.</i>	<i>L.i.</i>
2	LC	Positivo	NR	<i>L.b.</i>	NR	NR
3	DC	NR	NR	<i>L.b/L.i.</i>	NR	NR
4	LC	Positivo	NR	NR	NR	NR
5	Assintomático	NR	NR	NR	<i>L.b/L.i.</i>	NR

M.O.: Medula óssea; DC: Dificuldade de cicatrização; LC: Lesão característica de LTA; NR: Não realizado; L.b.: *L. braziliensis*; L.i.: *L. infantum*.

4.3.2 Comparação do diagnóstico molecular com as técnicas sorológicas

Dos 148 animais analisados, 16,22% (24/148) foram positivos para o gênero *Leishmania* sp., na técnica da PCR, enquanto 81,08% (120/148) foram positivos em uma das técnicas sorológicas, demonstrando maior positividade na resposta humoral.

Dentre os animais positivos na PCR genérica (16,22% - 24/148), obteve-se 16,67% (4/24) de amostras negativas nas técnicas imunológicas e 83,33% (20/24) positivos para RIFI e/ou ELISA, sendo esta

maior positividade humoral encontrada também para o grupo PCR negativo, totalizando 80,65% (100/124) de animais reativos pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA e 19,35% (24/124) de negativos em ambas as técnicas (Fig. 25).

Não houve diferença ($p>0,05$) na reatividade humoral entre os grupos PCR negativo e PCR positivo. Tal resultado foi obtido pela análise individual das técnicas sorológicas (Tab.33; Tab.34) e analisando as amostras reativas e não reativas nos diferentes grupos sorológicos (Fig.26; Fig.27).

Tabela 33. Comparação da técnica da PCR, com iniciadores para o gênero *Leishmania* sp. e a titulação obtida pela técnica da RIFI, em investigação da soroprevalência e infecção equina para *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

RIFI	Amostras (% , n)				Total
	Não reativas	Reativas / título			
		1:40	1:80	1:160	
PCR-Negativo	33,06 (41)	42,74 (53)	20,16 (25)	4,03 (5)	124
PCR-Positivo	25,00 (6)	45,83 (11)	29,17 (7)	0,00 (0)	24

Teste do Qui-quadrado, $p=0,536$.

Tabela 34. Comparação da técnica da PCR, com iniciadores para o gênero *Leishmania* sp. e a técnica do ELISA, em investigação da soroprevalência e infecção equina para *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

ELISA	Amostras (% , n)		Total
	Não-reativas	Reativas	
PCR-Negativo	55,65 (69)	44,35 (55)	124
PCR-Positivo	50,00 (12)	50,00 (12)	24

Teste do Qui-quadrado, $p=0,611$.

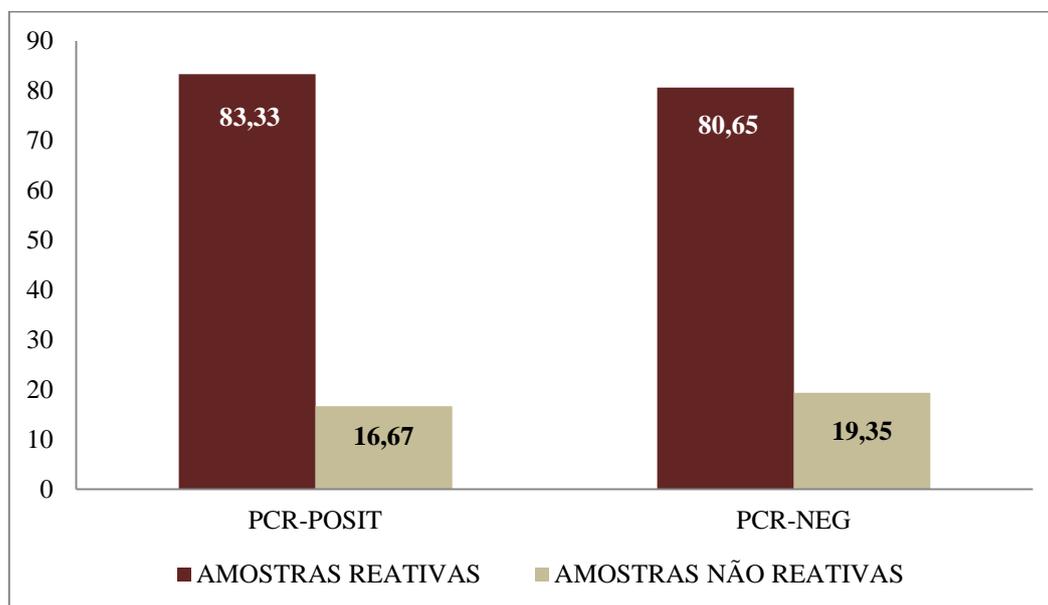


Figura 25: Reatividade humoral, independente da técnica sorológica, de acordo com o resultado da técnica da PCR de sangue total, em investigação da soroprevalência e infecção equina por *Leishmania* sp. Belo Horizonte, 2012.

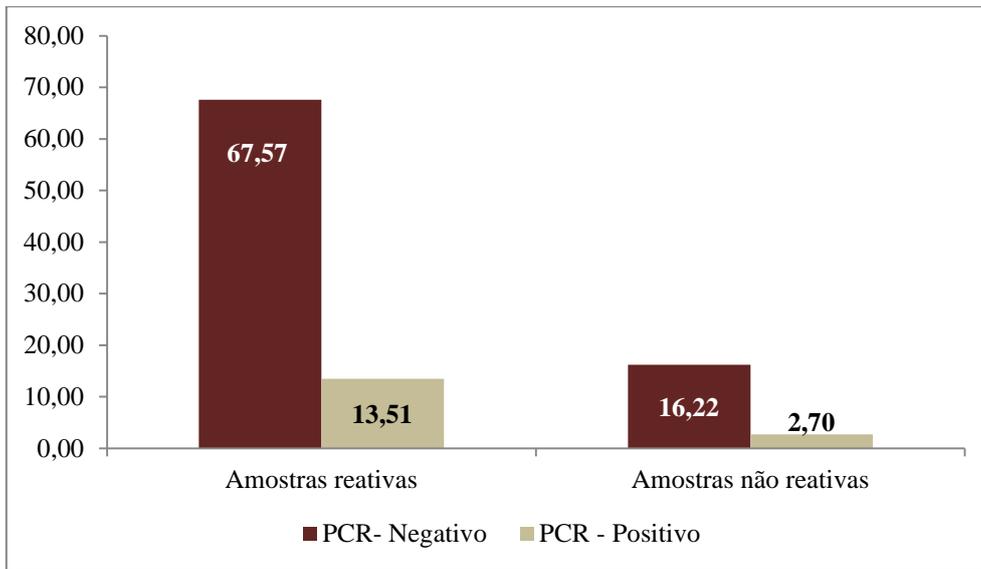


Figura 26: Distribuição das amostras reativas e não reativas, independente da técnica sorológica, de acordo com o resultado da PCR de sangue total, com iniciadores específicos para o gênero *Leishmania* sp., em investigação da soroprevalência e infecção equina por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012. Teste do Qui-quadrado, $p > 0,05$ (n=148).

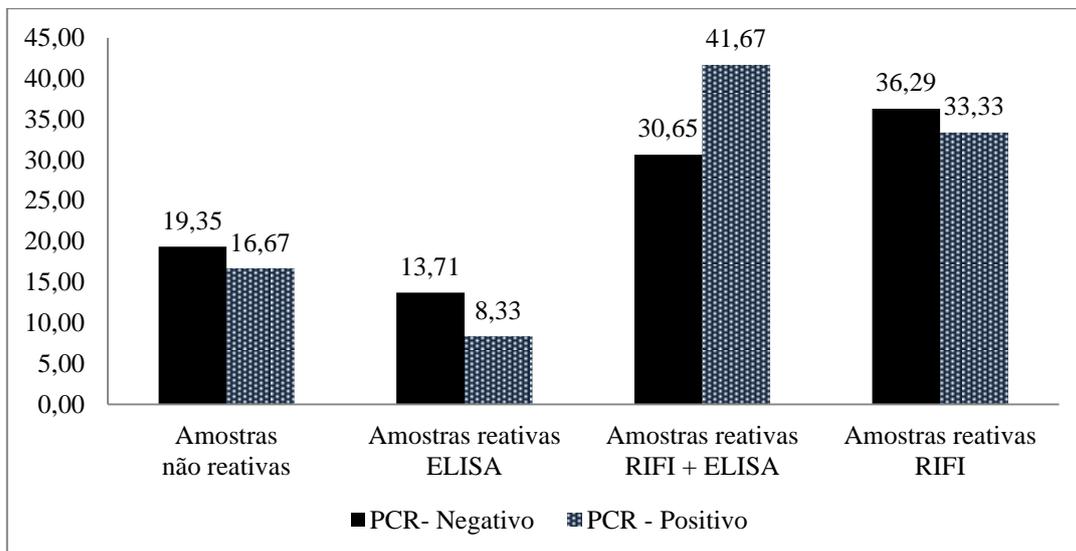


Figura 27: Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com a técnica sorológica e de acordo com o resultado da PCR de sangue total, com iniciadores específicos para o gênero *Leishmania* sp., em investigação da soroprevalência e infecção equina por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012. Teste do Qui-quadrado, $p = 0,722$ (n=148).

Dos 24 animais positivos para a PCR genérica, 33,33% (8/24) foram positivos somente na RIFI, 8,33% (2/24) positivos somente no ELISA e 41,67% (10/24) positivos em ambas as técnicas, além de 16,67% (4/24) serem negativos tanto para a RIFI quanto para o ELISA (Fig.28).

A concordância foi fraca, no teste de Kappa, quando da comparação da PCR com as duas técnicas sorológicas, juntas ou individualmente (Tab.35 a 37).

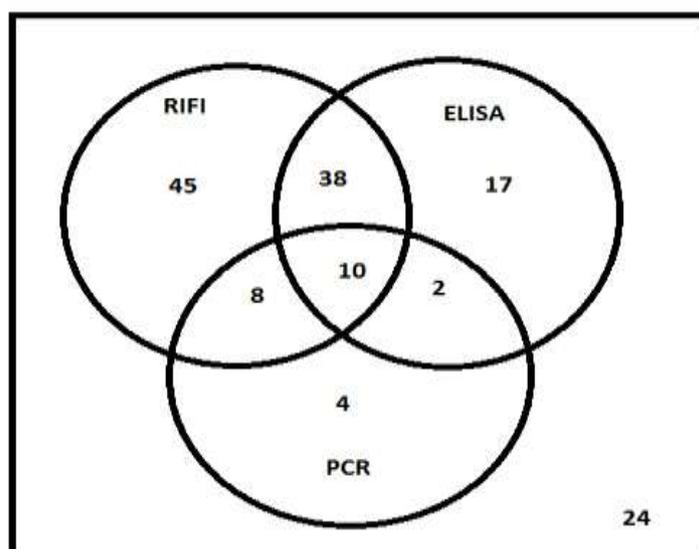


Figura 28: Distribuição das amostras de acordo com a positividade nos testes sorológicos e no teste molecular da PCR, com iniciadores específicos para o gênero *Leishmania* em investigação da soroprevalência e infecção equina por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

Tabela 35: Concordância entre as técnicas da PCR, com iniciadores específicos para o gênero *Leishmania*, e técnicas sorológicas RIFI e ELISA, em investigação da soroprevalência e infecção equina por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

PCR	RIFI ou ELISA			Teste Kappa IC 95%
	Positivo	Negativo	Total	
Positivo	20	4	24	0,01
Negativo	100	24	124	Concordância fraca
Total	120	28	148	P = 0,758

Tabela 36: Concordância entre a técnica da PCR, com iniciadores específicos para o gênero *Leishmania*, e a técnica sorológica do ELISA, em investigação da soroprevalência e infecção equina por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

PCR	Teste de ELISA			Teste Kappa IC 95%
	Positivo	Negativo	Total	
Positivo	12	12	24	0,033
Negativo	55	69	124	Concordância fraca
Total	67	81	148	P = 0,611

Tabela 37: Concordância entre a técnica da PCR, com iniciadores específicos para o gênero *Leishmania*, e a técnica sorológica da RIFI, em investigação da soroprevalência e infecção equina por *Leishmania* sp.. Belo Horizonte, 2012.

PCR	RIFI			Teste Kappa IC 95%
	Positivo	Negativo	Total	
Positivo	18	6	24	0,035
Negativo	83	41	124	Concordância fraca
Total	101	47	148	P = 0,437

Apesar de ainda ter sido definido um teste laboratorial padrão-ouro para o diagnóstico das leishmanioses (Marques et al., 2006; Rodríguez-Cortés et al., 2010), sem o isolamento do parasito não é possível avaliar o papel do hospedeiro como reservatório ou mesmo afirmar se a infecção é antroponótica ou zoonótica (Castro et al., 2007).

Faz-se necessária a detecção do parasito, isolamento e caracterização do agente etiológico. Entretanto as técnicas clássicas apresentam algumas restrições. Simplicidade na execução e baixos custos são vantagens da utilização dos testes sorológicos como método de triagem e diagnóstico em áreas onde biópsia ou

histologia são inviáveis (Barroso-Freitas et al., 2009).

A interpretação de uma soroprevalência é complexa devido à dinâmica do sistema imune e da individualidade do mesmo. Deve-se considerar as reações cruzadas, período pré-patente entre infecção e soroconversão, proporção de indivíduos que não soroconvertem devido à resposta imune inata eficaz, queda de títulos a níveis indetectáveis ou manutenção dos títulos (Reithinger et al, 2003). Além disso, em áreas endêmicas, os resultados imunológicos podem apresentar maior positividade que a detecção da infecção e essa ser mais expressiva que o

desenvolvimento de doença (Aguilar et al., 1984; Desjeux, 2004).

A utilização das técnicas sorológicas e seu potencial valor na detecção de casos de leishmanioses causadas tanto por *L. braziliensis* quanto por *L. infantum* devem ser analisados com critério, visto que os baixos títulos podem levar a falsos-negativos e, principalmente, a falsos-positivos por reações cruzadas (Edrissian e Darabian, 1979).

No ser humano, as doenças reconhecidas como desencadeadoras de reação cruzada com as leishmanioses são a infecção por outras espécies de *Leishmania*, que não *L. braziliensis* e *L. infantum*, Doença de Chagas (Pedras et al., 2003; Castro et al., 2007; Brasil, 2010), malária (Pedras et al., 2003) tuberculose e febre tifoide (Edrissian e Darabian, 1979; Mosleh et al., 1995), pênfigo foliáceo sul-americano, paracoccidiodomicose e esporotricose (Brasil, 2010). No cão, relata-se no diagnóstico para LVC a reação cruzada com outras espécies de *Leishmania* sp., *Ehrlichia canis*, *Trypanosoma caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (Zanette, 2006; Silva et al., 2011).

Extrapolando para agentes infecciosos análogos dos equinos e considerando a epidemiologia do município de Belo Horizonte, as possíveis afecções que

poderiam gerar reação cruzada são as espécies de *Leishmania* sp. entre si, seja *L. braziliensis*, *L. infantum* ou uma nova espécie e, *Anaplasma phagocitophilum*. Estudos sorológicos com resultados positivos na investigação de infecção equina por *T. Gondii* foram realizados no Estado de São Paulo (Camossi et al., 2010) e do Paraná (Garcia et al., 1999). Entretanto, a revisão de literatura não foi capaz de encontrar estudos sobre a situação epidemiológica equina desse parasito no município de Belo Horizonte.

Quanto ao diagnóstico molecular, é outro tipo de método parasitológico, baseado na detecção de sequências de DNA específicas do parasito sendo a PCR a principal técnica utilizada. A técnica da PCR permite a detecção do material genético do parasito, resultando em grandes indícios da presença do mesmo. Uma vez que ela permite a amplificação da sequência alvo em até 10⁹ vezes, esta metodologia tem demonstrado alta sensibilidade superando, em diversos estudos, as outras técnicas convencionais de diagnóstico da LVC. Sua robustez também tem sido demonstrada com alta especificidade de acordo com o tipo de iniciador utilizado (Strauss-Ayali et al., 2004; Manna et al., 2004; Silva et al., 2001; Reale et al., 1999).

Este ensaio molecular pode ser realizado com diferentes iniciadores, de acordo com os alvos de detecção desejados. Várias sequências do genoma de *Leishmania* já foram descritas como alvos de amplificação e incluem os genes para o RNA ribossomal e seus espaçadores, β -tubulina, locus gp63, hsp70, cisteino-proteinases e minicírculos do DNA de cinetoplasto (kDNA) (Reithinger e Dujardin, 2007; Singh, 2006).

Os métodos moleculares baseados em PCR têm sido considerados um importante recurso auxiliar para o diagnóstico da LV e LVC devido às altas sensibilidade e especificidade apresentadas por estas técnicas (Gomes et al., 2007; Moreira et al., 2007).

Quanto à LT, este método detecta com alta sensibilidade a presença do parasito nas lesões ativas (Yarbu e Premoli de Percoco, 1999; Faber et al., 2003; Reithinger et al., 2003; Brandão-Filho e Shaw, 2006; Fantauzzi, 2009), sendo o indicado quando da utilização de um único método diagnóstico (Weigle et al., 2002; Faber et al., 2003; Marques et al., 2006). Fagundes et al. (2010) determinaram um VPP de 99,2% trabalhando com pacientes suspeitos em centro de saúde. Entretanto não permite a distinção apropriada da variabilidade genética intra-específica nem descreve novas espécies (Castro et al., 2007).

No presente trabalho a detecção do material genético de *L. braziliensis* pela PCR foi mais baixa do que a encontrada pelos autores supracitados. Esse resultado deve-se ao material biológico utilizado, visto que no presente estudo foi utilizado sangue periférico. A sensibilidade da PCR nessa amostra biológica é mais baixa para detecção de LTA (Reithinger et al., 2003; Marinho Júnior, 2010) e de *L. infantum*, estando os achados do presente trabalho dentro do esperado. O sangue não é a melhor opção para realizar o diagnóstico molecular, sendo apresentados resultados conflituosos na literatura acerca do desempenho da PCR realizada a partir de sangue periférico. Enquanto alguns estudos demonstraram ter esta técnica alta sensibilidade (Fisa et al., 2001; Lachaud et al., 2002; Manna et al., 2004;), outros autores evidenciaram o contrário (Reale et al., 1999; Silva et al., 2001).

Sabe-se que, pelo menos em cães, a carga parasitária sanguínea varia ao longo do tempo e, resultados falsos negativos podem ser obtidos caso a coleta seja feita em períodos nos quais a carga esteja baixa (Lachaud et al., 2002; Strauss-Ayali et al., 2004). Esta é uma das características ainda não conhecidas no caso das infecções equinas. Além disso, o sangue apresenta inibidores de PCR como a hemoglobina, o

que pode ter afetado a eficiência da PCR no presente estudo, diminuindo a positividade dos resultados.

Em inquérito epidemiológico em equinos saudáveis de área endêmica no Estado do Paraná, a diferença foi maior do que a encontrada no município de Belo Horizonte. A soroprevalência avaliada pela técnica sorológica de DAT foi de 76,4%, enquanto a positividade da PCR do sangue total, 7,1% (Vedovello-Filho et al., 2008).

Em relação aos animais PCR positivos mas negativos na detecção de anticorpos, Reithinger et al. (2003) levantam duas hipóteses. A probabilidade dos animais estarem no período pré-patente da infecção ou ainda, do desenvolvimento de uma resposta imune celular eficaz. Essa segunda hipótese é também sugerida por Solano-Gallego et al. (2003) que confirmaram, por meio da imuno-histoquímica e da cultura, a presença de *L. infantum* em alteração cutânea em um equino apresentando perfil imunológico negativo no teste de ELISA e positivo na linfoproliferação de linfócitos *in vitro*.

A maior taxa de soroprevalência em relação à infecção pode ser devido à presença de anticorpos não significar necessariamente infecção ativa, podendo representar contato anterior, reação cruzada, com outros parasitos ou com diferentes espécies

circulantes de *Leishmania* sp. (Castro et al., 2007; Castellano et al., 2009) e por muitas vezes as leishmanioses se apresentarem sob forma sub-clínica, com infecções de natureza crônica e oculta, enquanto o parasito desencadeia uma resposta imune que inclui produção de anticorpos (Rajasekariah et al., 2001).

A detecção de *L. braziliensis* na medula óssea de dois equinos e na corrente sanguínea de 10,47% está de acordo com os achados de Reithinger et al. (2003) em cães. Os autores sugerem que a metástase por disseminação hematogênica pode ser um fenômeno mais comum do que se acreditava. Tal fato implica na maior possibilidade desses hospedeiros se tornarem infectantes aos vetores. Entretanto, estudos por xenodiagnóstico são necessários para confirmação desta hipótese.

Apesar das considerações acerca da acurácia dos testes sorológicos, eles ainda se mantêm como a principal ferramenta em inquéritos epidemiológicos (Reithinger et al., 2003). Brandão-Filho e Shaw (2006) acreditam que os métodos moleculares agregam informações importantes e elucidam bastante sobre os aspectos dos ciclos enzóticos e zoonóticos das leishmanioses tegumentares. Entretanto, os autores reforçam que, mesmo com as

reconhecidas dificuldades no isolamento das espécies do subgênero *Viannia*, esse procedimento é de fundamental importância na determinação de um mamífero como hospedeiro. Dessa forma, a busca pelo isolamento e sequenciamento das espécies infectantes para equinos no município de Belo Horizonte faz-se crucial para a completa compreensão desta enfermidade na espécie estudada.

Apesar das diferenças encontradas entre os testes diagnósticos realizados no presente estudo, a ênfase da pesquisa era determinar se os equinos residentes no município de Belo Horizonte estão sujeitos à infecção por *Leishmania* sp., bem como seus aspectos clínico-laboratoriais, buscando a compreensão do papel deste mamífero na cadeia epidemiológica de ambas leishmanioses, tegumentar e visceral. Como ferramenta de diagnóstico individual, sugere-se o aperfeiçoamento dos testes sorológicos para a espécie estudada. Entretanto ambas as técnicas descritas no presente estudo se apresentaram como confiáveis pontos de partida para estudos epidemiológicos na triagem de equinos em áreas endêmicas para leishmanioses. Além disso, a técnica da PCR confirmou-se como excelente teste para detecção do parasito nas lesões suspeitas.

A crescente urbanização e domesticação das leishmanioses são resultado das alterações nos padrões de transmissão, favorecidas pela adaptação dos parasitos a novos vetores e hospedeiros. Nos focos intra e peri-domiciliares de transmissão não só os cães, mas também os demais animais domésticos e sinantrópicos, são prováveis de apresentarem um papel importante na epidemiologia da LTA e LV. Além de servirem como fontes de infecção para os vetores, podem também aumentar a atração dos mesmos para o ambiente doméstico, servindo como fonte de alimentação, favorecendo a reprodução e a multiplicação dos flebotomíneos.

A probabilidade de uma espécie apresentar papel significativo na epidemiologia das leishmanioses e ser incriminada como reservatório dependem, de uma forma geral, da prevalência da infecção na população, da taxa de repastos sanguíneos dos flebotomíneos nos indivíduos e da infecciosidade para os insetos vetores. Este estudo confirmou a suscetibilidade dos equinos como hospedeiros de *L. braziliensis* e *L. infantum*. Demonstrou-se que a infecção pelas espécies causadoras de LT e LV apresentam-se tanto na forma sintomática, sendo uma enfermidade ainda negligenciada na Clínica Médica Equina, quanto nas formas sub-clínicas e

assintomática e, em alguns casos de curso auto-limitante, representando uma questão a ser explorada pelos órgãos de Saúde Pública.

A habilidade de equinos infectados servirem como fonte de infecção para os vetores, a variabilidade genética do parasito envolvido nesta infecção e a transmissibilidade para humanos são pontos que necessitam ser caracterizados. Pesquisas futuras devem preencher as lacunas no conhecimento da fisiopatogenia das leishmanioses no equino, além da participação dos mesmos no ciclo de transmissão no contexto urbano.

Os esforços para a incriminação de quais espécies estão infectando os equinos de tração do município de Belo Horizonte, por meio de isolamento e caracterização molecular, são de suma importância para a possibilidade de melhorias no diagnóstico, claro julgamento do potencial prejuízo na saúde dos equinos e do real impacto deste hospedeiro na Saúde Pública. Dessa forma os esforços no combate à esta enfermidade poderão ser direcionados de forma racionalizada, sem custos nem alardes excessivos.

5. CONCLUSÕES

- A técnica padronizada para o teste sorológico do ELISA apresentou boa reprodutibilidade podendo ser utilizada em inquéritos epidemiológicos na pesquisa da soroprevalência equina para infecção por *Leishmania* sp..
- A infecção por *Leishmania* sp. está presente nas sete regionais administrativas estudadas de Belo Horizonte.
- A susceptibilidade à infecção por *Leishmania* sp., no equino, independe do sexo.
- Os equídeos de tração da região metropolitana de Belo Horizonte estão sujeitos à infecção clínica e subclínica por duas espécies do gênero *Leishmania*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.
- Há a suspeita de susceptibilidade a uma outra espécie que não a *L. infantum* ou *L. braziliensis*.
- Detectou-se infecção por *Leishmania* sp., *L. braziliensis*, *L. infantum*, pela técnica da PCR, em equinos de tração do município de Belo Horizonte.
- A infecção por *L. braziliensis* está igualmente distribuída nas sete regionais administrativas estudadas de Belo Horizonte.

- A infecção por *L. infantum* foi detectada em seis regionais, não sendo encontrada na regional Nordeste.
- Não houve concordância entre as técnicas sorológicas e a molecular.
- A presença de imunoglobulinas anti-*Leishmania* sp. e de material genético nas lesões, no sangue periférico e na medula óssea dos equinos estudados sugere que estes animais sejam possíveis fontes de infecção para os flebotomíneos para ambas as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*.

6. PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

- A epidemiologia e descrição das cepas de *Leishmania* sp. circulante em equinos, devem ser foco de investigação por isolamento e sequenciamento.
- O isolamento de múltiplas amostras biológicas, como nódulos, medula óssea e pele íntegra, apontará para o grau de importância desta espécie como reservatório das diferentes espécies de *Leishmania* sp.
- Avaliação da necessidade de aperfeiçoamento das técnicas diagnósticas sorológicas para leishmaniose equina.
- Análise de outras classes de imunoglobulinas, como a IgM, além das

subclasses de IgG para avaliação do painel sorológico equino frente às leishmanioses.

- A padronização da reação Intradérmica de Montenegro para a espécie equina pode representar expressivo auxílio no diagnóstico da LTA equina nas áreas endêmicas.
- A padronização do xenodiagnóstico para equinos deve ser buscada para o auxílio nos estudos sobre a epidemiologia da LTA e LV e a importância desta espécie mamífera na manutenção do parasito na natureza.
- Estudos por infecção experimental auxiliarão no estudo da fisiopatogenia da LTA e da LV em equinos.
- Estudos devem ser realizados para se determinar as alterações clínicas e laboratoriais de equinos com LTA e LV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, C. M; FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, R. Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. The role of domestic animals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.79, n.2, p. 181-195, 1984.
- AGUILAR, M.C.; RANGEL, E.F.; DEANE, L.M. Cutaneous leishmaniasis is frequent in equines from an endemic area in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 4, p. 471-472, 1986.

- AGUILAR, C.M; RANGEL, E.F.; GRIMALDI, G.; MOMEM, H. Human, canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area in the state of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.82, n.1, p.143, 1987.
- AGUILAR, C. M.; RANGEL, E. F.; GARCIA, L.; et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 19-28, 1989.
- ALENCAR, J. E. Um caso de leishmaniose tegumentar em *Equus asinus*. XIV Congresso Brasileiro de Higiene, Niterói, Brasil, 1959.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v.57, n._, p.1-88, 2004.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.*, v.22, n._, p.552-557, 2006.
- ALVAR, J.; VELEZ, I.D.; BERN, C.; et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One*, v.7, n._, p.1-12, 2012.
- ARIAS, J.R.; NAIFF, R.D. The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae), as a reservoir host of *Leishmanis braziliensis guyanensis* inn the Amazon Basin of Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.75, n.4, p.537-541, 1981.
- ARJONA-JIMÉNEZ, G.; VILLEGAS, N.; LÓPEZ-CÉSPEDES; et al. Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.106, n._, p.252-258, 2012.
- ARRAES, S. M. A. A.; MARINI, M. T.; MARTELLO, D.; et al. Investigaçã sorológica de casos subclínicos de leishmaniose tegumentar após um surto em uma localidade endêmica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, n.2, p.205-208, 2008.
- ASHFORD, R.W. What it takes to be a reservoir host. *Belg. J. Zool.*, suppl.1, p. 85-90, 1997.
- BARBOSA-DE-DEUS, R.; MARESGUIA, M.L.; NUNES, A.Z.; et al. *Leishmania major*-Like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, v.9, n._, p.1361–1366, 2002.
- BARBOSA-SANTOS, E.G.O.; MARZOCHI, M.C.A.; URTADO, W.; et al. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a mare (*Equus*

cabalus): immunotherapy and chemotherapy assays. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, n.2, p.217-220, 1994.

BARROSO-FREITAS, A.P.T.; PASSOS, S.R.L.; MOUTA-CONFORT, E.; et al. Accuracy of na ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentar leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.103, n._, p.383-389, 2009.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.*, v.37, n.10, p.1097-1106, 2007.

BELO HORIZONTE, PREFEITURA. Disponível em: http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?evento=portlet&pIdPlc=ecpTaxonomiaMenuPortal&app=saude&tax=12768&lang=pt_BR&pg=5571&taxp=0 Acesso em: 23/03/2012.

BELOTUR. Disponível em: <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/ecp/comunidade.do?app=belotur> Acesso em: 24/08/2011.

BONFANTE-GARRIDO, R.; MELENDEZ, E.; TORRES, R.; et al. Enzootic equine cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.75, n.3, p.471, 1981.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; SHAW, J. J. Molecular tools versus parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. *Trends Parasitol.*, v.22, n.11, p.500-501, 2006.

BRANDÃO-FILHO S.P.; CARVALHO, F.; BRITO, M. E. F.; et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 89, n.3, p. 445-449, 1994.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; BRITO, M.E.F; et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.93, n._, p.488-494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; BRITO, M.E.; CARVALHO, F.G.; et al. Wild and synantropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.97, p.291-296, 2003.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2. ed. Atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180p.

- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica nº48/2011: Esclarecimentos sobre o diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina utilizado na rede pública de saúde. *Sec. Vig. Saúde*, Brasília.
- BRAUN, J.; LEFEBVRE, H. P.; Kidney function and damage. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of domestic animals*. 6. ed. Londres: Elsevier, 2008, Cap. 16, p.485-528.
- BRETAGNE, S.; DURNAD, R.; OLIVI, M.; et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.8, n.4, p.828-831, 2001.
- BRITO, M.E.; MENDONÇA, M.G.; GOMES, Y.M.; et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by Immunoblot Analysis. *Clin. Diagnostic Lab. Immunol.*, v.7, n.2, pp.318-321, 2000.
- BRUIJN, M.H.L.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.*, v.52, p.45-58, 1992.
- BUTTERWORTH, T. Cutaneous diseases and their laboratory findings. *Clin. Derm.*, v. 4, n.3, p.1-94, 1986.
- CAMOSSI, L. G.; LANGONI, S. H. Inquérito sorológico para toxoplasmose em equinos na região de Botucatu-SP. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.2, p.484-488, 2010.
- CARREIRA, J.C.A.; SILVA, A.V.M.; PEREIRA, D.P.; BRAZIL, R.P. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites & Vectors*, v.5, n._, p.111, 2012.
- CASTELLANO, L. R.; FILHO, D. C.; ARGIRO, L.; et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-g production. *Human Immunol.*, v.70, n._, p.383-390, 2009.
- CASTRO-SOUSA, F.; PARANHOS-SILVA, M.; SHERLOCK, I.; et al. Dissociation between vasodilation and *Leishmania* infection-enhancing effects of sand fly saliva and maxadilan. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, n.7, p. 997-999, 2001.
- CASTRO, E.A., LUZA, E., TELLES, F. Q.; et al. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. American cutaneous and mucocutaneous

- leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Trop.*, v.93, n._, p.141– 149, 2005.
- CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). *Exp. Parasitol.*, v.117, n._, p.13-21, 2007.
- CERQUEIRA, E.J.L. *O papel dos equíneos na ecologia da Leishmaniose visceral no Estado da Bahia, Brasil*. 2001. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Departamento de Protozoologia, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Instituto Oswaldo Cruz, Salvador.
- CERQUEIRA, E.J.L.; SHERLOCK, I.; GUSMÃO, A.; et al. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, n.6, p.695-701, 2003.
- CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.5, n.11, p.873-882, 2007.
- CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNÁNDEZ, A.T.; TAPIA, F.J.; et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.87, n._, p.444-448, 1993.
- COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; GONTIJO, N. F.; et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Vet. J.*, v. 174, n. _, p.636–643, 2007.
- COSTA, C.H.; VIEIRA, J.B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, n._, p.223-228, 2001.
- COSTA, J. M. L.; SALDANHA, C. R.; NASCIMENTO, D.; et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. *Gaz. Médica Bahia*. v.79, supl.3, p.70-83, 2009.
- COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.*, v.186, n._, p.1314-1320, 2002.
- CURTI, M.C.M.; SILVEIRA, T.G.V.; ARRAES, S.M.A.A.; et al. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v.30, n.1, p.63-68, 2009.

- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet. Parasitol.*, v.149, n.__, p.139-146, 2007.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for the leishmaniasis Worldwide. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.95, n.__, p.239-43, 2001.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives . *Comp immunol. microbiol infect dis*, v. 27, n.__, p. 305-318, 2004.
- DUARTE, R.; THEOPHILO, F.A.O.; MARZOCHI, M.C.A.; et al. Sorologia para leishmaniose em equinos no município do Rio de Janeiro. *Portal Saúde Rio*, 2001. Disponível em: <http://www.saude.rio.rj.gov.br> Acesso em: 25/09/2011.
- ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of domestic animals*. 6. ed. Londres: Elsevier, 2008, Cap. 5, p.117-156.
- EDRISSIAN, G. H.; DARABIAN, P. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the sero-diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.73, n.3, p.289-292, 1979.
- ESCOBAR, M.A.; MARTINEZ, F.; SCOTT SMITH, D., PALMA, G.I. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): a diagnostic challenge. *Trop. Doct.*, v.22, n.__, p.69-78, 1992.
- FABER, W.R.; OSKAM, L., GOOL, T.; et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.49, n.1, p.70-74, 2003.
- FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A.; PAULA, C. C.; et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral center. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.105, n.1, p.109-112, 2010.
- FALQUETO, A.; COURA, J. R.; BARROS, G. C.; et al. Participação do cão no ciclo de transmissão da Leishmaniose tegumentar no Município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.81, n.1, p.155-163, 1986.
- FALQUETO, A.; VAREJÃO, J.B.M.; SESSA, P.A. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic área in the state of Espírito Santo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.82, n.3, p.443, 1987.

- FANTAUZZI, R.S. *Análise dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Belo Horizonte, notificados entre 2001 e 2008, com ênfase na forma mucosa*. 2009. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FANTINI, P. *Avaliação toracolombar em equídeos de tração: estudo clínico, termográfico e ultrassonográfico*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Medicina e Cirurgia), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. 125p.
- FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. v. 272, n. 5258, p. 50-53, 1996.
- FERNÁNDEZ-BELLON, H.; SOLANO-GALLEGO, L.; BARDAGÍ, M. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet. Parasitol.*, v.135, p.181–185, 2006.
- FERREIRA, E. C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.*, v.146, n.__, p.235-241, 2007.
- FERRER, L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona. Wiesbaden, *Hoechst Roussel Vet*, p. 6-10, 1999.
- FISA, R.; RIERA, C.; GALLEGU, M.; et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet. Parasitol.*, v.99, n.__, p.105-111, 2001.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedade rurais do norte do Paraná, Brasil. *Cienc. Rural*, v.29, n.__, p.91-97, 1999.
- GOMES, A.H.S.; FERREIRA, I.M.R.; LIMA, M.L.S.R.; et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.144, p.234-241, 2007.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, n.1, p. 71-80, 2003.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev. Bras. Epidemiol.*,v.7, n.__, p. 338-349, 2004.

- GONTIJO, C.M.F.; SILVA, E.S.; FUCCIO, M.B.; et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.*, v.81, n._, p.143-150, 2002.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, v.8, n.4, p. 419-433, 2010.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.*, v.35, n._, p.1169-1180, 2005.
- GRIMALDI-JR, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 6, n._, p.230-250, 1993.
- GRISARD, E.C.; STEINDEL, M.; SHAW, J.; et al. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Trop.*, v.74, n._, p.89-93, 2000.
- GUEVARA, P.; ROJAS, E.; GONZALEZ, N.; et al. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, v.1, n.4, p.385-389, 1994.
- GUIMARÃES, M.C., COUTINHO, S.G.; ANTUNES, C.M.F. Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.20, n.1, p.55-58, 1987.
- HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.*, v.27, n._, p.403-409, 2011.
- IBRAHIM, M.E.; SMYTH, A.J.; ALI, M.H. The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites. *Acta Trop.*, v.57, n._, p.327-332, 1994.
- JAIN, N. C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- JESUS, J.R.; ARAÚJO, F.A.P.; SPALDING, S.; TIECHER, F. Avaliação sorológica de anticorpos para *Leishmania* spp. na população canina em região de foco de leishmaniose tegumentar americana na Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil. *Parasitol. Latinoam.*, v.61, n._, p.121-125, 2006.
- KANEKO, J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5 ed. London: Academic Press, 1997.

- KOEHLER, K.; STECHELE, M.; HETZEL, U.; et al. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, v.109, p.9–17, 2002.
- KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J. Am. An. Hosp. Ass.*, v.35, n.__, p.376–383, 1999.
- LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.__, p.210-215, 2002.
- LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev. Pan-Amaz. Saúde*, v.1, n.2, p.13-32, 2010.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmanias and leishmaniasis fo the New World, with particular reference to Brazil. *Bul. Pan Am. Health Org.*, Washington, v.7, n.__, p.1-19, 1973.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; POVOA, M. The importance of edendates (sloths, anteates) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, a causative agent of “pian bois” in north Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.75, p.611-612, 1981.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, p. 159-174, 1977.
- LIRA, R.A.; CAVALCANTI, M.P.; NAKAZAWA, M.; et al. Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmanioses-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmanioses-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet. Parasitol.*, v. 15, n.137, p.11-16, 2006.
- LOBSIGER, L.; MÜLLER, N.; SCHWEIZER, T.: et al. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet. Parasitol.*, v.169, n.__, p.408–414, 2010.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, n.1, p.265-275, 1951.
- LUZ, Z.M.P.; PIMENTA, D.N.; CABRAL, A.L.L.V.; et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, n.3, p.249-254, 2001.

- LYNN, M.A.; MCMASTER, W.R. Leishmania: conserved evolution – diverse diseases. *Trends Parasitology*, v.24, n.3, p.103-105, 2008.
- MADEIRA, M.F.; UCHÔA, C.M.A.; LEAL, C.A.; et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.36, n.5, p.551-555, 2003.
- MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, T.M.P.; PACHECO, R.S.; et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.100, n.5, p.442-445, 2006.
- MAIA, C.; RAMADA, J.; CRISTÓVÃO, J.M.; et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.*, v.179, n._, p.142-144, 2009.
- MAIA-ELKHOURY, A.N.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saude Pub.*, v.24, n._, p.2941-2947, 2008.
- MANNA L, VITALE F, REALE S, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.125, n._, p.251-262, 2004.
- MANCIANTI, F.; FALCONE, M.L.; GIANNELLI, C.; POLI, A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.59, n.1, p.13-21, 1995.
- MARCELINO, A. P.; FERREIRA, E. C.; AVENDANHA, J. S.; et al. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.183, n._, p.54-58, 2011.
- MARCO, J.D.; PADILLA, A.M.; DIOSQUE, P.; et al. Force of infection and evolution of lesions of canine tegumentary leishmaniasis in northwestern Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, n._, p.649-652, 2001.
- MARINHO JÚNIOR, J.F. *Infecção natural por Leishmania spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil*. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

- MARQUES, M. J.; VOLPPINI, A. C.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; et al. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, v.54, n._, p.37-43, 2006.
- MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.80, p.859-876, 1986.
- MARTINEZ, E.; MOLLINEDO, S.; TORREZ, M.; et al. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum* m/L. *chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.96, n.5, p.529-532, 2002.
- MARZOCHI, M.C.; MARZOCHI, K.B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthopozoonosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Pub.*, v.10, n.suplemento 2, p.359-375, 1994.
- MATTNER, J.; DONHAUSER, N.; WERNER-FELMAYER, G.; BODGAN, C. NKT cells mediate organ-specific resistance against *Leishmania major* infection. *Microbes Infect.* v. 8, n. 2, p. 354-362, 2006.
- MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex, *Parasitol.*, v.119, p.237-246, 1999.
- MEDEIROS, A.C.L.; ROSELINO, A.M.F. Leishmaniose Tegumentar Americana: do histórico aos dias de hoje. *An. Bras. Dermatol.*, v.74, n.4, p.327-336, 1999.
- MEDEIROS, C. M. O.; MELO, A. G. C.; LIMA, A. K. F.; et al. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. *Cienc. An.*, v.18, n.1, p.43-50, 2008.
- MELLO, C. X., SCHUBACH, A. O; OLIVEIRA, R. V. C.; et al. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol. Res.*, v.109, n 3, p.927-933, 2011.
- METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, n._, p.5515-5519, 2005.

- MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. Medicina de Laboratório Veterinária: Interpretação e 121grément121c. São Paulo: Roca, 1995. 308 p.
- MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; CAMPOS, J.H.F.; CASTRO, J.A.D. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, Barcelona. Wiesbaden, Hoechst Roussel Vet, p. 46-53, 1999.
- MIRANDA, T.M.; MALAQUIAS, L.C.C.; ESCALDA, P.M.F; et al. Descriptive study of American tegumentary leishmaniasis in the urban area of the Municipality of Governador Valadares, Minas Gerais State, Brazil. *Rev Pan-Amaz. Saúde*, v.2, n.1, p.27-35, 2011.
- MORALES, B. A. A.; GARCÍA, F.; ROSSINI, V. M.; et al. Lesiones cutaneas parasitarias en el asno *Equus asinus* de Choroní, estado Aragua, Venezuela. *Neotrop. Helminthol.*, v.4, n.2, 2010.
- MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet. Parasitol.*, v.145, p.245-252, 2007.
- MORENO, A.C. *Epidemiologia da leishmaniose visceral humana em área urbana de Minas Gerais: Identificação da infecção assintomática e seus fatores de risco*. 2002. 274f. Tese (Doutorado em Parasitologia: Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MOSLEH, I. M.; SALIBA, E. K.; A1-KHATEEB, M. S.; et al. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Trop.*, v.59, n.1, p.163-172, 1995.
- MÜLLER, N.; WELLE, M.; LOBSIGER, L.; et al. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Vet. Parasitol.*, v.166, p.346–351, 2009.
- NOGUEIRA, L. S. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *An. Bras. Dermatol.*, v.76, n.1, p.51-62, 2001.
- OIE. Leishmaniosis. In:__. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6. ed. 2008. Parte 2, Cap. 8, p.240-250. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/He>

alth_standards/tahm/2.01.08_LEISHMANI
OSIS.pdf Acesso em: 25/09/2011.

OLIVEIRA, J. *Hemodiálise em equinos hípidos: avaliação clínica e laboratorial*. 2007. 257p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, C.C.G.; LACERDA, H.G.; MARTINS, D.R.M.; et al. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop.*, v. 90, n. __, p.155-162, 2004.

OLIVEIRA, C.D.; MORAIS, M.H.; MACHADO-COELHO, G.L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cad. Saúde Pub.*, v.24, n. __, p.2953-2958, 2008.

OLIVEIRA, F.S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; et al. PCR based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.129, n. __, p.219–27, 2005.

OLIVEIRA-NETO, M.P.; MARZOCHI, M.C.A.; GRIMALDI JR, G.; et al. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania*

braziliensis braziliensis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.80, n. __, p.587–592, 1986.

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

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E.G.; MELRO, M.C.; et al. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop.*, v.69, n. __, p.75-83, 1998.

PASSOS, V.M.A.; FALCÃO, A.L.; KATZ, N. Urban American Cutaneous Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.85, n.2, p.243-244, 1990.

PASSOS, V.M.A.; FALCÃO, A.L.; MARZOCHI, M.C.A.; et al. Epidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in a periurban area of the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.88, n.1, p.103-110, 1993.

PASSOS, V.M.A.; BARRETO, S.M.; ROMANHA, A.J.; et al. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test

- as a predictor of relapse after treatment. *Bull. World Health Organization*, v.78, n.8, p.968-974, 2000.
- PASSOS, V.M.A.; BARRETO, S.M.; ROMANHA, A.J.; et al. Leishmaniose tegumentar na Região Metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, n.5, p.5-12, 2001.
- PEDRAS, M. J.; ORSINI, M.; CASTRO, M.; et al. Antibody subclasse profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diag. Microb. Inf. Dis.*, v.47, n._, p.477-485, 2003.
- PIARROUX, R.; AZAIEZ, R.; LOSSI, A.M.; et al. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Hyg.*, v.49, p.364-369, 1993.
- PIRMEZ, C.; MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G. Experimental canine mucocutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.83, n.2, p.145-151, 1988.
- QUARESMA, P.F.; RÊGO, F.D.; BOTELHO, H.A.; et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.105, n._, p.579-585, 2011.
- QUEIROZ, R.G., VASCONCELOS, I.A.B., VASCONCELOS, A.W.; et al. Cutaneous leishmaniasis in Ceará State in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturité municipality. *Am. J. Med. Hyg.*, v.50, n._, p.693-698, 1994.
- RAJASEKARIAH, G. R.; RYAN, J. R.; HILLIER, S. R. et al. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. *J. immunol. Meth.*, v.252, n._, p.105-119, 2001.
- RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. 367p.
- RAZERA, F.; BLANCO, L.F.O.; BONAMIGO, R.R. Leishmaniose tegumentar americana: primeiros casos autóctones notificados no Rio Grande do Sul desde 2001 e revisão da literatura. *Rev. AMRIGS*, v.49, n.3, p.165-170, 2005.
- REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates

- and blood. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.__, p.2931-2935, 1999.
- REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v.81, n.__, p.68-75, 2006.
- REIS, H. R.; LOPES-MORI, F. M. R.; REIS, C. R.; et al. Soroprevalência da Leishmaniose tegumentar americana (LTA) canina e fauna de Flebotómíneos (Diptera: Psychodidae) em Bela Vista do Paraíso, Paraná. *Semina: Ciênc. Agrar.*, v.32, n.3, p.1083-1094, 2011.
- REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.61, n.__, p.530-541, 1999.
- REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies., *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.96, n.__, p. 123-126, 2002.
- REITHINGER. R.; DUJARDIN, J. C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.
- REITHINGER, R.; ESPINOZA, J. .C.; COURTENAY, O.; DAVIES, C. R.. Evaluation of PCR as a diagnostic mass-screening tool to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs (*Canis familiaris*). *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, n.__, p. 1486-1493, 2003.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.*, v.7, n.__, p.581-596, 2007.
- REUSS, S.M.; DUNBAR, M.D.; MAYS, M.B.C.; et al.. Autochthonous *Leishmania siamensis* in horse, Florida, USA. *Emerg. Infect. Dis.*, v.18, n.9, p.1545-1546, 2012.
- ROBINSON, N. E. Normal agreement clinical data. In: ROBINSON, N. E. (Ed). *Current Therapy in Equine Medicine*. 4 ed. Philadelphia: Saunders Company, 1997. P. 761 – 772.
- RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; FRANCINO, O.; et al. *Leishmania* infection: laboratory diagnosing in the absence of a “Gold Standard”. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.82, n.2, p.251–256, 2010.
- ROLÃO, N.; MARTINS, M.J.; JOÃO, A.; CAMPINO, L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, v.12, n.__, p.183-186, 2005.

- ROMERO, G. A. S.; ORGE, M. G. O.; GUERRA, M. V. F; et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmanis (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop.*, v.93, n._, p.49-56, 2005.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, p. 453-483, 2001.
- SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A.A. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med. Vet.*, v.12, n._, p.315-317, 1998.
- SANTOS, G. P. L. S.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M. C. A. et al. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, n.2, p.161-166, 2005.
- SCHUBACH, T. M. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 98, p. 165-167, 2004.
- SESSA, P.A.; FALQUETO, A.; VAREJÃO, J.B.M. Tentativa de controle da leishmaniose tegumentar americana por meio do tratamento dos cães doentes. *Ca. Saúde Public.*, v.10, n.4, p.457-463, 1994.
- SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI JÚNIOR, G. Observações sobre Calazar em Jacobina, Bahia. VI - Investigações sobre reservatórios silvestres e comensais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.21, n._, p.23-27, 1988.
- SILVA, D.A. *Avaliação clínica e laboratorial de cães sororretores para Leishmania provenientes de inquérito sorológico realizado no município do Rio de Janeiro*. 2010. 54f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PIRMEZ, C.; et al. Short Report: Detection of *Leishmania* DNA by Polymerase Chain Reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.65, n._, p. 896-898, 2001.
- SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; TEIXEIRA, A. C.; et al. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control

program. *Vet. Parasitol.*, v.79, n.__, p.257-261, 2011.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.*, v.123, n.__, p.311-330, 2006.

SOARES, I.R.; PALHARES, M.S.; PRADO, L.G.; et al. Pesquisa de IgG anti-*Leishmania* sp. em equinos do município de Belo Horizonte, MG, Brasil. In: XVII CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2012, São Luís. *Anais do XVII Congresso de Parasitologia Veterinária*, p.204.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; SERRA, P.; et al. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Vet. J.*, v.35, n.3, p.320-323, 2003.

SPEIRS, V.C. Clinical examination of horses. Philadelphia: Saunders, 1997. 349p.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BURSHTAIN, O.; et al. Polymerase Chain Reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *J. Infect. Dis.*, v.189, n.__, p.1729-1733, 2004.

SUANKRATAY, C.; SUWANPIMOLKUL, G.; WILDE, H.; SIRIYASATIEN, P. Autochthonous visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus (HIV)-infected patient: the first in Thailand and review of

the literature. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.82, n.__, p.4-8, 2010.

SUKMEE, T.; SIRIPATTANAPIPONG, S.; MUNGTHIN, M.; et al. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *Int. J. Parasitol.*, v.38, n.__, p.617-622, 2008.

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

SZARGIKI, R.; CASTRO, E. A.; LUZ, E.; et al. Comparison of serological and parasitological methods for Cutaneous Leishmaniasis diagnosis in the State of Paraná, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.13, n.1, p.47-52, 2009.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas ELISAe RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp. em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.40, n.4, p.482-483, 2007.

UCHÔA, C.M.A.; SERRA, C.M.B.; DUARTE, R.; ET AL. Aspectos

- sorológicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana canina em Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, n.1, p.563-568, 2001.
- VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J. Immunol.* v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.
- VEDOVELLO FILHO, D.; JORGE, F.A.; LONARDONI, M.V.C.; et al. American Cutaneous Leishmaniasis in horses from endemic areas in the North-Central Mesoregion of Paraná State, Brazil. *Zoonoses Public Health*, v.55, p.149-155, 2008.
- VEXENAT, J.A.; BARRETO, A.C.; ROSA, A.C.O.; et al. Infecção natural de *Equus asinus* por *Leishmania braziliensis braziliensis* - Bahia, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.81, n.2, p.237-238, 1986.
- VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminar). *Brasil Médico*, v.25, n.1, p.411, 1911.
- VILLALOBOS, E.M.C.; CARVALHO, P.R.; LARA, M.C.C.S.H.; et al. Prevalence of immune response of healthy equines with antibodies anti *Leishmania chagasi* in an endemic area of leishmaniasis. *Middle-East J. Sci. Res.*, v.5, n.6, p.520-534, 2010.
- WEIGLE, K. A.; LABRADA, L. A.; LOZANO, C.; et al. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.1, p.601-606, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_94_9_eng.pdf Acesso em: 14/07/2012.
- YARBUH, L.; PREMOLI-DE-PERCOCO, G. Detection and identification of *Leishmania braziliensis* in cutaneous lesions using conventional techniques and PCR amplification probe. *Rev. Ecol. Lat. Am.*, v.6, n.2, p.01-07, 1999.
- YOSHIDA, E.L.A.; MARQUES, S.A.; STOLF, H.O.; et al. Infecção natural de *Equus caballus* por *Leishmania* sp - São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. med. Trop. São Paulo*, v.30, n.2, p.79-80, 1988.
- ZANETTE, M. F. *Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina*. 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.
- ZEYREK, F.Y.; KORKMAZ, M.; ÖZBEL, Y. Serodiagnosis of Anthroponotic

Cutaneous Leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL is highly endemic. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.14, n.11, p.1409-1415, 2007.

ZOVEIN, A.; EDRISSIAN, G.H.; NADIM, A. Application of the indirect fluorescent

antibody test in serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in experimentally infected mice and naturally infected *Rhombomys opimus*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.78, n.1, p.73-77, 1984.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1 - Carta de Consentimento

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

Eu, _____, portador da cédula de identidade _____, e participante do **Projeto de Extensão “Correção Ambiental e Reciclagem com Carroceiros de Belo Horizonte”** autorizo a utilização da amostra de sangue coletada, dos dados da avaliação física, das fotos realizadas e das informações geradas no questionário em pesquisas científicas na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

8.3. ANEXO 3: Primeira bateria de exames para padronização do ELISA

Primeira bateria de exames na busca pela melhor combinação da concentração de antígeno ($\mu\text{g/mL}$), diluição de soro e título do conjugado para técnica do ELISA na detecção de imunoglobulinas IgG totais anti-*Leishmania* sp. na espécie equina. O quadro apresenta as combinações, as médias das absorbâncias dos controles negativos e positivos e o SN (*signal-to-noise*). Testes realizados com dois controles positivos e três potros de 24 horas de vida como controles negativos.

Combinação	ANTÍGENO	SORO	CONJUGADO	ABSNEG	ABSPOS	SN
Combinação 1	1	400	10000	0,060	0,080	1,330
Combinação 2	1	400	20000	0,064	0,070	1,094
Combinação 3	1	400	30000	0,056	0,064	1,143
Combinação 4	1	800	10000	0,055	0,082	1,491
Combinação 5	1	800	20000	0,057	0,065	1,140
Combinação 6	1	800	30000	0,062	0,065	1,048
Combinação 7	2,5	400	10000	0,058	0,103	1,776
Combinação 8	2,5	400	20000	0,059	0,075	1,271
Combinação 9	2,5	400	30000	0,056	0,064	1,143
Combinação 10	2,5	800	10000	0,069	0,113	1,638
Combinação 11	2,5	800	20000	0,060	0,067	1,117
Combinação 12	2,5	800	30000	0,061	0,074	1,213
Combinação 13	5	400	10000	0,077	0,133	1,727
Combinação 14	5	400	20000	0,070	0,119	1,700
Combinação 15	5	400	30000	0,064	0,104	1,625
Combinação 16	5	800	10000	0,108	0,153	1,417
Combinação 17	5	800	20000	0,071	0,102	1,437
Combinação 18	5	800	30000	0,065	0,099	1,523
Combinação 19	10	400	10000	0,070	0,146	2,086
Combinação 20	10	400	20000	0,064	0,137	2,141
Combinação 21	10	400	30000	0,060	0,122	2,030
Combinação 22	20	800	10000	0,072	0,167	2,319
Combinação 23	20	800	20000	0,071	0,104	1,465
Combinação 24	20	800	30000	0,069	0,134	1,942

8.4. **ANEXO 4:** Segunda bateria de exames para padronização do ELISA

Segunda bateria de exames na busca pela melhor combinação da concentração de antígeno ($\mu\text{g/ml}$), diluição de soro e título do conjugado para técnica do ELISA na detecção de imunoglobulinas IgG totais anti-*Leishmania* sp. nas espécie equina. O quadro apresenta as combinações, as médias das absorbâncias dos controles negativos e positivos e o SN (*signal-to-noise*). Testes realizados com dois controles positivos e quatro potros de 24 horas e dois de 48 horas de vida como controles negativos.

Combinação	ANTÍGENO	SORO	CONJUGADO	ABSNEG	ABSPOS	SN
Combinação 19	10	400	10000	0,079	0,308	3,900
Combinação 20	10	400	20000	0,058	0,196	3,370
Combinação 21	10	400	30000	0,039	0,132	3,400
Combinação 22	20	800	10000	0,042	0,210	5,028
Combinação 23	20	800	20000	0,020	0,108	5,287
Combinação 24	20	800	30000	0,015	0,071	4,841