

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**ASPECTOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*
sp EM EQUÍDEOS DE TRACÇÃO DO DISTRITO FEDERAL, BRASIL.**

Nádia Valesca Biral de Oliveira Peixoto de Mello

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ASPECTOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR
LEISHMANIA sp. EM EQUÍDEOS DE TRACÇÃO DO DISTRITO
FEDERAL, BRASIL.**

NÁDIA VALESCA BIRAL DE OLIVEIRA PEIXOTO DE MELLO

Sob orientação da professora
Isabele da Costa Angelo

e co-orientação do professor
Huarrisson Azevedo Santos

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Março de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B527a Biral de Oliveira Peixoto de Mello, Nádia Valesca ,
1970-
ASPECTOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR
LEISHMANIA sp EM EQUÍDEOS DE TRAÇÃO DO DISTRITO
FEDERAL, BRASIL. / Nádia Valesca Biral de Oliveira
Peixoto de Mello. - 2017.
90 f.: il.

Orientadora: Isabele da Costa Angelo.
Coorientadora: Huarrisson Azevedo Santos.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2017.

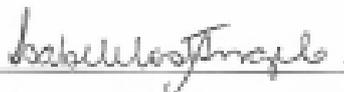
1. Leishmanioses. 2. epidemiologia. 3. Rifi,
Elisa. 4. equídeos. 5. Brasília. I. da Costa Angelo,
Isabele, 1981-, orient. II. Azevedo Santos,
Huarrisson, 1980-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Ciências Veterinárias. IV.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

NÁDIA VALESCA BIRAL DE OLIVEIRA PEIXOTO DE MELLO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03/03/2017.



Isabele da Costa Angelo, Dra, UFRRJ
(Orientador)



Fernanda Nunes Santos, Dra, FIOCRUZ



Valmir Laurentino Silva, Dr., FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

Eu dedico meu trabalho de mestrado à Medicina Veterinária e, com ela a todos os animais. Profissão que escolhi ao acaso, nos meus 17 anos de idade, e que hoje não me vejo fora dela. Dedico aos cães e gatos que foram minha vida desde a graduação até os meus 43 anos de idade. Depois vieram os animais de produção e com eles os 411 equídeos da minha tese. Dedico a todos esses seres especiais que aprendi a amar e respeitar, pois sem eles eu não seria a profissional que sou hoje. Muito obrigada Medicina Veterinária, muito obrigada a todos os seres de quatro patas criados por Deus.

Gostaria de terminar esta dedicatória com o pensamento de Leonardo da Vinci que diz: “Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais e, neste dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra a humanidade”.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois Ele sempre me abençoou com amigos de verdade, me fez uma pessoa forte e determinada, que mesmo em situações muito difíceis me fez capaz de se ser uma fênix e, ressurgir das cinzas.

Em segundo a minha família, a minha mãe por cuidar do meu filho nos momentos em que eu estava às voltas com os estudos, ao meu pai por sempre ser tão presente e me ajudar financeiramente (Obrigada pelo carro alugado e não me deixar andar de ônibus, todos sabemos o que é andar de ônibus pelo Rio de Janeiro nos dias de hoje), as minhas irmãs Vanessa e Vivian, em especial a Vivian por me ajudar com meu filho em suas aulas particulares, a minha irmã emprestada Taynara por dedicar suas noites às aulas particulares ao meu filho, mesmo estando cansada após trabalhar o dia todo e, ao meu filho Henrique, que mesmo aos cinco anos de idade e sendo portador de TDAH compreendia a ausência da mãe.

A minha orientadora Isabele, difícil descrever esse ser humano, parceira, compreensiva, dedicada, uma verdadeira guerreira, me impulsionando a seguir em frente, sempre otimista e acreditando que eu era capaz. Ao Huarrisson, meu co-orientador, um cara espetacular, de uma inteligência invejável, sempre calmo e prestativo. Dois exemplos à grade de docentes de qualquer Universidade, de como se devem orientar alunos. Ao meu colega de profissão e amigo Clayton Gitti que me apresentou a Isabele me impulsionando nesta nova fase profissional.

A equipe da Fiocruz, em especial ao Valmir e a Fernanda, dois seres especiais. Valmir sem palavras, um cara simples, amigo, de excelentes conselhos, um ser que segundo a Fernanda vive no mundo dos ursinhos carinhosos e eu espero sinceramente que ele nunca saia de lá, pois deve ser um lugar especial para tê-lo como morador. A Fernanda difícil descrevê-la, guerreira, parceira, com um humor ácido que eu adoro, igual ao meu. Eu me senti em casa na Fiocruz, como se já os conhecesse por toda uma eternidade, provavelmente sim.

Aos meus amigos de trabalho da SEAGRI/DF, em especial a Daniella, como descrevê-la, calada, prestativa, amiga, comprometida com o serviço, foram 411 amostras de Equídeos durante três semanas que nós duas incansavelmente trabalhamos com afínco, muitas vezes sem almoçar, no entanto, era minha obrigação, mas para ela foi simplesmente paixão pelo que faz. Ganhei uma irmã caçula, que pode contar comigo sempre para o que precisar. Aos meus amigos de serviço de Brazlândia, que compreenderam minha ausência e ajudaram quando precisei, em especial ao Raison, sempre me dando força quando fraquejava, não me deixando desistir, guerreiro, trabalhador, um exemplo a ser seguido de que quando queremos tudo podemos. Um ser humano justo e honesto, um filho para mim. Ao meu chefe Vinícius, chefe no trabalho, mas o maior amigo que aqui conquistei sempre preocupado com a situação difícil que estava vivendo, com palavras de conforto, às vezes duras para me chamar para realidade, um verdadeiro líder.

Ao Distrito Federal e aos amigos que aqui conquistei, Estado que me acolheu e me permitiu conhecer outro lado da Medicina Veterinária, profissão que tanto amo, que me fez crescer como ser humano e conquistar tudo que tenho. Aos meus novos amigos, Flávio, Rose, Júnior, Delson, Renner, Marise, Fátima, Emiliane, Fernanda, Julianna, Dani, Tábata, Rosane, Vítor, Rildo e todos da SEAGRI, sem vocês seria muito difícil estar longe da família e dos amigos que deixei no Rio de Janeiro.

Aos proprietários e seus equídeos que participaram desse estudo, pessoas simples, que vivem à margem da sociedade, muitos em situação de extrema miséria, e aos animais muitos sofrendo maus tratos, usados única e exclusivamente para trabalho de tração, sendo mal alimentados e vivendo em locais extremamente insalubres. Sem eles não seria possível a realização do meu trabalho.

Muitos me falavam que quem entra para o mestrado vive um filme que eu daria o nome de “Pague para entrar e reze para sair”, mas não foi esse o meu filme e, tenho certeza que se deve principalmente a essas pessoas que me cercaram durante este período. Foi cansativo, mas jamais uma provação. Colocando em uma balança o saldo positivo foi enorme: Retornei a minha Universidade amada, a Rural, “uma vez veterinária, veterinária da Rural”; Fiz amigos para uma eternidade, na verdade reencontrei seres amados de outras vidas; Voltei a estudar, como sentia falta disso e; as idas ao Rio de Janeiro possibilitaram reencontrar meus amigos que lá deixei há mais de três anos e de quem muito sentia saudades, Paty, Regina, Andrea, Lucienne, Cátia, Claudio bolão, Mauro, Valério, Lília, Robson, Cinthia, Carlos, Elienae, Fátima, Patrícia e os paulistas que pude rever Claudio, Valéria e Cristiane. Amigos de jornada, amigos de uma eterna caminhada.

Não sei se já estou pronta para outra, segundo minha orientadora Isabele, sim, mas o mestrado foi um grande aprendizado, foi mais uma etapa concluída, então, que venha o doutorado.

BIOGRAFIA

Nádia Valesca Biral de Oliveira Peixoto de Mello, filha de Maria da Penha Biral de Oliveira e José Alves de Oliveira Filho, nasceu em 13 de Abril de 1970, na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro. Realizou os ensinamentos fundamental e médio no Colégio Nossa Senhora do Rosário, localizado em Campo Grande, no município do Rio de Janeiro e, concluiu o ensino médio em 1987.

No ano de 1988 ingressou no curso de Medicina Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), concluindo o curso em 1993.

Durante a graduação, no ano de 1989 foi estagiária bolsista da prefeitura do Rio de Janeiro, realizando durante um ano trabalhos de vigilância epidemiológica no Centro de Controle de Zoonoses, situado em Santa Cruz, no município do Rio de Janeiro. Realizou estágios em clínicas de pequenos animais e no hospital de pequenos animais da UFRRJ.

Desde a graduação em 1993 até o ano de 2013 atuou em clínica e cirurgia de pequenos animais, na SUIPA, Veterinária Alvorada, num abrigo de felinos situado em Guaratiba e em consultório por ela fundado, a Veterinária Patas e Pelos, em Santa Margarida, Campo Grande, Rio de Janeiro.

No ano de 2006 ingressou na especialização *lato-sensu*, pela Universidade Castelo Branco, em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, tendo como tese de dissertação o tema: “Fascíola hepática um problema que ainda preocupa a inspeção”. Sob orientação do professor Júlio Fernandes.

Em Novembro de 2013 foi convocada num concurso público realizado em 2009, na Secretaria de Agricultura do Distrito Federal (SEAGRI/DF), aonde atua até os dias de hoje, trabalhando na área de Defesa Animal.

RESUMO

MELLO, Nádya Valesca Biral de Oliveira Peixoto de. **Aspectos soroepidemiológicos da infecção por *Leishmania* sp em equídeos de tração do Distrito Federal, Brasil.** 2017. 90p Dissertação (Mestrado em Ciências, Epidemiologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2017.

A leishmaniose em equídeos é uma realidade no mundo, sendo esta família descrita como reservatório para a doença desde 1927. Esses animais desenvolvem uma forma cutânea, de caráter benigno, tendo em sua maioria a cura espontânea. No Distrito Federal (DF), equídeos de tração são amplamente usados como meio de transporte e trabalho, estando inseridos diretamente dentro da cidade, em contato íntimo com cães e seres humanos. Vivem na maioria das vezes em currais comunitários, ambientes extremamente insalubres, com poucas condições higiênico-sanitárias, que atraem grande quantidade de insetos. O presente trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. através das técnicas de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em equídeos de tração no DF e descrever possíveis variáveis epidemiológicas associadas com esta prevalência. A população de equídeos do DF é estimada em 1682 animais (SEAGRI/DF), distribuídos em 20 regiões administrativas (RA). O cálculo do tamanho da amostra foi realizado de acordo com Medronho (2009) e os animais foram selecionados de forma aleatória em cada RA, sendo 178 (43,31%) sororreagentes no ELISA, 197 (47,93%) na RIFI e 111 (27,01%) reagentes em ambas as técnicas ELISA/RIFI. Foi utilizado um questionário semiestruturado e as variáveis associadas com a prevalência de anticorpos foram analisadas pelo Qui quadrado, no programa BioEstat, versão 5.0. As seguintes variáveis foram consideradas significativas ($p \leq 0,05$): sexo, tempo de permanência com o proprietário e se os animais já deixaram o DF, quando analisados os animais reagentes na RIFI; sexo, localidade, métodos de redução de insetos no ambiente, tempo de permanência com o proprietário e se os animais já deixaram o DF, quando analisados os animais reagentes no ELISA e; sexo, usar repelente nos animais, se os animais já deixaram o DF, mucosa ocular e, entrada em áreas com córrego, quando analisados os reagentes na RIFI/ELISA. Novos estudos que possam auxiliar no melhor entendimento da participação dos equídeos na manutenção do ciclo epidemiológico de *Leishmania* sp serão de grande importância e possibilitarão a preconização de medidas de controle mais eficientes. O presente trabalho colaborou ao demonstrar a possibilidade de equídeos estarem se infectando e apresentando um papel importante na cadeia epidemiológica de *Leishmania* sp e na manutenção da doença no território do DF.

Palavras-chave: Leishmaniose, epidemiologia, RIFI, ELISA, equídeos, Brasília, Distrito Federal.

ABSTRACT

MELLO, Nádia Valesca Biral de Oliveira Peixoto de. Seroepidemiological aspects of *Leishmania* sp infection in traction equidae from the Federal District, Brazil. 2017. 90p Dissertation (Master of Science, Veterinary Epidemiology). Institute of Veterinary Medicine, Department of Epidemiology and Public Health. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2017.

Leishmaniasis in equidae is a reality in the world, and this family has been described as reservoir for the disease since 1927. These animals develop a cutaneous form, of a benign nature, most of them spontaneous cure. In the Federal District (FD), traction equids are widely used as means of transportation and work, being inserted directly inside the city, in close contact with dogs and humans. They live mostly in community pens, extremely unhealthy environments, with few hygienic-sanitary conditions, which attract large numbers of insects. The present study aimed to determine the prevalence of anti-*Leishmania* sp. Through the techniques of Indirect Immunofluorescence (IFI) and the Immunoenzymatic Assay (ELISA) in traction equids in the FD and to describe possible epidemiological variables associated with this prevalence. The FD equidae population is estimated to be 1682 animals (SEAGRI / FD), distributed in 20 administrative regions (AR). The sample size was calculated according to Medronho (2009) and the animals were randomly selected in each AR, of which 178 (43.31%) were seroreagents in the ELISA, 197 (47.93%) in the IFI and 111 (27.01%) reagents in both ELISA /IFI techniques. A semi-structured questionnaire was used and the variables associated with the prevalence of antibodies were analyzed by Qui-square in the BioEstat program, version 5.0. The following variables were considered significant ($p \leq 0.05$): sex, length of stay with the owner and whether the animals had already left the FD, when the animals were analyzed in the IFI; Sex, locality, methods of reducing insects in the environment, residence time with the owner and if the animals have already left the FD, when analyzing the reactive animals in the ELISA and; Sex, to use repellent in the animals, if the animals have already left the FD, ocular mucosa and, entered in areas with stream, when the reagents in the IFI / ELISA were analyzed. New studies that may help to better understand the participation of equidae in the maintenance of the epidemiological cycle of *Leishmania* sp will be of great importance and will allow the recommendation of more efficient control measures. The present work collaborated in demonstrating the possibility of equidae being infected and presenting an important role in the epidemiological chain of *Leishmania* sp and in the maintenance of the disease in the territory of the Federal District.

Key words: Leishmaniasis, epidemiology, IFI, ELISA, equidae, Brasília, Federal District.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas geográficas das Regiões Administrativas envolvidas no inquérito soropidemiológico em equídeos de tração para infecção por <i>Leishmania</i> sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril e Maio de 2016	23
Tabela 2. Quadro explicativo para os cálculos da Co-positividade, Co-negatividade, Concordância bruta e Concordância ajustada – <i>Kappa</i> (K.) segundo Pereira (1995).	26
Tabela 3. Padronização da técnica de RIFI: diluições realizadas até que todos os soros de equídeos fossem considerados não reagentes para leishmaniose	27
Tabela 4. Relações de concordância entre os dois testes sorológicos sob titulação $1 \geq 80$.	28
Tabela 5. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a área aonde vive o animal, na investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por <i>Leishmania</i> sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril e Maio de 2016.	29
Tabela 6. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a proximidade dos animais com áreas de mata em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por <i>Leishmania</i> sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril e Maio de 2016.	30
Tabela 7. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a presença de outros animais no mesmo ambiente dos equídeos em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por <i>Leishmania</i> sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril e Maio de 2016.	32
Tabela 8. Distribuição das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a proximidade de animais silvestres em relação aos abrigos dos equídeos, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por <i>Leishmania</i> sp. no Distrito Federal, no período de Abril a Maio de 2016.	34
Tabela 9. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com o contato dos animais com ambientes contendo acúmulo de matéria orgânica, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por <i>Leishmania</i> sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.	36
Tabela 10. Distribuição das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com o sexo, em investigação da soroprevalência em equídeos de tração para infecção por <i>Leishmania</i> sp. no Distrito Federal, Brasil no período de Abril a Maio de 2016.	36
Tabela 11. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com o abrigo dos animais, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por <i>Leishmania</i> sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.	38
Tabela 12. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a distância entre o abrigo dos animais e a residência humana, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração	39

para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Tabela 13. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a entrada dos animais em áreas de pasto, córregos, mata e urbana em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 41

Tabela 14. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a proteção individual contra insetos e ectoparasitas realizada nos animais e de acordo com a remoção de matéria orgânica e lixo do ambiente em que vive o animal, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 44

Tabela 15. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a assistência médico-veterinária realizada nos animais, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 45

Tabela 16. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com o conhecimento do proprietário em relação a doença pesquisada, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 46

Tabela 17. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a ocorrência de lesão em seres humanos e em animais, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 47

Tabela 18. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a ocorrência de leishmaniose em alguma pessoa da família, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 48

Tabela 19. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a avaliação da mucosa ocular, mucosa oral, escore corporal e dermatopatias em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 50

Tabela 20. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a Região Administrativa em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 53

Tabela 21. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a localidade do nascimento do animal, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 56

Tabela 22. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com os nascidos na propriedade e com viagens para outros Estados em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de 58

Abril a Maio de 2016.

Tabela 23. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com o tempo em que o animal vive sob a guarda do tutor, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 59

Tabela 24. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a idade dos animais, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 60

Tabela 25. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com as principais pelagens encontradas, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016. 62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa das Regiões Administrativas do Distrito Federal, usadas no inquérito soropidemiológico em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril e Maio de 2016 22
- Figura 2.** Residências aonde vivem equídeos a menos de 200 metros de áreas de mata na Região Administrativa de Samambaia, Distrito Federal. 30
- Figura 3.** Estábulos com a presença de outras espécies interagindo com os equídeos em Região Administrativa do Distrito Federal. 31
- Figura 4.** Animais durante o período de trabalho nas ruas do Distrito Federal. 35

LISTA DE ABREVIACÕES

AC	Antes de Cristo
BHI	<i>Brain, Heart Infusion</i>
COMEP	Comitê de ética em pesquisa
DALY	Disability-adjusted life years
DC	Depois de Cristo
DEET	N,N-Dietil-n-tolnamida
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade Ótica
EIE	Ensaio Imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H2SO4	Ácido sulfúrico
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
IGg	Imunoglobulina G
IR	Índice de Reatividade
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LTC	Leishmaniose tegumentar canina
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVH	Leishmaniose visceral humana
MG	Minas Gerais
MS	Mato Grosso do Sul
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de Sódio
NNN	Nicolle, McNeal & Novy
OMS	Organização Mundial de saúde
P	Prevalência
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethanesulfonyl Fluoride
PPP	Período Pré Patente
PV-LTA	Programa de Vigilância-Leishmaniose Tegumentar Americana
RA	Região Administrativa
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SCIA	Sector Complementar de Indústria e Abastecimento

SDS Sódio-Dodecil-Sulfato
SEAGRI/DF Secretaria de Agricultura do Distrito Federal
SP São Paulo
TAD Teste de Aglutinação Direta
TMB Tetrametilbenzidina
TRALd Teste rápido para detecção de Anticorpos contra *Leishmania donovani*
UF Unidade Federativa
UFRRJ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico da Leishmaniose	3
2.2. Agentes Etiológicos e seus Vetores	4
2.3 Biologia do Vetor	6
2.4. A doença no Brasil e no Mundo	6
2.5. Epidemiologia	8
2.6. A Leishmaniose e os Equídeos	9
2.7. O Distrito Federal	10
2.8. Leishmaniose e o Distrito Federal	11
2.9. Manifestações Clínicas	13
2.10. Diagnóstico	14
2.10.1 Levantamento epidemiológico	14
2.10.2 Diagnóstico laboratorial	14
2.10.3 Diagnóstico sorológico	15
2.10.3.1 Intradermorreação de Montenegro (IDRM)	15
2.10.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	16
2.10.3.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	17
2.10.3.4 Teste Imunocromatográfico	18
2.10.3.5 Testes moleculares	18
2.11. Prevenção e controle	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Submissão ao Comitê de Ética	22
3.2. Delineamento Experimental e Área de Estudo	22
3.3. Coleta de Dados e Amostras de Sangue	23
3.4. Crescimento e Manutenção de <i>Leishmania (L.) infantum</i> <i>in vitro</i> , Produção de Antígenos e Dosagem de Proteínas	24
3.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	24
3.6 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	25
3.6.1 Soros controle	25
3.6.2 Determinação da proteína bloqueadora	25
3.6.3 Titulação pareada de antígeno e conjugado enzimático	25
3.6.4 Estabelecimento do <i>cut off</i>	25
3.6.5 Realização do ELISA com as amostras séricas equídeas	25
3.7. Comparação entre as técnicas RIFI e ELISA	26
4 RESULTADOS	27
4.1. Ajuste da Concentração dos Imunorreagentes	27
4.2. Comparação entre as Técnicas Sorológicas(RIFI e/ou ELISA)	27
4.3. Análise do Questionário	28
4.3.1 Dados pessoais do tutor	28
4.3.2 Proximidade entre o abrigo do equídeo e área de mata	29
4.3.3 Presença de outros animais domésticos no mesmo ambiente	30
4.3.4 Presença de animais silvestres próximos ao abrigo do equídeo	34
4.3.5 Acesso do animal à área de mata ou aonde exista acúmulo de matéria orgânica	34

4.3.6 Sexo: Macho ou Fêmea	36
4.3.7 Abrigo do animal	37
4.3.8 Acesso dos equídeos a locais de risco	39
4.3.9 Prevenção individual e ambiental	43
4.3.10 Assistência médico-veterinária	44
4.3.11 Conhecimento dos tutores sobre a doença	45
4.3.12 Presença de pessoas ou animais com lesões que não cicatrizam	46
4.3.13 Diagnóstico positivo em familiares ou animais	47
4.3.14 Exame clínico dos equídeos	48
4.3.15 Regiões administrativas	52
4.3.16 Dados referentes ao nascimento, tempo de posse e viagens do equídeo para fora do DF	56
4.3.17 Idade do animal	60
4.3.18 Cor de pelagem	61
5 DISCUSSÃO	63
5.1. Comparação entre as técnicas RIFI e ELISA	63
5.2. Análises das variáveis: sexo e idade dos animais	65
5.3. Análise da variável: cor da pelagem	65
5.4. Análise das variáveis: origem e trânsito dos animais	65
5.5. Análise da variável: tempo de posse dos tutores	66
5.6. Análise da variável: Região Administrativa	66
5.7. Análise da variável: região da residência: urbana ou rural	67
5.8. Análise da variável: proximidade do local aonde o animal vive com a mata	67
5.9. Análise da variável: presença de outros animais domésticos no mesmo ambiente	67
5.10. Análise da variável: presença de animais silvestres próximos ao habitat dos equídeos	68
5.11. Análise da variável: local aonde o animal dorme	68
5.12. Análise das variáveis: manejo estabelecido pelos proprietários aos animais e ao ambiente	68
5.13. Análise das variáveis entrada em mata, córrego, pasto e ambiente urbano	69
5.14. Análise da variável: assistência médico-veterinária	69
5.15. Análise da variável: exame clínico dos animais	70
5.16. Análise da variável: conhecimento sobre a doença	70
5.17. Análise das variáveis: presença de pessoas e animais com lesões cutâneas e, diagnóstico em algum familiar ou animal de estimação	71
6 CONCLUSÕES	72
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	85
Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	85
Anexo B - Questionário Epidemiológico Semiestruturado	86
Anexo C -Curral comunitário da Região Administrativa do Guará, Distrito Federal com ênfase na residência de tutores de equídeos e acúmulo de lixo	89
Anexo D - Curral comunitário da Região Administrativa do Recanto das Emas, Distrito Federal com ênfase na sua localização a menos de 200 metros de região de mata e acúmulo de lixo.	90

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária de caráter crônico, infecciosa e não contagiosa, considerada zoonose reemergente, negligenciada e, que tem grande relevância para a saúde pública, estando associada diretamente a populações vulneráveis (ALVAR et al., 2006; PACE, 2014), entretanto é encontrada de forma endêmica na maioria dos países do sul da Europa (PACE, 2014). Causada pelo parasito *Leishmania* sp, de ciclo digenético, necessita de um hospedeiro invertebrado, o vetor flebotomíneo, e de um hospedeiro vertebrado, animais domésticos e silvestres e o homem. No hospedeiro vertebrado é um parasito intracelular obrigatório.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2016), cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, sendo que 14 milhões estão diretamente afetadas pela doença. Mundialmente surgem de 900 mil a 1,3 milhões de novos casos por ano, sendo 200 a 400mil de leishmaniose visceral (VL) e 700 mil a 1,3 milhões de leishmaniose cutânea. A doença mata de 20 mil a 30 mil pessoas por ano e está entre as seis doenças parasitárias mais importantes no mundo, perdendo somente para malária quando se refere à mortalidade e é a terceira em morbidade em crianças com menos de 15 anos, ficando atrás somente da malária e esquistossomose (WHO, 2016)

Descrita em 98 países e em três continentes, exceto Austrália e Antártica (LARSON et al., 2016), a leishmaniose é de notificação obrigatóriasamente em 33 países onde ocorre (DESJEUX, 2004). Sua ocorrência também vem aumentando em países onde não era endêmica, principalmente em pessoas imunossuprimidas, devido à coinfeção e, por viajantes infectados oriundos de áreas endêmicas (MANSUETO et al., 2014). Tem afetado mais crianças do que adultos (PACE, 2014) e está associada entre as três mais comuns doenças dermatológicas relacionadas a viajantes (STEBUT, 2015).

A leishmaniose pode se manifestar de três formas, dependendo da espécie envolvida, e são elas, visceral, cutânea e muco cutânea. É classificada em dois subgêneros, de acordo com suas diferenças anatômicas: *Leishmania* no NovoMundo (Américas) e Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Viannia* endêmica somente no Novo Mundo (PACE, 2014). Os principais hospedeiros vertebrados são os animais silvestres. No Brasil, o principal reservatório natural da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ainda não é bem conhecido, porque o ciclo de transmissão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* é primariamente florestal e, a associação humana está relacionada à sua penetração em florestas ou em densa vegetação onde há forte suspeita de que mamíferos silvestres possam ser os reservatórios naturais para esta espécie do parasito (BRASIL, 2010; QUARESMA et al., 2011). Entretanto, na leishmaniose visceral, causada por *Leishmania (Leishmania) infantum*, sabe-se que canídeos silvestres, masurpias e o cão doméstico são os principais reservatórios (BRASIL, 2006).

Desde 1927, equídeos têm sido descritos em todo o mundo sendo parasitados pelas duas principais espécies de *Leishmania* sp. A doença se caracterizou na forma cutânea, tendo a grande maioria apresentado cura espontânea das lesões, sendo uma característica importante nesta espécie. Alguns animais tiveram a excisão cirúrgica das lesões, sendo que uns apresentaram recidivas, e precisaram de tratamento medicamentoso. As manifestações clínicas são usualmente caracterizadas por lesões nodulares ou papulares, simples ou múltiplas, na cabeça, membros, axilas e região inguinal (GAMA et al., 2014). A importância dos equídeos na manutenção do ciclo do parasito ainda permanece desconhecida. Acredita-se que eles possam atuar como

reservatórios, mas poucos estudos foram descritos nesta espécie, sendo assim, ainda não é conhecido se os flebotomíneos podem infectar-se a partir do repasto sanguíneo em equídeos parasitados.

Equídeos de tração são amplamente usados como meio de transporte e trabalho no território do DF, estando inseridos diretamente dentro da cidade, muitas vezes vivendo em cocheiras e currais comunitários, em ambientes extremamente insalubres, com poucas condições higiênico-sanitárias, onde existe grande concentração de inseto se matéria orgânica, que propiciam o desenvolvimento do vetor *Lutzomyia* sp.

Desta maneira, estudos que possam auxiliar no melhor entendimento da participação dos equídeos na manutenção de *Leishmania* sp. na cadeia epidemiológica da doença são de grande importância, possibilitando a preconização de medidas de controle de maior eficiência. Sendo assim, o presente trabalho determinou a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em equídeos de tração no Distrito Federal, Brasil, por meio das técnicas de Imunofluorescência indireta (RIFI) e do ensaio imunoenzimático (ELISA), bem como descreveu os fatores sócio-epidemiológicos associados com a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. nesses animais, mediante a aplicação e análise de um questionário semiestruturado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da Leishmaniose

A leishmaniose teve sua primeira descrição evidente em 2000 Antes de Cristo (AC), em múmias egípcias e núbias cristãs, que continham lesões similares às provocadas por *Leishmania donovani*. No primeiro século depois de Cristo (DC), foram descritas lesões cutâneas da doença no Equador e Peru (CARDOSO et al., 2014; AKHOUNDI et al., 2016). Nas Américas foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, de 400 a 900 anos DC, provenientes de índios do Peru, que continham lesões mutiladas em lábios e narizes, atualmente conhecidas como leishmaniose mucocutânea (BASANO et al., 2004). No século 10 foram descritas chagas denominadas “balakh” e a probabilidade da participação do mosquito na transmissão. Em 1756, Russel fez a primeira descrição detalhada da doença e, no mesmo ano, pesquisadores indianos descreveram sintomas clínicos de “Kala-azar”, que significa “febre negra” (AKHOUNDI et al., 2016).

Em 1885, em Calcutá, um militar médico indiano, chamado Cunningham, descreveu o parasito numa ferida cutânea, que denominou febre de Deli (BARI, 2006; COX, 2016). No Brasil, Moreira em 1895 identificou a existência do botão endêmico dos países quentes e denominou “botão da Bahia” ou “botão de Biskra” (BARI, 2006, BRASIL, 2010).

No século 20, Leishman, em 1901, identificou os organismos como sendo “tripanosomas”, a partir de esfregaços realizados em baço de um paciente indiano que morreu de febre “dum-dum”. Donovan, no mesmo ano, confirmou a presença desses organismos, que ficaram conhecidos como corpos “Leishman-Donovan” (CARDOSO et al., 2014; AKHOUNDI et al., 2016; COX, 2016).

O agente causador do botão do oriente do Velho Mundo foi descoberto em 1903 e denominado *Leishmania tropica* em 1906 (LAINSON, 2010; COX, 2016). Esta foi a primeira descrição que relacionou estes organismos com “Kala-azar”, e, em 1903, Ross propôs o nome *Leishmania donovani* para os mesmos (AKHOUNDI et al., 2016). Em 1904, Leishman e Rogers descreveram as duas formas do parasito, amastigota e promastigotas. Patton, em 1907, evidenciou a presença de organismos Leishman-Donovan em linfócitos do sangue periférico de vertebrados e formas flageladas no intestino dos mosquitos. Nicolle, em 1908, isolou o parasito de uma criança, e denominou o mesmo *Leishmania infantum* e diferenciou a leishmaniose visceral (LV) mediterrânea causada por *L. infantum* da decorrente de *L. donovani* que provoca a “Kala-azar” indiana (COX, 2002; AKHOUNDI et al., 2016). Lindenberg, em 1909, encontrou o parasito em trabalhadores nas áreas de desmatamento na construção de rodovias no interior de São Paulo, confirmando a presença de *Leishmania* sp. em feridas cutâneas e nasofaríngeas (CARDOSO et al., 2014). Em 1911, Splendore diagnosticou a forma mucosa da doença e Gaspar Vianna deu ao parasito o nome de *Leishmania braziliensis*, agente da doença também conhecida como “úlceras de Bauru” ou Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (CARDOSO et al., 2014).

Aragão em 1922 demonstrou a participação do flebotomíneo na transmissão da leishmaniose tegumentar (LT) (BRASIL, 2010) e, em 1923, Montenegro inoculou experimentalmente por via intradérmica amostra de *L. braziliensis*, criando o teste intradérmico ou reação de Montenegro que é usado até hoje como meio de diagnóstico para leishmaniose cutânea (LC). No Brasil, em 1934, Penna relatou a presença de Leishman-Donovan, em 41 tecidos de vísceras analisadas no exame histopatológico de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela, provenientes do Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil (CONTI et al., 2016). Chagas (1936) descreveu a leishmaniose

visceral e, em parceria com Cunha, no ano seguinte isolou *L. chagasi* na leishmaniose visceral brasileira. Kirk, em 1949, classificou a leishmaniose de acordo com a morfologia do protozoário, características da cultura, aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção em humanos e em outros hospedeiros naturais, imunidade cruzada, testes sorológicos e xenodiferenciação, propondo uma nomenclatura completa do gênero *Leishmania* e seus sinônimos (AKHOUNDI et al., 2016). Em 1958, Forattini encontrou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do Estado de SP (BRASIL, 2010). A partir desta década a leishmaniose vem sendo descrita em diversos municípios de todas as Unidades Federativas do país (BRASIL, 2010).

2.2 Agente Etiológico e seus Vetores

Os agentes etiológicos das leishmanioses sistematicamente pertencem ao: Reino: Protista Haeckel, 1866; Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1817; Filo: Sarcomastigophora Honigberg e Balamuth, 1963; Subfilo: Mastigophora Desing, 1866; Classe: Zoomastigophora Calkins, 1909; Ordem: Kinetoplastida Honigberg, 1963, emend. Vickerman 1976; Subordem: Trypanosomatina Kent, 1880; Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905; Gênero: *Leishmania* Ross, 1903 (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SILVA, 2012).

O ciclo biológico deste parasito praticamente envolve animais silvestres, domésticos e flebotomíneos. Compreende a transmissão de um hospedeiro vertebrado para outro, através do hospedeiro invertebrado, o inseto vetor. Nos mamíferos, os parasitos assumem a forma amastigota, arredondada, imóvel e com flagelo curto contido na bolsa flagelar, com 3-5µm de comprimento e tem multiplicação intracelular obrigatória em células do sistema monocítico fagocitário. À medida que vão se multiplicando, por divisão binária, as formas amastigotas rompem os macrófagos e são fagocitadas por novos macrófagos. Nos flebotomíneos, as leishmanias vivem extracelularmente, no trato digestivo. Na luz intestinal, as formas amastigotas, que foram ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas e móveis, as promastigotas, que são infectantes, com 15-20 µm de comprimento. Posteriormente serão inoculadas na pele do mamífero durante a alimentação do vetor (GONTIJO; CARVALHO, 2003; PACE, 2012).

No novo mundo a leishmaniose cutânea é causada por várias espécies, dentre elas: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*V.*) *peruviana*, *Leishmania* (*V.*) *guyanensis*, *Leishmania* (*V.*) *panamensis*, *Leishmania* (*V.*) *shawii*, *Leishmania* (*V.*) *lainsoni*, *Leishmania* (*V.*) *naiffi*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*L.*) *mexicana*, e *Leishmania* (*L.*) *venezuelensis*, já a forma visceral é causada somente pela espécie *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (BRASIL, 2010; WHO, 2010; TRUPPEL et al., 2014).

No Brasil, já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *guyanensis* e *L.* (*L.*) *amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L.* (*V.*) *lainsoni*, *L.* (*V.*) *naiffi*, *L.* (*V.*) *lindenberg* e *L.* (*V.*) *shawii* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017).

Infecção por *L.* (*L.*) *amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD). A doença ocorre em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal, Região nordeste (Bahia), sudeste (Minas Gerais e São Paulo), centro-oeste (Goiás) e sul (Paraná). Este parasito já foi isolado de roedores silvestres dos gêneros *Proechymis* e *Oryzomys*. Os vetores são *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. olmeca nociva*. Esta espécie do parasito é pouco descrita

no ser humano, acreditando-se ser devido a pouca atividade antropofílica do vetor (BRASIL, 2017).

Infecção por *L. (V.) guyanensis* causa na grande maioria das vezes lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas (Devido a várias picadas por vários flebotomos infectados ou por metástase linfática secundária), sendo raro o comprometimento mucoso. Acometendo principalmente homens jovens e adultos devido ao caráter ocupacional desta forma (trabalhadores da agricultura, construção de estradas, exercícios militares), entretanto em áreas endêmicas é comum um percentual alto de crianças acometidas. Doença limitada a Região Norte do país. Este parasito já foi isolado de mamíferos silvestres tais como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), roedores (*Prochimys*) e o gambá (*Didelphis albiventris*). Seus principais vetores são *L. umbralitis* e *L. anduzei* (BRASIL, 2017).

Infecção por *L. (V.) braziliensis* é considerada a mais importante em toda a América Latina. Provoca lesões ulceradas, únicas ou múltiplas, que tem como complicação a metástase por via hematogênica para as mucosas nasofaríngeas, com destruição destes tecidos (forma mucosa). O parasito já foi isolado de roedores silvestres (*Bolomys lasirius*, *Nectomys squamipes*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*), felídeos (*Felis catus*), marmosa (*Gracilinanus agilis*), canídeos (*Canis familiaris*) e equídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*), entretanto evidências indicam somente os roedores silvestres como prováveis reservatórios primários desta espécie de parasito. As espécies de vetores associadas a este ciclo são *L. whitmani*, *L. complexa*, *L. wellcomei*, *L. intermedia*, *L. migonei*, *L. neivai* (Brasil, 2017).

Infecção por *L.(V.) shawi* está restrita ao Pará e Maranhão. Já foi isolada de vísceras e pele de mamíferos silvestres como macacos (*Chiropotes satanas* e *Cebus apela*), quati (*Nasua nasua*) e preguiça (*Choloepus didactylus*). Ciclo de ambiente arbóreo, mas infecta o homem no solo. Somente *L. whitmani* foi implicada a esta espécie de parasito (BRASIL, 2017).

Infecção por *L. (V.) lainsoni* foi identificada nos estados do Pará, Rondônia e do Acre, tendo sido isolada de *L. ubiquitalis*, flebotomíneo de baixa antropofilia, o que provavelmente explica os poucos casos em humanos. Este parasito foi isolado de vísceras e pele do roedor silvestre paca (*Agouti paca*), sendo o provável reservatório (BRASIL, 2017).

Infecção por *L. (V.) naiffi* ocorre no Pará e Amazonas. Os flebotomíneos envolvidos na transmissão são *L. Ayrozai*, *L. paraenses* e *L. squamiventris*. Foi isolado do tatu (*Dasyopus novemcinctus*) (BRASIL, 2017).

Infecção por *L. (V.) lindenberg* foi descrita em soldados em treinamento no Pará. Não há relatos em animais ou flebotomíneos, mas a espécie vetora implicada como a provável é *L. antunesi* (BRASIL, 2017).

A forma mais grave da doença, sistêmica e visceral, que se manifesta cronicamente pelo fígado e baço, podendo levar a morte se não for tratada, é causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* (LYNN et al., 2008). Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção (MENON et al., 2016), uma vez que a ocorrência e prevalência têm precedido e sido maior nesta espécie quando comparadas aos casos humanos. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, as duas espécies de vetores relacionadas com a transmissão da doença são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo a primeira espécie considerada a principal na transmissão de *L. (L.) infantum* (BRASIL, 2006). O parasito se multiplica no vetor por um período entre 8 e 20 dias e, no ser humano tem um período de incubação de 2 a 6 meses (MENON et al., 2016).

2.3 Biologia do Vetor

O vetor, flebótomo, pertence à subfamília Phlebotominae e aos gêneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Plebotomus* (no Velho Mundo) (SOUSA et al., 2015). Existem mais de 800 espécies de flebotomíneos reconhecidas no mundo (PACE, 2014), sendo que, aproximadamente 464 espécies são encontradas no Novo Mundo e 375 no Velho Mundo (AKHOUNDI et al., 2016). No Brasil, já foram descritas e registradas 267 espécies e 19 são apontadas como vetores de importância médico-veterinária (FERREIRA et al., 2014). No DF foram encontradas as espécies *L. flaviscutella*, *L. whitmanii* e *L. intermedia* (CARVALHO et al., 2010, FERREIRA et al., 2014).

Os vetores, conhecidos vulgarmente por mosquito palha, cangalhinha, birigui ou asa dura (BRASIL, 2006; SILVA, 2014), são dípteros muito pequenos, de 1 a 3 mm de comprimento, com corpo revestido por pelos de coloração castanho claro ou palha (BRASIL, 2006), que possuem pouca capacidade de voo (até 200 metros do abrigo, escondendo-se em cantos escuros durante o dia e saindo à noite para se alimentar) (SILVA, 2014) e tem habilidade limitada para se deslocar verticalmente, de no máximo um metro, tornando improvável que indivíduos que estejam dormindo a uma distância alta do chão sejam picados e, ainda, possuem como característica que os diferem de outras espécies, a posição das asas e o ângulo que fazem com o abdômen (PACE, 2014). Na fase adulta são encontrados em diversos ambientes, e normalmente abrigam-se em locais protegidos das mudanças que ocorrem no meio ambiente (AGUIAR, MEDEIROS, 2003) e as fêmeas necessitam de sangue para que ocorra a maturação dos ovos (BRASIL, 2006); entretanto, as fases imaturas têm o hábito terrestre e se desenvolvem em ambientes ricos em matéria orgânica e úmidos, de baixa luminosidade (BRASIL, 2006).

O ciclo biológico ocorre no ambiente terrestre e possui quatro fases: ovo, quatro estádios larvais, pupa e adultos. As fêmeas depositam os ovos no solo rico em matéria orgânica, após o repasto sanguíneo. A duração de cada estágio varia de acordo com as espécies, condições climáticas e tipo de alimento disponível: o ovo eclode entre 7 e 10 dias após a postura, as larvas se desenvolvem em seus quatro estádios em média de 15 a 70 dias. As larvas em seu último estágio passam a pupas, que permanecem imóveis e fixadas pela extremidade posterior e esta fase dura em média duas semanas. Os adultos apresentam longevidade média de 20 dias, variando entre 15 e 30 dias. O desenvolvimento de ovo a adulto dura de 30 a 90 dias e irá depender das condições ambientais (FORATTINI, 1973; BRASIL, 2006).

2.4 A Doença no Brasil e no Mundo

Doença considerada infecto-parasitária, endêmica, crônica e de difícil controle (SAMPAIO et al., 1999), afetando diferentes populações e acometendo o homem de forma acidental (NEGRÃO, 2014). Seu período de incubação vai de duas semanas a vários meses (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A leishmaniose está concentrada em países subdesenvolvidos: 90% de todos os casos descritos ocorrem em seis países do Velho Mundo (Afeganistão, Algéria, Arábia Saudita, Iran, Sudão e Síria) e dois do Novo Mundo (Brasil e Peru) (MITROPOULOS et al., 2010; STEBUT, 2015; WHO, 2016). A doença é de difícil diagnóstico e tratamento, principalmente em áreas não endêmicas, onde o médico é pouco familiarizado com os sinais clínicos, além de apresentar sintomas cutâneos e em órgãos internos semelhantes a diversas outras síndromes (BORGHI et al., 2016).

Os viajantes oriundos de áreas não endêmicas e que estão indo para áreas endêmicas deveriam receber informações sobre a leishmaniose e como fazer a prevenção, pois são essas pessoas as principais responsáveis pelo aumento de casos

nesses países, devido à grande facilidade de mobilidade (GOTO, 2012; MITROPOULOS et al., 2010; MANSUETO et al., 2014; PACE, 2014).

A leishmaniose visceral humana (LVH) teve seu primeiro caso descrito nas Américas em 1913, por um médico paraguaio, de um paciente proveniente de Corumbá, Mato Grosso do Sul, no Brasil (CONTI et al., 2016). É considerada endêmica em 70 países e tem *L. infantum* como principal agente no Brasil, sendo seu principal vetor a espécie *L. longipalpis*. A incidência de LVH na América Latina é desconhecida, pois a maioria dos países não possui um sistema de vigilância eficaz, resultando em uma substancial subnotificação. O Brasil alberga 90% dos casos de LV no continente americano e, registrou 70 mil casos de LVH entre 1980 e 2008, resultando na morte de mais de 3800 pessoas (MENON et al., 2016). O número de casos de LV é alto, com mais de 90% ocorrendo na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil e, cuja mortalidade está estimada em 10 a 20% especialmente em áreas pobres (ALVAR et al., 2012; PACE, 2014; SAVOIA, 2015).

Segundo o índice DALY (Disability-Adjusted Life Years), desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que avalia a relevância de cada doença, são perdidos dois milhões de anos de vida devido às leishmanioses. Esse índice reflete o tempo perdido de vida devido à doença debilitante ou devido à morte prematura (FARIA et al., 2012).

O aumento das notificações da doença ao longo dos anos se deve a melhora nos métodos de diagnóstico, ao inadequado controle do vetor e dos reservatórios, ao aumento de infecções concomitantes com doenças imunossupressoras, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), e ao aumento de resistência às drogas anti-leishmaniais; mesmo assim, o diagnóstico continua subestimado devido, principalmente, aos casos de infecções assintomáticas (REITHINGER, 2007), e ao difícil diagnóstico em decorrência das variáveis formas de manifestações clínicas e das diferentes espécies do parasito envolvidas na leishmaniose cutânea (POURMOHAMMADI et al., 2010).

A LT tem ampla distribuição mundial e, no continente americano há registros de casos desde o extremo sul dos EUA até o norte da Argentina, exceto Chile e Uruguai. Na década de 80 foi confirmada em 19 Unidades Federativas (UF) do país e em 2003 foi confirmado ser autóctone em todos os Estados e no DF (BRASIL, 2010). Para a OMS, a LT é classificada como sendo doença emergente e descontrolada, ocorrendo principalmente no litoral do mediterrâneo, nas Américas, oeste da Ásia, sendo que mais de 75% destas ocorrências acontecem no Brasil, Síria e Afeganistão (PACE, 2014; SAVOIA, 2015). É uma afecção dermatológica que merece grande atenção devido ao risco de ocorrência de deformidades no ser humano, provocando alterações psicológicas, com reflexos socioeconômicos, sendo na maioria dos casos de caráter ocupacional (BRASIL, 2010; NEGRÃO, 2014). Tem padrões diversos, com características clínicas e imunopatológicas distintas, que irão depender de vários fatores, como os inerentes ao parasito, a espécie de *Leishmania* envolvida, a resposta imunológica do hospedeiro, que poderá aumentar ou diminuir seu poder patogênico (COSTA et al., 2009; GOTO, 2012; PACE, 2014) e fatores genéticos do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2003). As lesões podem se resolver espontaneamente ou evoluir para uma forma ulcerada ou mesmo apresentar um aspecto crônico (GOTO, 2012).

Recentemente, poucas drogas surgiram para o tratamento da leishmaniose e, nenhuma das drogas disponíveis pode ser considerada ideal, devido à alta toxicidade, à longa duração do tratamento e severas reações adversas, que frequentemente levam ao abandono do tratamento; e, além disso, as drogas mais comumente usadas não eliminam completamente o parasito de todos os indivíduos infectados (MENEZES et al., 2015).

2.5 Epidemiologia

A definição de reservatório mudou significativamente a partir do século passado, hoje é necessário um estudo da zoonose a partir de uma maior perspectiva, sendo a leishmaniose um exemplo importante, uma vez que possui diversos hospedeiros e é mantida por várias espécies de mamíferos na natureza. Logo é necessário tornar clara todas as ligações na sua rede de transmissão, incluindo os hospedeiros mamíferos, não humanos, para que sejam desenvolvidas eficientes estratégias de controle. Muitos estudos são realizados relacionando dezenas de espécies infectadas, entretanto uma minoria relacionou seus achados ao cenário ecológico indicando um possível papel desses hospedeiros na manutenção e transmissão do parasito, a real importância epidemiológica, que continua sendo um complexo “enigma” enzoótico (ROQUE; JANSEN, 2014).

Surtos em humanos estão ligados à atividade extrativista, desmatamentos, construções de rodovias, exploração petroleira e em explorações científicas. Animais domésticos, como cães e equídeos provavelmente desempenham papel na transmissão de *L. braziliensis*, pois estão próximos aos humanos e participam da agricultura e em áreas de pastoreio que foram originadas do desmatamento (TRUPPEL, 2014). É sabido que o cão doméstico é o principal reservatório da leishmaniose visceral (RODRIGUES et al., 2015) e incansáveis estudos para identificar hospedeiros vertebrados para as diferentes espécies de *Leishmania* sp. que causam a forma cutânea da doença não param de ser realizados (QUARESMA et al., 2011). Outras espécies já foram descritas sendo parasitadas por *Leishmaniasp.*, como bovinos (LOBSINGER et al., 2010) e felinos (SILVA et al., 2008).

No Brasil, a LV tinha características predominantemente rurais, mas atualmente vem invadindo as áreas urbanas e é também denominada de calazar, barriga d'água, dentre outras. A doença é mais frequente em crianças, com menos de dez anos, devido à imaturidade imunológica celular agravada pela desnutrição (comum em áreas endêmicas) e, o sexo masculino é o mais acometido. A principal forma de transmissão é a vetorial, mas, outras formas de infecção menos relevantes são as agulhas compartilhadas por usuários de drogas intravenosas, após transplante de órgãos e transfusões sanguíneas, via transmissão congênita (WHO, 2010; MANSUETO et al., 2014; LARSON et al., 2016).

Na Europa, a LV tem aumentado em decorrência do crescente número de indivíduos imunossuprimidos, como na infecção secundária devido ao vírus HIV, que aumentou em 500% a incidência da doença em áreas endêmicas (MITROPOULOS et al., 2010), em transplantados e nos tratamentos por quimioterápicos (GRAMICCIA, 2005; PACE, 2014). Um estudo realizado em um hospital do DF avaliou a relação entre HIV e LV, onde participaram 163 pacientes soropositivos e, destes, 26 (=16%) apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* (CARRANZA-TAMAYO et al., 2009), o que comprova esta realidade também no Brasil.

No Brasil a LTA apresenta três padrões epidemiológicos: silvestre, que ocorre em áreas de vegetação primária, zoonose de animais silvestres, mas que acomete seres humanos quando este invade o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo a doença; ocupacional e de lazer, ligado diretamente ao desmatamento para construção de estradas, usinas hidrelétricas, povoamento, atividades agropecuárias, treinamentos militares e ecoturismo e; rural e periurbana em áreas de colonização, diretamente relacionado a migração, ocupação de encostas e aglomerações em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais (CASTRO, 2005; BRASIL, 2010). A LTA é fortemente associada a fatores ambientais, e parasito e vetor estão se adaptando a nova condição ambiental, induzida pelo homem nas áreas rural e urbana e isto os está

introduzindo dentro do ciclo doméstico, aumentando a incidência de humanos e animais domésticos infectados por *L. braziliensis* devido principalmente ao desmatamento e urbanização. Com isso o ciclo que era sabidamente silvestre está se tornando peridomiciliar (REITHINGER, 2007, TRUPPEL, 2014). Estudos mostraram o polimorfismo genético em diferentes espécies de *Leishmania*, o que pode explicar a plasticidade do parasito e suas habilidades em se adaptar a novas condições ecológicas (TRUPPEL, 2014).

A doença vem sido descrita em diversas espécies de hospedeiros, entretanto equídeos vem cada vez mais ganhando destaque em estudos referentes ao seu envolvimento na manutenção do parasito no meio ambiente. O primeiro relato ocorreu na Argentina, em 1927, por Mazza, que descreveu formas amastigotas na região periocular esquerda de um cavalo (YOSHIDA et al., 1990; RAMOS-VARA, 1996).

2.6 A Leishmaniose e os Equídeos

Em relação à ocorrência no Brasil a LTA em equídeos tem sido descrita desde a década de 50. Há relatos nos Estados do Ceará (ALENCAR, 1959), da Bahia (VEXENAT et al., 1986; FOLLADOR et al., 1999), do Rio de Janeiro (AGUILAR et al., 1986; AGUILAR et al., 1987; BARBOSA-SANTOS et al., 1994; OLIVEIRA-NETO et al., 1988, DUARTE et al., 2000), do Espírito Santo (FALQUETO et al., 1987), de Minas Gerais (SOARES et al., 2013), de São Paulo (YOSHIDA et al., 1988; YOSHIDA et al., 1990, BEVENGA, 2013), de Pernambuco (BRANDÃO-FILHO; SHAW, 2006) e do Paraná (VEDOVELLO et al., 2008). Mas ainda não está esclarecida a importância desta espécie na manutenção do ciclo evolutivo deste parasito no meio ambiente, diferente do que ocorre na Venezuela, que já considera a espécie como um reservatório para *L. braziliensis* (PONS; LONDRES, 1968; AGUILAR et al., 1984; BARBOSA-SANTOS et al., 1994; MORALES et al., 2010). Na América do Norte a doença também foi descrita em equídeos (RAMOS-VARA, et al., 1996; REUSS et al., 2012).

Em 1994, houve um inquérito soropidemiológico em equídeos, em Canoa, município de Santo Amaro, Bahia, Brasil. Foram examinados 77 animais e, nenhum equídeo apresentou lesão cutânea sugestiva de leishmaniose, entretanto, o teste sorológico foi reagente em 17 (22%) animais (FOLLADOR et al., 1999). Para os autores, essa sororreação positiva neste inquérito sorológico demonstrou uma participação desses animais no ciclo da doença no local, embora o real papel dessa participação necessitasse de estudos mais detalhados. Para eles os documentos já publicados com a referida espécie sugerem a participação da mesma na domicialização e urbanização da LTA.

Na Europa, equídeos já foram descritos manifestando a forma cutânea causada por *L. infantum* Espanha (SOLANO-GALLEGO et al., 2003; FERNÁNDEZ-BELLON, 2006), em Portugal (ROLÃO et al., 2005; LOPES et al., 2013; GAMA, 2014) e na Alemanha (KOEHLER et al., 2002; MÜLLER et al., 2009). Esses relatos sugerem que equídeos possam estar envolvidos na manutenção do agente da LV também nas Américas, como foi descrito por Cerqueira (2001) ao detectar testes sorológicos positivos de equídeos pelo teste rápido para *L. donovani*, que detecta anticorpos anti-*L. donovani* (TRALd)(40%), pela técnica ELISA (19,32%) e pelo Dot-blot (13,7%), no Estado da Bahia.

Cerqueira et al., (2003) detectaram formas amastigotas do parasito no fígado de dois asininos um ano após a infecção experimental por *L. infantum*. Em Bauru, São Paulo, região endêmica para LV e LTA, Villalobos et al., (2010), encontraram 40 cavalos reagentes, num total de 100 animais testados pela técnica RIFI. Baum et al.,

(2014) realizaram detecção molecular das fontes de alimento para dípteros da família Psychodidae em áreas de transmissão da LTA, no Estado do Paraná, e encontraram esses mosquitos se alimentando de equinos (*Equus caballus*), suínos (*Sus scrofa*) e caninos (*Canis lupus*). Duarte et al., (2000) detectaram 11,6% de equinos reagentes (29/250) na técnica de ELISA, na zona oeste do Rio de Janeiro.

Em todos os relatos feitos em equídeos, apesar de não haver um padrão clínico para as lesões, a manifestação clínica sempre é cutânea, benigna, e, em sua maioria, de cura espontânea, com alguns relatos de tratamento quimioterápico com regressão das lesões (BARBOSA-SANTOS et al., 1994, RAMOS-VARA, 1996) sendo descritos nódulos e pápulas, solitários ou múltiplos (VEXENAT et al., 1986; FALQUETO et al., 1987; BARBOSA-SANTOS et al., 1994; VEDOVELLO et al., 2008; SOARES, 2013) até lesões ulceradas, proliferativas ou crostosas (BARBOSA-SANTOS et al., 1994; AGUILAR et al., 1986; AGUILAR et al., 1987; YOSHIDA et al., 1988; VEDOVELLO et al., 2008). Este fato requer uma atenção e cuidado por parte dos clínicos veterinários, na importância de incluir a leishmaniose em diagnóstico diferencial para as afecções dermatológicas em equídeos (RAMOS-VARA, 1996; SOARES et al., 2013).

As leishmanioses possuem diversos hospedeiros mamíferos, mas a importância deles na natureza irá depender da sua capacidade de transmissibilidade. O hospedeiro é considerado reservatório quando é capaz de manter o parasito na natureza, mas este mesmo hospedeiro pode ser amplificador da doença, e isso ocorre quando além da manutenção ele é capaz de facilitar a transmissão da doença. Além disso, um hospedeiro pode se tornar amplificador, dependendo do seu estado sanitário (imunossupressão e infecções concomitantes) (ROQUE; JANSEN, 2014).

Os estudos realizados com equídeos ainda não determinaram seu papel neste ecossistema, o que se sabe é que esses animais são acometidos pela doença, entretanto não foi deixado de forma clara se eles podem ser bons reservatórios do parasito, ou mesmo se podem atuar como hospedeiros amplificadores. Nesse sentido, o acompanhamento de animais naturalmente infectados e estudos experimentais utilizando potenciais reservatórios são essenciais para melhorar a compreensão dos mecanismos de manutenção desses parasitos (ROQUE; JANSEN, 2014).

2.70 Distrito Federal

O Distrito Federal está localizado no Planalto Central, na Região Centro-Oeste do Brasil. Está totalmente contido dentro do Estado de Goiás, exceto por estreita faixa no Sudeste onde faz fronteira com o estado de Minas Gerais (SAMPALHO et al., 1999). Sua capital é Brasília, sendo esta também a capital do Brasil (SENRA, 2010; <http://www.brasilia.df.gov.br>). Não possui cidades ou bairros, sendo composta por 31 Regiões Administrativas, sendo elas: RA-I (Plano Piloto), RA-II (Gama), RA-III (Taguatinga), RA-IV (Brazlândia), RA-V (Sobradinho), RA-VI (Planaltina), RA-VII (Paranoá), RA-VIII (Núcleo Bandeirante), RA-IX (Ceilândia), RA-X (Guará), RA-XI (Cruzeiro), RA-XII (Samambaia), RA-XIII (Santa Maria), RA-XIV (São Sebastião), RA-XV (Recanto das Emas), RA-XVI (Lago Sul), RA-XVII (Riacho Fundo), RA-XVIII (Lago Norte), RA-XIX (Candangolândia), RA-XX (Águas Claras), RA-XXI (Riacho Fundo II), RA-XXII (Sudoeste/Octogonal), RA-XXIII (Varjão), RA-XXIV (Park Way), RA-XXV (SCIA), RA-XXVI (Sobradinho II), RA-XXVII (Jardim Botânico), RA-XXVIII (Itapoã), RA-XXIX (SIA), RA-XXX (Vicente Pires), RA-XXXI (Fercal).

Brasília foi fundada em 21 de Abril de 1960 e está situada a 15°47' de latitude sul e 47°56' de longitude oeste, e ocupando uma área de 5.779,999Km² e sua população é de 2.977.216 habitantes (IBGE, 2016) e, já é a quarta cidade mais populosa do país,

com 444,66 habitantes/m². Seu relevo é predominantemente plano, possuindo o ponto mais alto a 1.341m denominado Pico do Roncador, na serra de Sobradinho (<http://www.brasilia.df.gov.br>).

A vegetação do Distrito Federal (DF) consiste na totalidade de Cerrado, possuindo o segundo maior bioma da América do Sul e, abriga a nascente das três maiores bacias sul-americanas. Possui a savana mais rica do mundo com 11.627 espécies de plantas, sendo esta flora totalmente adaptada ao clima seco, com pouca água e baixo nível de nutrientes, sendo suas árvores de galhos tortuosos, com cascas e folhas grossas. Sua fauna possui grande diversidade, com 199 espécies de mamíferos, 837 de aves, 1.200 de peixes, 180 de répteis e 150 anfíbios (<http://www.brasilia.df.gov.br>).

O DF possui clima tropical, com temperatura média de 22°C, variando de 13°C a 28°C. Possui um período chuvoso que vai de Novembro a início de Maio, onde a Umidade Relativa fica em torno de 70%. O período de seca dura em torno de cinco meses (<http://www.brasilia.df.gov.br>).

2.8 Leishmaniose e o Distrito Federal

As leishmanioses são endêmicas no Distrito Federal (DF), onde casos humanos e caninos têm sido observados nos últimos anos (SAMPAIO et al., 2009; CARRANZA-TAMAYO et al., 2010; FERREIRA et al., 2014). O primeiro caso autóctone de LTA foi descrito em 1980, em uma criança de dois anos de idade que nunca tinha saído do Território (SAMPAIO et al., 2009). Considerando somente os casos autóctones, entre 2007 e 2016, 29 casos humanos de LV e 49 de LT foram registrados no DF (SES/DF 2016).

O DF vem sofrendo com crescimento desordenado de suas áreas urbanas desde 1985, onde tem ocorrido o aumento de parcelamentos informais e invasões com características urbanas, que no período de 1995 a 2005 foi de 54,5% e tem levado a um processo constante de degradação ambiental e social. O intenso fluxo migratório e o crescimento da agricultura levaram à redução de 47% das formações florestais (matas ciliares, mesofíticas, de galeria, de encosta e cerradão), 74% de cerrado e 75% de campo (CARVALHO et al., 2010). Com isso, a leishmaniose no DF está relacionada a construções de residências próximas às áreas de mata, que está levando ao desaparecimento do cerrado, diminuindo a biodiversidade local e suprimindo os recursos naturais. Esses fatores podem estar contribuindo para a mudança nos hábitos dos flebotomíneos e dos animais silvestres, desenvolvendo uma nova realidade ambiental (OLIVEIRA et al., 2003; CARVALHO et al., 2010).

Poucos estudos sobre flebotomíneos foram desenvolvidos no DF. Não existe nenhuma publicação referente às espécies de vertebrados que atuam como fonte de alimentação para flebotomos no DF, para que se entenda melhor a biologia deste inseto, e como consequência, seus potenciais reservatórios (FERREIRA et al., 2014). Espécies reconhecidamente vetoras de *Leishmaniaspp.* já foram capturadas no DF, como *L. longipalpis*, *N. whitmani* e *L. flaviscutellata*, sendo a segunda mais frequente em ambiente domiciliar, com ampla distribuição no DF (CARVALHO et al., 2010, FERREIRA et al., 2014).

O estudo realizado pela Diretoria de Vigilância Ambiental registrou quinze espécies do artrópode, sendo a espécie *L. longipalpis* capturada pela primeira vez no DF (CARVALHO et al., 2010). São reconhecidas 27 espécies de flebotomíneos (CARVALHO et al., 2010; FERREIRA et al., 2014), porém a ecologia de algumas espécies e sua importância vetorial para a manutenção do ciclo silvestre de *Leishmaniasp.* ainda é pouco conhecida no DF (FERREIRA et al., 2014). Em um período posterior, as espécies de importância médica *L. whitmani*, *L. intermedia*, *L.*

neivai, *L. davisi*, *L. flaviscutellata* e *L. longipalpis* foram encontradas na mata, em abrigos de animais e dentro de domicílios (CARVALHO et al., 2010), sendo a espécie *L. whitmani* a mais frequente (75,9%), seguida de *L. longipalpis* (8,76%). A identificação de outras duas espécies vetoras, *L. neivai* e *L. davisi*, auxiliou no mapeamento das áreas de risco à transmissão de *Leishmaniasp.*

Ferreira et al., (2014) também realizaram a captura de flebotomos abrangendo ambas estações de chuva e seca. Foram coletados 250 exemplares do artrópode, entretanto nenhum na época das chuvas, levando a conclusão que a ocorrência do flebotomíneo é maior na época da seca, no nível do solo e em áreas preservadas nas matas de galeria. Nesta captura foram registradas pela primeira vez no DF as espécies *Psathyromyia runoides*, *Pintomyia kuschelie* e *Micropygomyia quinquefer*.

Outro estudo foi realizado para atualizar a distribuição das espécies de flebotomíneos na região Centro oeste do Brasil e, foi observado que metade de todas as espécies conhecidas no Brasil foi encontrada nesta região. O artigo trata de estudo das espécies de flebotomíneos entre os anos de 1962 e 2014. Foram coletados no total 2803 flebotomíneos, sendo identificadas 127 espécies. *N. whitmani*, *Evandromyia lenti* e *L. longipalpis* foram as espécies com o maior número de registros e estavam presentes em todos os biomas do centro oeste indicando que áreas de cerrado nas regiões central e oeste do Centro Oeste do Brasil são climaticamente mais propícias aos flebotomíneos. Os resultados mostraram que as espécies do artrópode têm padrões diferentes de distribuição nesta região e em áreas próximas, onde as condições climáticas são favoráveis à ocorrência de pelo menos uma destas espécies. Os padrões de distribuição mostraram que flebotomíneos são mais frequentes em áreas de cerrado, que possuem uma temperatura sazonal durante todo o ano, tendo a temperatura nos meses mais frios uma influência na distribuição destas espécies de artrópodes, destacando a necessidade de manter ou intensificar o controle do vetor e estratégias de vigilância (ALMEIDA et al., 2015).

Casos de leishmaniose canina foram diagnosticados por meio de testes sorológicos nas seguintes regiões: Águas Claras, Brasília, Brazlândia, Candangolândia, Ceilândia, Estrutural, Fercal, Paranoá, Park Way, Guará, Guará II, Itapoã, Jardim Botânico, Lago Norte, Lago Sul, Núcleo Bandeirante, Planaltina, Recanto das Emas, Riacho Fundo I, Riacho Fundo II, Samambaia, Santa Maria, São Sebastião, SIA, Sobradinho, Sobradinho II, Taguatinga, Varjão. Dentre estas regiões as que apresentam maiores incidências de leishmaniose canina no ano de 2013 foram Fercal, Lago Norte, Jardim Botânico e Sobradinho (HERENIO et al., 2014; SOUSA et al., 2015). Em Brasília os casos de leishmaniose canina ocorrem também em áreas onde a população humana possui altas condições socioeconômicas, possuindo acesso a saúde e saneamento, como são exemplos o Lago Norte e o Lago Sul (HERENIO et al., 2014; SOUSA et al., 2015).

Alguns estudos relataram encontrar *Leishmania (Leishmania) hertigi* em Estados da Região Norte do país. A mesma foi isolada no DF em um porco espinho (*Coendou*sp). O animal havia sido encontrado morto em via pública durante um inquérito soro epidemiológico para leishmaniose canina que estava sendo realizado na cidade de Brasília. Foram coletadas amostras de pele íntegra e do baço do animal, para isolamento do parasito em meio de cultura. Este relato evidencia a importância de se investigar a distribuição deste parasito no país bem como de ressaltar a necessidade de estudos para se entender o papel de *L. hertigi* na fisiopatologia da leishmaniose e sua sobrevivência em mamíferos e em possíveis vetores (SILVA et al., 2013).

Nenhum tipo de estudo foi realizado com equídeos no DF, território onde esses animais são muito utilizados no campo e na cidade, como meio de transporte, trabalho e

lazer. Com isso há um grande trânsito e proximidade desses animais com seres humanos e cães e, no caso de animais de tração, além dessa proximidade há ainda o contato íntimo desses animais com lixo e matéria orgânica em decomposição, que atraem todo tipo de inseto e doenças por eles transmitidas. Há uma necessidade de se conhecer a importância dos equídeos de tração na manutenção da leishmaniose em nível endêmico no Estado.

O DF adota medidas de vigilância e controle para leishmaniose, entretanto a doença permanece em áreas urbanas e rurais, carentes e com boas condições socioeconômicas, onde a população tem acesso à saúde e saneamento urbano. Isso vem enfatizar a carência de estudos que determinem medidas mais efetivas para controlar vetores, controlar e conhecer possíveis reservatórios e com isso reduzir a prevalência da doença no Distrito Federal (SOUSA et al., 2015).

2.9 Manifestações Clínicas

Em humanos a forma visceral varia desde ausência de sintomas, a formas subclínicas e ao caso clássico da doença. Na forma clássica o indivíduo pode apresentar febre, anemia, hepatoesplenomegalia, hemorragias, linfadenomegalia, pancitopenia, perda de peso, taquicardia, podendo apresentar com menor frequência tosse seca e diarreia. Com a evolução da doença haverá desnutrição, com edema de membros, queda de cabelo, alterações na pele e unhas. Sem tratamento, o indivíduo entrará num quadro de infecção bacteriana secundária, como pneumonia e septicemia, levando o mesmo ao óbito (BRASIL, 2006; SOARES, 2012; MENON et al., 2016). Em pacientes co-infectados com LV e HIV, características típicas, como a esplenomegalia, podem não ocorrer e, o envolvimento de órgãos como pulmões, os gastrointestinais e rins podem existir (MENON et al., 2016).

No cão a forma visceral se manifesta de forma sistêmica e crônica, mas alguns animais podem apresentar cura clínica espontânea, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro. Entre os sinais clínicos são observados com frequência onicogribose, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras cutâneas, recobertas por crostas, localizadas nas orelhas, bolsa escrotal, focinho e membros (PORFÍRIO-PASSOS et al., 2012; SOUSA et al., 2015; FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016), diarreias sanguinolentas, apatia, anemia, febre, vômitos, edema de membros. Porém cães podem ficar assintomáticos por muito tempo (SILVA et al., 2011; FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016).

Em seres humanos a LTA se manifesta de três formas principais, a leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose muco cutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (SILVEIRA et al., 2004; BRASIL, 2010; SILVA, 2012; SOARES et al., 2013).

Geralmente a LCL é auto limitante e a forma mais comum da doença (DESJEUX, 2004; SILVEIRA et al., 2004; SILVA, 2012, SOARES, 2012), representa a forma mais benigna da infecção e geralmente acomete pacientes imunocompetentes, no entanto, pode evoluir para a forma cutânea disseminada, com lesões múltiplas e debilitantes (DESJEUX, 2004; BRASIL, 2010; SOARES, 2012).

Em infecções por *L. braziliensis* doença se inicia com hiperplasia reativa de nódulo linfático localizada aonde surgirão ulcerações entre uma e doze semanas (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2010; SOARES, 2012). No local da picada do artrópode aparecerá uma pápula indolor, geralmente em áreas descobertas como face e membros, e em seguida, formar-se-ão nódulos que irão ulcerar, podendo variar de milímetros a centímetros de diâmetro. Têm como característica o fundo crostoso e eritematoso, com bordos bem delimitados, elevados e endurecidos (BRASIL, 2010). A

cura pode ser espontânea tendo como seqüela uma cicatriz, entretanto alguns pacientes, cerca de 5%, podem apresentar complicações nas infecções por *L. braziliensis*, através de metástases por via hematogena ou linfática para as mucosas nasofaríngeas levando a forma mucocutânea (SILVEIRA et al., 2004; BRASIL, 2010; MANSUETO et al., 2014).

A LMC é a forma mais grave da LTA, podendo levar ao óbito (BRASIL, 2010). Esta forma da doença se inicia com pústulas edemaciadas na boca e/ou narinas, podendo ulcerar e atingir a mucosa nasofaríngea acarretando aos doentes problemas psicológicos e socioeconômicos devido à grande destruição das cavidades oral e nasal, causando mutilação e deformidade (DESJEUX, 2004; BRASIL, 2010; WHO, 2016). Essa forma ainda pode ter uma aparição tardia, anos após a cicatrização da forma cutânea, geralmente associada a lesões cutâneas múltiplas ou de longa duração, às curas clínicas espontâneas ou ao tratamento insuficiente da LTC (BRASIL, 2010). Essa forma da doença é com frequência tratada de forma errada, como LCL, e por ser uma forma destrutiva, o tratamento é difícil, sendo comum sua recorrência (CARDOSO et al., 2014). Também é conhecida por espúndia, referência dada a extensa destruição da cavidade oro-nasal. A detecção da LMC concomitantemente com lesões cutâneas é rara, ocorrendo em aproximadamente 2,7% dos casos (CARDOSO et al., 2014).

A LCD é crônica e progressiva, semelhante à hanseníase. É caracterizada por lesões difusas não ulceradas por toda a pele, com grande número de nódulos, pápulas, tubérculos e placas infiltradas (SILVEIRA et al., 2004), e de difícil tratamento (CARDOSO et al., 2014). Ocorre devido a uma ausência da resposta imune mediada por células (DESJEUX, 2004; REITHINGER et al., 2007; BRASIL, 2010; CARDOSO et al., 2014), sendo comum em pacientes imunocomprometidos como no caso dos portadores do HIV (HANDLER et al., 2015). No Brasil, está associada exclusivamente à infecção por *L. amazonensis* (SILVEIRA et al., 2004; BRASIL, 2010). Geralmente esta forma da doença está associada à infecção ocorrida na infância, onde ainda existe uma imaturidade do sistema imunológico do hospedeiro (BRASIL, 2010).

A leishmaniose tegumentar canina (LTC) se assemelha a leishmaniose cutânea localizada (LCL) em humanos e, se manifesta através de lesões cutâneas ulceradas, na maioria das vezes recobertas por crostas, podendo ser únicas, múltiplas ou confluentes, com predominância em extremidades, em áreas desprovidas de pelagem (bolsa escrotal, pavilhão auricular) e no focinho com envolvimento da mucosa respiratória. De evolução longa, podendo apresentar comportamento cíclico, onde as lesões cicatrizam e depois reaparecem. Pode ainda cursar com a forma subclínica (BRASIL, 2010; SILVA, 2012).

2.10 Diagnóstico

2.10.1 Levantamento epidemiológico

Nos seres humanos é necessário fazer um levantamento epidemiológico, pois ele irá determinar a forma de atuação em cada região afetada (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SOARES, 2012; HANDLER et al., 2015). É necessário averiguar a existência de LTA na região, se houve viagem para área endêmica, se existem cães e equídeos com lesões nas proximidades, se a pessoa entrou em áreas florestais. Esses dados, no caso de lesões cutâneas, são feitos a partir de um retrospecto de dois meses. Já nas lesões mucosas é necessário saber se houve ulceração de pele de longa duração, se existe cicatriz e se houve tratamento contra leishmaniose (BRASIL, 2000). Infelizmente o parasito somente é identificado 70% das vezes em casos de LC e 50% das vezes em LMC, mesmo quando o médico é familiarizado com a doença (HANDLER et al., 2015).

2.10.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é realizado pela visualização do parasito, através de biopsia, aspiração por agulha ou escarificação da lesão; por provas imunológicas (BRASIL, 2010); por cultura e por testes moleculares (SANCHES et al., 2016). Cultura não é fácil de realizar, entretanto é o melhor método de isolar o parasito e o material é obtido de lesões cutâneas ou aspirado de órgãos (HANDLER et al., 2015). A visualização do parasito por *imprint* ainda é o método mais empregado devido a sua rapidez, baixo custo e facilidade, sendo importante meio de diagnóstico (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SOARES, 2012; HANDLER et al., 2015), além de ter uma alta especificidade, entretanto sua sensibilidade é variável (REITHINGER et al., 2007; SOARES, 2012).

A inoculação em animais de laboratório tem como animal de escolha o Hamster (*Mesocricetus auratus*), preferencialmente nas extremidades dos membros posteriores e, devido a sua reação tardia, em torno de um mês, seu alto custo e comprometimento ético no uso de animais em pesquisa clínica é uma técnica reservada à pesquisa, apesar de apresentar alta sensibilidade (BRASIL, 2010; SILVA, 2012; SOARES, 2012).

Testes moleculares são usados com grande frequência em pesquisa científica devido a suas altas sensibilidade e especificidade (BRANDÃO-FILHO; SHAW, 2006), entretanto devido ao seu alto custo e necessidade técnico capacitado para execução não é usado em diagnóstico.

2.10.3 Diagnóstico sorológico

Diagnóstico sorológico para *Leishmania* é baseado numa investigação da infecção em um único indivíduo ou em uma população. E consiste na detecção, quantificação e caracterização dos anticorpos anti-*Leishmania* que estão circulantes no plasma/soro sanguíneo. Os testes sorológicos podem ser qualitativos ou quantitativos, de fácil execução, rápidos, de baixo custo operacional e podem ser automatizados e, são amplamente utilizados no auxílio diagnóstico de suspeitas clínicas de infecções (TEVA et al., 2009; SILVA, 2012). Vários são os testes sorológicos utilizados para o diagnóstico de LV, incluindo RIFI, ELISA, dot-ELISA, Teste de Aglutinação Direta, Western-blotting e teste imunocromatográfico (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016).

Os testes sorológicos são pouco utilizados para diagnóstico de LTA em seres humanos, devido a baixa produção de anticorpos, sendo necessária a associação de diferentes métodos para aumentar a positividade do diagnóstico. O teste intradérmico de Montenegro tem apresentado dificuldades em sua execução, devido as diferentes espécies do agente e as diferentes formas de preparação do antígeno, além da capacidade que este teste tem em induzir reações de hipersensibilidade tardia, quando realizado uma segunda vez. A RIFI é o teste mais empregado como teste confirmatório em seres humanos, mas apresenta problemas de reações cruzadas com outras enfermidades, em especial, com a doença de chagas. Para obter resultados mais específicos, em testes considerados sensíveis, como o ELISA, deve-se utilizar diferentes antígenos (ARRAES et al., 2008). Entretanto, em áreas onde biópsia e histopatologia são inviáveis de execução, os testes sorológicos tornam-se vantajosos como métodos de diagnóstico, devido à simplicidade das técnicas e o baixo custo (BARROSO-FREITAS et al., 2009).

Se um hospedeiro é positivo em testes sorológicos e negativo em testes parasitológicos é indicativo que ele foi exposto à infecção por *Leishmania*, mas não necessariamente será um reservatório do parasito (ROQUE; JANSEN, 2014).

É importante também realizar um diagnóstico diferencial para leishmaniose tegumentar com outras doenças como infecções por bactérias, neoplasias, hanseníase, lúpus eritematoso, trauma, sífilis terciária, sarcoidose, dentre outras (REITHINGER et al., 2007, BRASIL, 2010, HANDLER et al., 2015).

2.10.3.1 Intradermorreação de Montenegro (IDRM)

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um teste imunológico, baseado na resposta imune celular, semelhante ao teste de tuberculização (HANDLER et al., 2015), onde ocorre uma reação de hipersensibilidade tardia, apresentando um resultado onde a leitura ocorre em 48 a 72 horas e é de fácil execução. É ainda o principal teste utilizado em áreas endêmicas para LT, sendo comum, nessas áreas, resultados positivos em pacientes com infecção subclínica e mesmo em pessoas sem histórico de leishmaniose (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2010; SOARES, 2012; HANDLER et al., 2015). Geralmente sua reação permanece positiva após o tratamento, em fase de cicatrização de lesão tratada ou em caso de cura espontânea. Após a cura clínica a IDRM pode permanecer positiva durante vários anos, sendo limitado o seu emprego para o diagnóstico de reativação da doença. E pode apresentar resultado negativo em indivíduos com fraca reação ou naqueles que receberam tratamento precoce; em casos de LV; em casos de LC pós LV e; em casos de LCD (SILVEIRA et al., 2004). A IDRM costuma ser exacerbada em pacientes com LM (BRASIL, 2010; SILVA, 2012; HANDLER et al., 2015).

2.10.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) realiza a pesquisa de anticorpos contra uma série de antígenos de superfície de *Leishmania* sp, e tem sido usada desde a década de 60 (FARIA et al., 2012). Por ser capaz de avaliar os anticorpos produzidos frente ao microrganismo causador de infecção. Os promastigotas de *Leishmania* sp. (antígeno) são imobilizados em lâminas, e os anticorpos específicos ao parasito quando presentes ligam-se aos antígenos e logo após uma anti-imunoglobulina (conjugado ou anticorpo secundário) espécie específica ligada a fluoresceína se liga ao complexo que pode ser visualizado num microscópio de Imunofluorescência, de acordo com a fluorescência que é emitida. A RIFI, de modo geral, apresenta sensibilidade variando de 70% a 90% e especificidade entre 85% e 99% (TEVA et al., 2009). Em lesões ulceradas, onde o agente etiológico é *L. braziliensis*, segundo o MS, a sensibilidade da RIFI está por volta de 70% no primeiro ano da doença, mas alguns pacientes são persistentemente negativos (BRASIL, 2010). As lesões mucosas apresentam títulos mais altos e persistentes que as lesões cutâneas (BRASIL, 2010; SILVA, 2012). Devido a esta grande especificidade, esta técnica é mais utilizada como teste confirmatório para LVH. Esta técnica deve ser sempre utilizada associada a outro teste de diagnóstico para triagem, mais sensível, para serem fornecidos dois testes combinatórios (TEVA et al., 2009; SILVA, 2012).

Em seres humanos pode apresentar resultados falso-positivos, reações cruzadas com doenças como a de chagas, a esquistossomose, o pênfigo foliáceo, blastomicose, esporotricose e até mesmo com indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BRASIL, 2010; SOARES, 2012).

A cura clínica sempre terá correlação com os níveis de anticorpos, com isso foi indicado utilizar o resultado da RIFI negativo como critério de cura dos pacientes. Mas se a RIFI permanesse positiva após o tratamento de pacientes com LTA ou mesmo naqueles com cura espontânea, poderia ser indicativo que estes pacientes estariam com risco de desenvolver a forma mucosa da doença ou mesmo uma recidiva das lesões

cutâneas. Alguns pacientes podem apresentar títulos de anticorpos após anos sem lesões aparentes e em áreas endêmicas, algumas pessoas saudáveis podem apresentar títulos de anticorpos para a doença sendo, portanto, questionável o valor clínico desta persistência de anticorpos para sugerir uma possível reativação de LTA. Pode-se afirmar que a RIFI não é indicada como critério de cura ou de recidiva da doença. A presença ou não de lesões cutâneas é que será o critério decisivo (BRASIL, 2010).

Relatos com equino foram feitos por Barbosa-Santos et al. (1994), onde descreveram uma égua com LMC por meio de diagnósticos clínico, direto e sorológico. Realizaram a RIFI como meio de diagnóstico sorológico onde apresentou uma titulação na fase aguda da doença de 1:320 e onze meses após a cura clínica apresentou a titulação de 1:80.

Soares et al., (2013) realizaram a RIFI em dois equinos que apresentaram títulos de 1:40 e 1:80. Utilizaram *cut-off* 1:40, como foi padronizado para humanos e cães. Posteriormente foi confirmada a positividade através do PCR, onde foram encontradas as espécies *L. infantum* e *L. braziliensis*, caracterizando infecção mista.

2.10.3.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foi desenvolvido na década de 70 (FARIA et al., 2012) e se assemelha ao radioimunoensaio quanto à sensibilidade quando apresenta condições ótimas de execução (enzimas altamente ativas, antígenos puros, substratos de alta qualidade, anticorpos e conjugados) e ainda tem a vantagem de não utilizar material radioativo. É considerado um avanço tecnológico para diagnóstico da LV, pois avalia um grande número de amostras em um pequeno intervalo de tempo, em um protocolo de fácil adaptação para ser utilizado em diversos antígenos e possui leitura e resultados automatizados (SOARES, 2012). O ELISA é um teste sensível e específico para detecção de anticorpos em humanos e cães infectados com LV (FARAHMAND; NAHREVANIAN, 2016). A reação é feita em placas de micro diluição, contendo poços, onde são introduzidos os imunorreagentes, antígenos ou anticorpos, de acordo com o objetivo da técnica. É realizada a sensibilização da placa, que se trata de revestir a mesma com o imunorreagente. Esta técnica é empregada para pesquisa de anticorpos em amostras de soros que foram utilizados para reagir com os antígenos imobilizados em uma fase sólida, ou seja, na placa já sensibilizada. Utilizando posteriormente um conjugado enzimático específico e utilizando o substrato para esta enzima haverá a formação de um produto corado após ter agido sobre o substrato cromogênico (TEVA et al, 2009; SILVA, 2012).

Para *L. braziliensis* teste ELISA é recomendado para casos suspeitos de LTA em áreas endêmicas, desde que associado ao RIFI, sendo obtido um teste de maior sensibilidade diagnóstica (BARROSO-FREITAS et al., 2009, SOARES, 2012).

No Brasil, Duarte et al., (2001) realizaram o teste ELISA em 250 equinos, utilizando antígenos particulados de *L. major* "like" cepa JOF para sensibilizar as placas. As amostras foram diluídas a 1:20 e como critério da positividade a absorbância/cut off foi estabelecido com o valor médio acrescido de dois desvios-padrão. Entre as 250 amostras testadas 29 (11,6%) apresentam reatividade no ELISA e 221 (88,4%) apresentaram-se não reatoras.

Cerqueira et al., (2003) inocularam experimentalmente *L. infantum* em asininos e durante o acompanhamento utilizaram o ELISA com antígeno homólogo. Foram realizados dois tipos de ELISA. No primeiro (ELISA I), foi utilizado como antígeno um lisado cru de *Leishmania* (*Leishmania chagasi* lysate) e, no segundo (ELISA II), a proteína rk39, ambos expostos a um conjugado anti-horse. Os resultados apresentados foram de 50% de positividade.

Na Europa, o teste ELISA foi empregado em trabalhos publicados por Koehler et al., (2002), Solano-Galego et al., (2003) e Fernández-Bellón et al., (2006), todas as vezes com cepa *L. infantum*, em casos de leishmaniose equina cutânea causadas por esta espécie do parasito. Nestes trabalhos não houve padronização da metodologia empregada, não havendo homogeneidade nem na concentração do antígeno e nem na diluição realizada (SOARES, 2012).

Para LT, ELISA ainda não é um teste comercial disponível, sendo, portanto recomendado pelo MS somente em pesquisa (BRASIL, 2010). Mas alguns autores o recomendam, devido ao seu bom índice de eficácia (BARROSO-FREITAS et al., 2009; SOARES, 2012). Para LV canina é um teste utilizado como confirmatório para retirada e eutanásia do animal, como método de controle para doença em humanos (BRASIL, 2011).

2.10.3.4. Teste Imunocromatográfico

Outros testes são utilizados, como o imunocromatográfico, que é baseado na reação específica antígeno-anticorpo, constituído por uma fase sólida, onde estão os elementos de captura e, por uma fase móvel onde ficam suspensos os conjugados (proteína A ligada a ouro coloidal ou outro tipo de conjugado) e a molécula alvo da amostra. A fase móvel irá migrar sobre a fase sólida por capilaridade, conduzindo o complexo formado entre a molécula alvo e o conjugado, que ficará retido na linha de captura da fase sólida, formando um complexo colorido e visível ao olho humano. Caso a amostra não contenha a molécula alvo, a reação não será formada. Haverá uma segunda linha de reação (linha controle), formada pela captura do conjugado livre, confirmando a migração da fase móvel (TEVA et al., 2009; SILVA, 2012). É usado como teste de triagem em LV humana e canina.

2.10.3.5. Testes moleculares

Podem ser considerados testes parasitológicos, uma vez que detectam partes constituintes dos parasitas, seus fragmentos de DNA (ROQUE; JANSEN, 2014).

Ainda são pouco utilizados na rotina de diagnóstico, sendo ainda mais restritos às pesquisas. Entretanto aumenta muito a sensibilidade quando utilizados em conjunto com os testes parasitológicos tradicionais. A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é baseada na amplificação de oligonucleotídeos que formam uma sequência conhecida do parasito (FARIA et al., 2012). As técnicas mais empregadas são PCR, por hibridização (minicirclos), PCRRFLP, PCR (G6PhD), PCR Real Time, entre outras. PCR Real Time tem como vantagem em relação às outras a utilização de dados computadorizados, identificando e quantificando a espécie do parasito. Mas tem como desvantagem o alto custo com reagentes e equipamentos, além de realizar uma pequena quantidade de reações, o que o torna inviável em inquéritos caninos, onde são processadas grandes quantidades de amostras (BRASIL, 2010; SILVA 2012).

No caso do diagnóstico das leishmanioses, a PCR apresenta 100% de especificidade e um aumento na sensibilidade de 20-30% em LCL e de 55-70% na LMC, quando comparado aos métodos convencionais (REITHINGER; DUJARDIN, 2007), sendo, portanto mais apropriada (REITHINGER et al., 2007; SOARES, 2012). A PCR vem desenvolvendo novas técnicas de extração de DNA e, muito em breve, deve se tornar a principal técnica de diagnóstico para as diversas espécies causadoras das leishmanioses. Algumas pesquisas revelaram que este teste possui sensibilidade global de 92 a 98%, além de uma especificidade de 100% (POURMOHAMMADI et al., 2010; PORFÍRIO-PASSOS et al., 2012). Os métodos moleculares têm sido amplamente desenvolvidos na última década e apesar de diferentes métodos moleculares

apresentarem bons resultados para o diagnóstico das leishmanioses, a PCR é mais apropriada (REITHINGER et al., 2007). Além de estas técnicas apresentarem um custo elevado e a necessidade de um laboratório com infraestrutura específica e mão de obra especializada não permitindo sua utilização em diagnóstico de campo, muito se tem investido em pesquisa na última década (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; BRASIL, 2010; SOARES, 2012).

Muitas vezes a presença do parasito nas lesões é em pouca quantidade, dificultando sua detecção, levando a uma sensibilidade variável das técnicas convencionais, entretanto, pela biologia molecular haverá uma maior sensibilidade (REITHINGER; DUJARDIN, 2007, SOARES, 2012). Este teste pode ser realizado em diferentes amostras, tais como aspirados de medula, aspirados de linfonodos, sangue e urina e biópsias de pele, tendo como vantagem ser um método menos invasivo (FARIA et al., 2012).

Soares (2012) encontrou 24 animais positivos dos 148 analisados para a PCR genérica, e comparando com as técnicas sorológicas obteve 33,33% (8/24) 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. A concordância foi fraca, no teste de Kappa, quando da comparação da PCR com as duas técnicas sorológicas, juntas ou individualmente.

Soares et al., (2013) avaliaram três animais com lesões, nos testes sorológicos RIFI e ELISA, e no molecular. No RIFI foram considerados positivos na diluição \geq 1:40, como a preconizada para cães e humanos. No teste ELISA as concentrações de soro e conjugado (Anti-horse IgG-Peroxidase/Goat-KPL) foram estabelecidas 1:400 e 1:10.000, respectivamente. O *cut-off* foi estabelecido com o valor médio acrescido de três desvios-padrão de soros negativos. O índice de reatividade (IR) $>$ 1 foi considerado positivo. No exame direto encontraram formas amastigotas de imprint de lesão e/ou de aspirado de medula óssea. No PCR encontraram infecção mista por *Leishmania braziliensis* por *Leishmania infantum*.

2.11.Prevenção e Controle

Apesar de ser uma doença parasitária de grande importância para saúde pública, de âmbito mundial, as leishmanioses estão no grupo das doenças negligenciadas, havendo desinteresse por parte dos órgãos financiadores no investimento de atividades de pesquisa, prevenção e controle (REITHINGER et al., 2007). Além disso, a doença sofre descaso também por parte das políticas públicas, sendo conseqüentemente subestimada pela própria população acometida.

Seria importante a implantação de um sistema de vigilância constante, com monitoramento em áreas setorializadas, de acordo com a maior produção da doença, com as características ambientais, sociais e econômicas, buscando um conhecimento amplo para estabelecer estratégias adequadas e eficazes de acordo com cada padrão de transmissão (BRASIL, 2010).

O Ministério da Saúde brasileiro desenvolveu o Programa de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (PV-LTA) e Leishmaniose Visceral Americana, com a finalidade de diagnosticar e tratar de forma precoce os casos detectados. Esses programas se baseiam em: vigilância epidemiológica que tem como objetivo reduzir as taxas de mortalidade por LV e o grau de morbidade de ambas as formas LV e LTA, através de diagnóstico e tratamento precoces; redução da transmissão através do controle da população de reservatórios (LV) e do vetor (LV e LT); vigilância entomológica, que tem a finalidade de monitorar de forma qualitativa e quantitativa os flebotomíneos transmissores das formas de leishmaniose, bem como conhecer a

sazonalidade desses artrópodes, estabelecendo desta forma o período mais favorável para a transmissão da doença e com isso adotar medidas de prevenção e controle; vigilância no cão (LV), através de alertas a classe veterinária e à população quanto a ocorrência da LVC na região; eutanásia dos cães sororreagentes e /ou com parasitologia positiva (LV); orientações dirigidas às atividades de educação em saúde, como divulgação à população sobre a ocorrência de leishmaniose na região, capacitação das equipes que irão atuar, adoção de medidas preventivas, educação continuada em leishmaniose; desenvolver atividades de educação em leishmaniose junto a comunidade e, estabelecer parcerias integrando instituições. Além de ter como objetivos identificar e monitorar áreas territoriais de importância epidemiológica; investigar e caracterizar surtos, monitorar as formas graves, e identificar os casos autóctones de áreas não endêmicas, bem como os provenientes de áreas domiciliares (BRASIL, 2006, BRASIL 2010, BRASIL 2017). Faz-se a investigação epidemiológica para que sejam adotadas medidas de controle voltadas para cada tipo de contexto epidemiológico (BRASIL, 2010; NEGRÃO et al., 2014).

Do ponto de vista social, a detecção ativa dos casos e o tratamento precoce custam menos do que a detecção passiva porque o atraso no tratamento significa prolongar a morbidade, aumentar a mortalidade e sustentar a transmissão da doença (ALVAR et al., 2006). No entanto, as estratégias de prevenção e controle têm sido voltadas principalmente para o tratamento da doença no homem, e não sendo dada a devida importância na eliminação dos reservatórios ou na redução do contato destes com humanos (REITHINGER et al., 2007).

Quem adoece de leishmaniose adquire imunidade parcial contra o mesmo agente, e a investigação sobre esta imunidade ajudará no desenvolvimento de uma vacina, entretanto todos os estudos feitos a esse respeito falharam até hoje (STEBUT, 2015).

A prevalência e incidência de infecção canina são parâmetros importantes para determinar o risco e as formas de controlar esta zoonose reemergente. Entretanto a estimativa desses parâmetros depende da identificação confiável de cães infectados. O exame parasitológico é um método bem específico, mas pouco sensível. Já os métodos sorológicos são mais sensíveis, porém podem ser menos específicos e a escolha do valor de corte pode não ser óbvia, além da soroprevalência subestimar a verdadeira prevalência da infecção (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2010).

O diagnóstico clínico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é difícil, porque existe uma grande quantidade de animais assintomáticos ou oligossintomáticos, além da doença apresentar uma semelhança com outras enfermidades infectocontagiosas que acometem os cães. A maioria dos animais é proveniente de áreas onde os padrões socioeconômicos são baixos, fatores que vêm associados às dermatoses e desnutrição, que mascaram ou dificultam o diagnóstico clínico da LVC (BRASIL, 2006). Entretanto, em áreas de melhor poder aquisitivo, com a vacinação dos animais, estão aumentando os casos sororreagentes em animais assintomáticos, uma vez que para a realização da vacinação é necessário previamente exame negativo dos cães, com isso um diagnóstico precoce tem sido feito em cães aparentemente saudáveis, provenientes de regiões endêmicas para leishmaniose.

Em regiões endêmicas, no caso de transmissão peri e intra domiciliares são utilizados repelentes contendo N, N-dietil-m-toluamida (DEET) ou N, N-dietil-3-metilbenzamida, que são eficazes na proteção contra picada de insetos, bem como telas protetoras e aconselhável o uso de roupas longas e de cor clara. O MS indica medidas de proteção individual e para o ambiente, na tentativa de evitar a transmissão, dentre as medidas está o uso de repelentes quando ocorrer exposição a ambientes onde possam

existir vetores; evitar exposição em horários de circulação dos flebótomos; uso de telas mosquiteiras de malha fina, bem como telar portas e janelas; manejo do ambiente, através da limpeza dos quintais e terrenos, poda de árvores, que aumentam a exposição solar, diminuindo áreas sombrias (BRASIL, 2010). Viajantes devem dormir em andares altos (STEBUT, 2015) devido à pouca capacidade de voo do vetor.

No caso das leishmanioses cutâneas, pode ser útil tratar topicamente equídeos com deltametrina para prevenir a infecção, mas não existem relatos se, coleiras impregnadas com deltametrina poderiam ser eficazes para esses animais (SOLANO-GALLEGO et al., 2003). Em áreas endêmicas para LV, onde cães são reservatórios domésticos, a coleira impregnada com deltametrina pode ser uma estratégia efetiva e viável. E para ser sustentável, em longo prazo, estratégias de controle de LV deverão ser integradas com estratégias que abordam outras doenças transmitidas por vetores como, por exemplo, a malária (REITHINGER et al., 2007). Colares impregnados com inseticidas têm sido usados em cães e, juntamente com o controle do vetor são intervenções efetivas na redução da prevalência da LVH (MENON et al., 2016).

Simulações mostraram que eliminar cães soropositivos para LVC, uso da coleira impregnada com inseticida (que mostrou ser o método mais eficiente) e a vacinação dos cães contribuíram significativamente para diminuir a soroprevalência da infecção em cães e humanos (SEVÁ et al., 2016). A identificação com consequente eutanásia de um cão infectado pode ser feita levando em consideração a associação de fatores epidemiológicos, clínicos e diagnósticos. Neste contexto, os conhecimentos destes fatores tornam-se dados importantes para auxiliar as ações de controle da doença (BRASIL, 2006).

Em relação à redução do número de flebótomos, Teodoro et al., (1997) orientaram aos proprietários de animais de produção a realizar limpeza de toda matéria orgânica (folhas e frutos caídos, fezes de animais domésticos como aves, porcos, ovinos, entre outros) bem como a drenagem do solo ao redor da casa uma vez que as águas de uso doméstico podem ser descartadas sem maiores cuidados, deixando o solo bastante úmido e a retirada dos abrigos de animais domésticos (galinheiros e chiqueiros) para locais mais distantes das casas, e evitando também a permanência destes às soltas. Mas o que se observa é que no Brasil não existe uma estratégia de vigilância sobre hospedeiros e reservatórios. As LT são difíceis de serem controladas devido ao grande número de espécies envolvidas e suas manifestações clínicas, somadas às poucas opções efetivas de controle do vetor disponíveis atualmente.

Alianças globais são necessárias para eliminar doenças tropicais, através de investimentos que realcem o desenvolvimento de regiões endêmicas. Ao mesmo tempo em que o desenvolvimento socioeconômico baseado em programas inovadores eleve as condições de vida e, consequentemente a saúde da população (ALVAR et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Submissão ao Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COMEP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob o n° 485/2016.

3.2. Delineamento Experimental e Áreas de Estudo

A população de equídeos do DF foi estimada em 1682 animais (Secretaria de Agricultura de Distrito Federal (SEAGRI/DF), 2016), distribuída em 20 regiões administrativas (RA) (Figura 1).

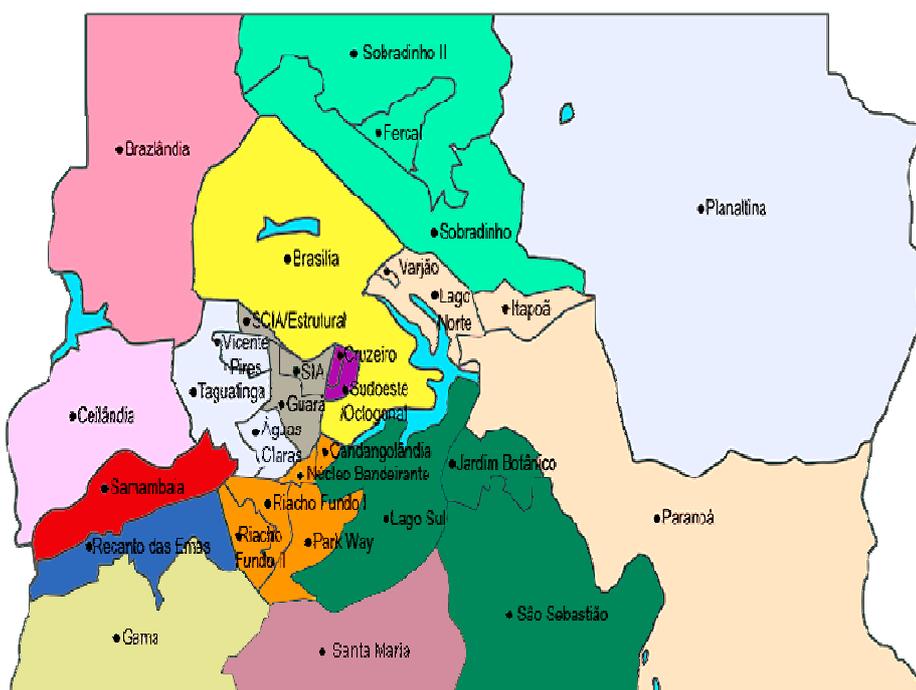


Figura 1. Mapa das Regiões Administrativas do Distrito Federal, usadas no inquérito soropidemiológico em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril e Maio de 2016. Fonte: <http://aurelioschmitt.blogspot.com.br/>

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado de acordo com Medronho (2009), através da seguinte fórmula:

$$n = \frac{1,96^2 (1-P)}{E^2 \times P}$$

Onde, P = prevalência esperada; E = erro relativo.

Admitindo-se uma prevalência esperada de 50% e um erro relativo de 5%, deveriam ser coletadas 384 amostras de sangue de equídeos, entretanto foram coletadas 411 amostras. A quantidade de amostras coletadas, em cada RA, que continham animais de tração registrados no Serviço de Defesa Agropecuária do Distrito Federal

(SEAGRI) foi aleatorizada através do programa Bioestat (Versão 5.0). As coordenadas geográficas de cada RA amostrada foram registradas com auxílio do programa GPS *status* (Tabela 1).

Tabela 1. Coordenadas geográficas das Regiões Administrativas envolvidas no inquérito soroepidemiológico em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril e Maio de 2016.

Localidade	Latitude	Longitude	Localidade	Latitude	Longitude
Águas Claras	15°50'13.92"	48°1'32.90"	Recanto das Emas	15°54'32.62"	48°3'54.06"
Brazlândia	15°40'0.52"	48°12'50.04"	Riacho Fundo I	15°53'0.82"	48°1'2.53"
Candangolândia	15°51'15.29"	47°57'2.68"	Riacho Fundo II	15°53'55.63"	48°2'54.56"
Ceilândia	15°49'17.17"	48°06'51.12"	Samambaia	15°52'14.07"	48°5'24.88"
Estrutural	15°47'10.82"	47°59'48.59"	Santa Maria	16°0'13.02"	47°59'14.17"
Gama	16°0'57.85"	48°4'5.72"	São Sebastião	15°54'10.40"	47°46'33.95"
Guará	15°49'32.33"	47°59'2.31"	Setor de Indústrias	15°39'43.98"	47°48'27.83"
Núcleo Bandeirante	15°52'16.16"	47°58'15.13"	Sobradinho I	15°39'28.88"	47°47'33.15"
Paranoá	15°46'32.58"	47°46'47.64"	Sobradinho II	15°37'60"	47°49'0.0"
Planaltina	15°37'18.02"	47°39'7.88"	Taguatinga	15°48'38.69"	48°3'56.7"

3.3. Coleta de Dados e Amostras de Sangue

Os tutores dos equídeos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam a um questionário epidemiológico semiestruturado (Anexos A e B, respectivamente). As respostas do questionário e a associação das variáveis com os resultados sorológicos (RIFI e ELISA, e os resultados positivos nas duas técnicas – RIFI/ELISA) foram analisados no *software* BioEstat 5.0, aplicando-se o teste do qui-quadrado, com nível de significância de 95%, sendo considerado significativo o valor $p \leq 0,05$. Para as variáveis que apresentaram associação significativa, foi calculada a estimativa de risco, ou razão de chances, através do cálculo da *Odds ratio*, realizado no *software* BioEstat 5.0.

Posteriormente, foi realizada coleta de sangue de equídeos, da tábua do pescoço na veia jugular, após assepsia com álcool iodado. A contenção do animal foi realizada na presença do proprietário. O sangue foi coletado com auxílio de agulha vacutainer (0,8 x 25 mm) em um frasco sem anticoagulante (de onde foi obtido o soro utilizado para a realização das técnicas sorológicas, RIFI e ELISA).

3.4 Crescimento e Manutenção de *Leishmania (L.) infantum* in vitro, Produção de Antígenos e Dosagem de Proteínas

A amostra de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), foi mantida através de repiques semanais de culturas de promastigotas em meio bifásico NNN contendo na fase sólida 37g/L de BHI, 2% de ágar e 5% de sangue desfibrinado de coelho e na fase líquida 5mL de Schneider's (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell, Brasil), 200 µg/mL de sulfato de estreptomicina (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA) e 200 UI/mL de penicilina (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA). As culturas foram mantidas em incubadora (BOD-Incubator, FANEM) a temperatura de 28° C.

Com a finalidade de obtenção de massa parasitária, 5mL de culturas de promastigotas na fase logarítmica de crescimento foram transferidas para garrafas de cultura de células (Techno Plastic Products - TPP, Suíça) contendo 50 mL de Schneider's suplementado incubados a 28° C por aproximadamente 3 dias. Após esse período as culturas foram quantificadas e repicadas para 300 mL de Schneider's suplementado, mantendo um inoculo inicial de 1×10^6 promastigotas/mL. Após quatro dias de incubação, período inicial da fase estacionária de crescimento (RIBEIRO et al., 2007), as promastigotas foram submetidas a centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos e lavadas 3 vezes em solução salina estéril (NaCl a 0,9%). A suspensão celular resultante da última lavagem foi ressuspensa em tampão PBS com inibidores de protease contendo 1mM de Iodoacetamida, 1 mM de Fenantrolina e 1 mM de PMSF (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis-USA). Posteriormente, foi realizada a lise celular constituída por 10 ciclos sucessivos de congelamento/descongelamento em solução contendo uma parte de gelo seco com uma parte de etanol absoluto (VETEC-Brasil), seguido por um processo de sonicação com somente um ciclo de 45 minutos a 65 Hz. Após, o extrato bruto foi submetido à centrifugação por 14 000 rpm por 10 minutos a 4 °C e submetido à mensuração protéica (LOWRY et al., 1951) e estocagem a -20°C até o uso.

3.5. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para a realização da RIFI, foram utilizadas formas promastigotas inteiras de *L. (L.) infantum* fixadas com formalina a 1% em PBS (*Phosphate-buffered saline*). O volume de solução antigênica não foi suficiente para a purificação dos antígenos definidos e, novas partidas para obtenção de massa parasitária foram realizadas sob as mesmas condições operacionais

A RIFI foi desenvolvida de acordo com Camargo; Rebonato, (1969). Para a realização da RIFI, as formas promastigotas de *L.(L.)infantum*, mantidas nas mesmas condições de cultivo descritas no item 3.4, foram suspensas em PBS e quantificadas em câmara hemocitométrica de Neubauer. As suspensões foram acrescidas de PBS formol a 1% e dispostas em cada campo analisado microscopicamente, de forma fornecer uma quantidade aproximada de 20 a 40 células parasitárias sobre as áreas demarcadas, aproximadamente 12 µL. Procedeu-se a secagem do material à temperatura ambiente. As amostras séricas equídeas foram diluídas a 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280, em seguida, 10 µL foram transferidos para as correspondentes marcações das lâminas. Estas foram incubadas a 37° C por 45 minutos em câmara úmida. Para a remoção dos soros, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBS. Após a secagem das lâminas, foi adicionado o conjugado fluorescente anti IgG equina produzido em coelho (Sigma-Aldrich) diluído à 1:80 em solução 1:10 de PBS-Azul de Evans contendo 2% de Tween 80, seguido de nova incubação e lavagem. As lâminas foram montadas com glicerina

tamponada e lamínulas e observadas em microscópio de fluorescência (CARL-ZEISS, AXIO SCOPE A1) com aumento de 400 vezes.

3.6. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.6.1 Soros controle

Amostras de soros controle reagente e não-reagente foram cedidas pela Médica Veterinária Isabel Roussoulières Soares. O soro controle reagente na RIFI, ELISA e PCR foi proveniente de Belo Horizonte, MG, bem como a amostra não-reagente para os mesmos exames, que teve a mesma procedência. Durante o desenvolvimento da sorologia com as amostras séricas dos equídeos de Brasília, outros controles reagente e não-reagente foram selecionados em decorrência do volume insuficiente das amostras controle utilizadas inicialmente. Para determinar a diluição de corte, os soros controle foram diluídos em 1:100, 1:200 e 1:400 e analisados no ensaio imunoenzimático.

3.6.2 Determinação da proteína bloqueadora

Foram feitos ensaios imunoenzimáticos utilizando diferentes proteínas para bloquear os espaços da placa de ELISA não ocupados pelo extrato proteico antigênico. Caseína de leite (leite em pó Molico desnatado), lecitina de soja, soro bovino, soro de galinha e albumina bovina ultra purificada (Sigma), foram empregadas em concentrações de 1, 2, 4 e 8%.

3.6.3 Titulação pareada de antígeno e conjugado enzimático

O antígeno bruto parcialmente solúvel de *L.(L.) infantum* foi diluído seriadamente em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 a partir de uma concentração de 20 µg/mL, com fator de diluição de 1:2, até a concentração de 0,62µg/mL.

O conjugado anti-IgG equina-peroxidase foi diluído em PBS com 0,05% de Tween-20 e 2% de albumina bovina (Sigma) a partir de 1:1.000 até 1:80.000.

3.6.4 Estabelecimento do cut off

O estabelecimento do *cut off* foi realizado a partir da análise de três soros padrão não-reagentes e dois soros reagentes, diluídos a 1:200 e distribuídos na placa de ELISA em duplicata. Uma vez obtido a média dos valores de densidade ótica (DO) dos controles não-reagentes, foi calculado o desvio padrão e acrescentado à média, um, dois e três desvios padrão. A melhor separação entre os controles foi alcançada com a soma de dois desvios padrão à média da DO dos controles não-reagentes.

3.6.5 Realização do ELISA com as amostras séricas equíneas

O Elisa foi realizado seguindo as modificações da metodologia de Voller et al., (1976). Placas de ELISA (Nunc Maxi sorp surface, USA), foram sensibilizadas com 100 µL antígeno bruto parcialmente solúvel de *L.(L.) infantum* em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 na concentração de 5µg/mL seguido de incubação por 18 horas sob refrigeração (4°C a 8°C). Após, as placas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (PBS com 0,05% de Tween-20). As amostras foram diluídas a 1:200 em solução de diluição (PBS com 0,05% de Tween-20 e 2% de albumina bovina) num volume de 100 µL em duplicata, seguido de incubação em câmara úmida por 45 min. a 37°C. Prosseguiu-se uma nova lavagem com 4 repetições com a adição de conjugado anti-IgG equina conjugado a peroxidase (Sigma- Aldrich) a 1:10.000 em solução de diluição com incubação seguido de lavagem nas mesmas condições descritas acima. Foi adicionada solução reveladora (Tetrametilbenzidina-TMB, Sigma) com incubação por

30 minutos. A reação foi paralisada com 50 μL H_2SO_4 a 1N e a leitura foi feita em espectrofotômetro (Test Line - Biotech Instruments) utilizando filtros de 450nm /630 nm.

3.7 Comparação entre as técnicas RIFI e ELISA

Os resultados dos testes sorológicos foram confrontados para a verificação da co-positividade, co-negatividade e concordância bruta (Tabela 2). Estes parâmetros foram obtidos em função da distribuição dos resultados dos testes sorológicos. A concordância ajustada Kappa (K) é um parâmetro que se baseia na comparação do índice de concordância esperada com o índice de concordância observada. O índice Kappa informa a proporção de concordância de “menos 1” a “mais 1”, quanto mais próximo de 1, maior o nível de concordância entre os testes avaliados. Para sua interpretação, o índice Kappa é considerado: ruim quando $<0,00$; fraco, de 0,00 a 0,20; sensível, de 0,21 a 0,40; regular de 0,41 a 0,60; bom, de 0,61 a 0,80; ótimo, de 0,81 a 0,99 e, perfeito quando igual a 1,00 (PEREIRA, 1995).

Tabela 2: Quadro explicativo para os cálculos da Co-positividade, Co-negatividade, Concordância bruta e Concordância ajustada – *Kappa* (K.) segundo Pereira (1995).

TESTE 2	TESTE 1 (teste de referência)			
	Positivo	Negativo	Total	Co-positividade = a: (a + c)
Positivo	a	b	a + b (p1)	Co-negatividade = d: (b + d)
Negativo	c	d	c + d (q1)	Concordância bruta = (a + d): (a + b + c + d)
Total	a + c (p2)	b + d (q2)	a + b + c + d	<i>Kappa</i> = [2 (ad + bc): (p1q2 + p2q1)]

4 RESULTADOS

4.1. Ajustes da Concentração dos Imunorreagentes

A concentração do antígeno bruto parcialmente solúvel de *L. (L.) infantum*, dosada pelo método de Lowry modificado, com SDS, resultou em 14,84 mg/mL. A maior diluição de antígeno frente a maior diluição de conjugado enzimático que, pareadamente, proporcionaram discriminação entre os controles reagente e não-reagente foram de 5µg/mL de antígeno e 1:10000 do conjugado. Soros controles e amostras diluídos a 1:200 apresentaram os resultados mais esparsos entre os controles reagentes e não-reagentes.

Com a albumina bovina a 2% se observou a maior diferença de leitura espectrofotométrica entre os soros controle, sendo então adotada para a realização do ensaio imunoenzimático com as amostras de soros equídeos.

4.2. Comparação entre as Técnicas Sorológicas (RIFI e/ou ELISA)

A relação de co-positividade ELISA/RIFI foi de 62,71% e a co-negatividade foi de 63,24%. A co-positividade RIFI/ELISA foi de 56,34% e a co-negatividade foi de 60,65%. A concordância bruta obtida foi de 63,02%. O índice *Kappa* encontrado foi 52,64%, sendo interpretado como regular.

Foram realizadas diluições, no teste RIFI, até que todos os animais apresentassem reação negativa. Na diluição 1:160, 21,32% (42/197) ainda permaneceram positivos. Na diluição 1:320, 16,67% (7/42) animais foram reagentes. Na diluição 1:640, dos sete animais, três (42,86%) mantiveram a fluorescência. Somente na diluição 1:1280 os três animais restantes não apresentaram fluorescência no teste (Tabela 3).

Tabela 3. Padronização da técnica de RIFI: diluições realizadas até que todos os soros de equídeos fossem considerados não reagentes para leishmaniose.

RIFI	Diluições				
	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Reagentes (%)	197 (47,93%)	42 (21,32%)	7 (16,67%)	3 (42,86%)	0 (0%)
Não reagentes (%)	214 (52,07%)	155 (78,68%)	35 (83,33%)	4 (57,14%)	3 (100%)
Total (%)	411 (100%)	197 (100%)	42 (100%)	7 (100%)	3 (100%)

Foram detectados 47,93% (197/411) animais sororreagentes para *Leishmania* spp na reação de imunofluorescência indireta (RIFI). No ensaio imunoenzimático (ELISA) 43,31% (178/411) dos equídeos foram reagentes. E foram reagentes em ambos os testes sorológicos 27,01% (111/411) dos animais (Tabela 4).

Tabela 4.Relações de concordância entre os dois testes sorológicos sob titulação $\geq 1:80$

	Testes		
	RIFI (+)	RIFI (-)	TOTAL
ELISA (+)	111 (27,01%)	67 (16,30%)	178 (43,31%)
ELISA (-)	86 (20,92%)	147 (35,77%)	233 (56,69%)
TOTAL	197 (47,93%)	214 (52,07%)	411(100%)

4.3 Análise do questionário

Foram analisadas amostras de soro de 411 equídeos distribuídos em 20 Regiões Administrativas de Brasília, Distrito Federal, Brasil. Desses animais, 94,40% (388) eram equinos (235 machos e 153 fêmeas), 5,11%(21) eram muares (8 machos e 13 fêmeas) e 0,49%(2) eram asininos (um macho e uma fêmea). Desses animais 90,09% (100) equinos e 9,91% (11) muares apresentaram resultados positivos nos dois testes de diagnóstico (RIFI e ELISA). Totalizando 27,01% (111/411) de animais sororreagentes para *Leishmaniasp.* em ambas as técnicas.

A quantidade de animais de tração, registrados no Serviço de defesa Agropecuária do Distrito Federal (SEAGRI), por RA, utilizada no estudo foi: Águas Claras (2/411), Brazlândia (15/411); Candangolândia (13/411), Ceilândia (71/411), Estrutural (15/411), Gama (26/411), Guará (20/411), Núcleo Bandeirante (3/411), Paranoá (28/411), Planaltina (43/411), Recanto das Emas (17/411), Riacho Fundo I (2/411), Riacho Fundo II (11/411), Samambaia (26/411), Santa Maria (41/411), São Sebastião (25/411), Setor de Indústrias (6/411), Sobradinho I (19/411), Sobradinho II (5/411) e Taguatinga (23/411). As coordenadas geográficas de cada localidade estão descritas na Tabela 4.

Todos os 411 animais foram testados nas duas técnicas sorológicas, sendo considerados animais sororreagente positivos somente os reagentes em ambos os testes, RIFI e ELISA. As variáveis que apresentaram associação ($p < 0,05$) foram: sexo do animal ($p=0,0093$), tempo em que o proprietário tem o animal ($p=0,0322$) e, se o animal deixou o DF ($p < 0,0001$), quando analisada somente a técnica RIFI; Sexo do animal ($p=0,0030$), localidade ($p=0,0038$), utilização de métodos para reduzir insetos no ambiente ($p=0,0019$), tempo em que possuem os animais ($p=0,0477$) e, se o animal deixou o DF ($p < 0,0001$), quando analisada somente a técnica ELISA. Ao serem analisados RIFI e ELISA simultaneamente, houve correlação quanto a sexos dos animais ($p=0,0082$), quanto ao uso de repelente nos equídeos ($p=0,0482$), se viajaram para fora do DF ($p < 0,0001$), mucosa ocular ($p=0,0384$) e, ao ser analisada a entrada dos animais em áreas com córregos ($p=0,0476$).

4.3.1 Dados pessoais do tutor

No questionário realizado, foram coletadas informações pessoais do tutor do animal (nome, endereço, telefone, escolaridade, tipo de residência e em que área (urbana ou rural) fica situada a residência). Em relação às casas, 76,65% (315/411) são

de alvenaria, 20,92% (86/411) de madeirite e 2,43% (10/411) têm os dois tipos de material. O nível de escolaridade obtido foi: 14,11% (58/411) nunca estudaram, 73,72% (303/411) têm ensino fundamental incompleto, 1,46% (6/411) têm ensino fundamental completo, 5,35% (22/411) têm ensino médio incompleto, 4,14% (17/411) têm ensino médio completo, 0,49% (2/411) têm ensino superior incompleto e 0,73% (3/411) têm ensino superior completo. Para os que não sabiam ler e escrever foi realizada a leitura de todos os dados do termo e do questionário, sendo informado todos os procedimentos que seriam realizados. Desses parâmetros coletados o interessante foi que a grande maioria dessas pessoas (92,21%; 379/411), vive em área urbana, entretanto circulam diariamente com seus animais entre ambas as regiões. Analisando os animais reagentes em ambos os testes sorológicos, 27,70% (105/379) residem em área urbana, enquanto 18,75% (6/32) residem em área rural. No entanto, a variável área onde os animais residem não foi associada com os animais reagentes para leishmanioses (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a área aonde vive o animal, na investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril e Maio de 2016.

Área (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ELISA (+)	RIFI/ELISA (-)
Urbana (379-92,21%)	183 48,28%	196 51,72%	166 43,80%	213 56,20%	105 27,70%	274 72,30%
Rural (32-7,79%)	14 43,75%	18 56,25%	12 37,50%	20 62,50%	6 18,75%	26 81,25%
Qui-quadrado	0,7574		0,6137		0,3744	
Total (411-100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%

4.3.2 Proximidade entre o abrigo do equídeo e área de mata

Foi verificado, através do questionário, que 79,08% (325/411) dos animais vivem próximos à mata, sendo que a grande maioria vive a menos de 200 metros da mata 81,54% (265/325) (Figura 2). 64,48% (265/411) dos animais vivem a menos de 200 metros de regiões de mata, sendo reagentes 47,17% (125/265) na RIFI; 41,51% (110/265) no ELISA e 25,66% (68/265) na RIFI/ELISA. 14,60% (60/411) dos animais vivem a mais de 200 metros de regiões de mata, sendo 46,67% (28/60) reagentes na

RIFI, 46,67% (28/60) no ELISA e 26,67% (16/60) na RIFI/ELISA. 20,92% (86/411) dos animais não vivem próximos a regiões de mata sendo 51,16%(44/86) reagentes na RIFI; 46,51% (40/86) no ELISA e 31,40% (27/86) na RIFI/ELISA. A análise estatística não foi significativa ($p>0,05$) quando foi verificada a possibilidade de associação entre o animal viver próximo à mata e ser regente na sorologia para leishmanioses (Tabela 6).



Figura2.Região Administrativa de Samambaia. A e B. Residências aonde vivem equídeos a menos de 200 metros das áreas de mata.

Tabela 6. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com proximidade dos animais com áreas de mata em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril e Maio de 2016.

Vive próximo à mata (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
Não (86-20,92%)	44 51,16%	42 48,84%	40 46,51%	46 53,49%	27 31,40%	59 68,60%
Sim < 200 metros (265-64,48%)	125 47,17%	140 52,83%	110 41,51%	155 58,49%	68 25,66%	197 74,34%
Sim > 200 metros (60- 14,60%)	28 46,67%	32 53,33%	28 46,67%	32 53,33%	16 26,67%	44 73,33%
Total (411)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado	0,7946		0,6113		0,5806	

4.3.3 Presença de outros animais domésticos no mesmo ambiente

Dos 411 animais que participaram do trabalho, 410 convivem com outros animais, sendo que 91,48% (376/411) com outros equídeos; 88,32% (363/411) com cães (Figura3); 77,13% (317/411) com galinhas; 64,48% (265/411) com gatos; 26,03% (107/411) com suínos; 15,33% (63/411) com bovinos e; 3,41% (14/411) com outras espécies. Um dos entrevistados possuía somente o animal do estudo. Na análise estatística para todos esses animais, somente teve relevância a análise feita para os reagentes em ambos os testes (RIFI e ELISA) nos parâmetros bovinos e suínos (Tabela 7).



Figura 3. Estábulos dos eqüídeos com a presença de outras espécies animais.
A. Presença de cães. B. Presença de cão e ave.

Tabela 7. Frequências das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a presença de outros animais no mesmo ambiente dos equídeos em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril e Maio de 2016.

Espécie animal	Presença de animais	Testes						Espécie animal	Presença de animais	Testes					
		RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ELISA (+)	RIFI/ELISA (-)			RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ELISA (+)	RIFI/ELISA (-)
Equídeos	Sim	181	195	160	216	99	277	Galinhas	Sim	148	169	138	179	87	230
	(376-91,48%)	48,14%	51,86%	42,55%	57,45%	26,33%	73,77%		(317-77,13%)	46,69%	53,31%	43,53%	56,47%	27,44%	72,56%
	Não	15	20	18	17	12	23		Não	49	45	40	54	24	70
	(35-8,52%)	42,86%	57,14%	51,43%	48,57%	34,29%	65,71%		(94-22,87%)	52,13%	47,87%	42,55%	57,45%	25,53%	74,47%
P valor		0,6735			0,4036		0,4151	P valor	0,4181			0,9602		0,8145	
Bovinos	Sim	25	38	21	42	10	53	Suínos	Sim	40,19%	59,81%	37,38%	62,62%	17,76%	82,24%
	(63-15,33%)	39,68%	60,32%	33,33%	66,67%	15,87%	84,13%		(26,03%-107)	43	64	40	67	19	88
	Não	172	176	157	191	101	247		Não	154	150	138	166	92	212
	(84,67%-348)	49,43%	50,57%	45,11%	54,89%	29,02%	70,98%		(304-73,97%)	50,66%	49,34%	45,39%	54,61%	30,26%	69,74%

P valor		0,1980						0,1099						0,0445							
Cães	Sim	169	194	155	208	98	265	Outros	Sim	7	7	9	5	5	9						
	(363-88,32)	46,56%	53,44%	42,70%	57,30%	27%	73%		(14-3,41%)	50%	50%	64,29%	35,71%	35,71%	64,29%						
	Não	28	20	23	25	13	35		Não	190	207	169	228	106	291						
	(48-11,68%)	58,33%	41,67%	47,92%	52,08%	27,08%	72,92%		(397-96,59%)	47,86%	52,14%	42,57%	57,43%	26,70%	73,30%						
P valor		0,1672			0,5957			0,8726			P valor		0,9088			0,1811			0,6597		
Gatos	Sim	123	142	110	155	70	195	Outros	Sim	7	7	9	5	5	9						
	(265-64,48%)	46,42%	53,58%	41,51%	58,49%	26,42%	73,58%		(14-3,41%)	50%	50%	64,29%	35,71%	35,71%	64,29%						
	Não	74	72	68	78	41	105		Não	190	207	169	228	106	291						
	(146-35,52%)	50,68%	49,32%	46,58%	53,42%	28,08%	71,92%		(397-96,59%)	47,86%	52,14%	42,57%	57,43%	26,70%	73,30%						
P valor		0,4678			0,3746			0,8040			P valor		0,9088			0,1811			0,6597		

4.3.4 Presença de animais silvestres próximos ao abrigo dos equídeos

Dos questionados, 54,99% (226/411) responderam já terem visto animais silvestres na região, sendo 93,81% (212/226) a menos de 200 metros do local aonde vive o animal e quanto aos seus reagentes foram: 47,17% (100/212) na RIFI, 52,83% (112/212) no ELISA e 41,51% (88/212) na RIFI/ELISA e; 6,19% (14/212) observaram animais silvestres a mais de 200 metros do local, sendo os reagentes: 50% (7/14) na RIFI e ELISA e 21,43% (3/14) na RIFI/ELISA. Enquanto 45,01% (185/411) dos tutores dos equídeos relataram nunca terem observado animais silvestres na região, sendo os reagentes: 48,65% (90/185) na RIFI, 44,86% (83/185) no ELISA e 26,49% (49/185) na RIFI/ELISA. Ao ser realizada a análise estatística, essa variável não foi considerada significativa quando associada com os resultados da sorologia dos animais (Tabela 8).

Tabela 8. Distribuição das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a presença/proximidade de animais silvestres em relação aos abrigos dos equídeos, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Animais Silvestres (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
Não (185-45,01%)	90 48,65%	95 51,35%	83 44,86%	102 55,14%	49 26,49%	136 73,51%
Sim < 200 metros (212-51,58%)	100 47,17%	112 52,83%	88 41,51%	124 58,49%	59 27,83%	153 72,17%
Sim > 200 metros (14- 3,41%)	7 50%	7 50%	7 50%	7 50%	3 21,43%	11 78,57%
Total (411-100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado	0,9458		0,6986		0,8524	

Os mamíferos silvestres observados nas localidades foram: sagui, 89,38% (202/226); saruê, 53,54% (121/226); capivara, 23,89% (54/226); cão do mato, 9,73% (22/226); tatu 6,64% (15/226); veado 3,1% (7/226); felinos selvagens 2,65% (6/226); porco espinho, 1,77% (4/226); quati 1,33% (3/226-); raposa, 1,33% (3/226); furão, 0,88% (2/226); lontra 0,88% (2/226).

4.3.5 Acesso do animal à área de mata ou aonde exista acúmulo de matéria orgânica

Outro assunto abordado foi referente ao contato dos equídeos com matéria orgânica e acúmulo de lixo, bem como a frequência. Lixo e matéria orgânica atraem insetos e é uma realidade para equídeos de tração. Dos animais, 89,05% (366/411) tinham contato diário com matéria orgânica e lixo, uma vez que os mesmos trabalham recolhendo lixo e entulhos de locais nas áreas urbana e rural (Figura4). Desses animais, 47,27% (173/366) foram reagentes na RIFI, 43,72% (160/366) no ELISA e 28,89%

(98/366) na RIFI/ELISA. Dentre os 10,95% (45/411) dos animais que não tinham contato com acúmulo de matéria orgânica e lixo 53,33% (24/45) foram reagentes na RIFI, 40% (18/45) no ELISA e 28,89% (13/45) na RIFI/ELISA (Tabela 9). Apesar da elevada frequência dos animais em contato com acúmulo de matéria orgânica, essa variável não foi associada à presença de anticorpos anti-*Leishmania* nosequídeos reagentes nas técnicas da RIFI e/ou ELISA (Tabela 9).



Figura4. Animais durante o período de trabalho nas ruas do Distrito Federal, recolhendo lixo e entulhos. **A.** na zona rural; **B.** na zona urbana, próximo à rodovia; **C.** na zona rural, próximo à mata.

Tabela 9. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com o contato dos animais com ambientes contendo acúmulo de matéria orgânica, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Contato diário com matéria orgânica (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ELISA (+)	RIFI/ELISA (-)
Sim (366-89,05%)	173 47,27%	193 52,73%	160 43,72%	206 56,28%	98 26,78%	268 73,22%
Não (45-10,95%)	24 53,33%	21 46,67%	18 40%	27 60%	13 28,89%	32 71,11%
Total (411-100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado	0,5415		0,7525		0,9018	

4.3.6 Sexo: Macho ou Fêmea

Dos animais que tiveram amostras sanguíneas coletadas 59,61% (245/411) eram machos e 40,39% (166/411) eram fêmeas. Dentre os machos, 42,45% (104/245), 37,14% (91/245) e 22,04% (54/245) foram reagentes aos testes RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente, e dentre as fêmeas, 56,02% (93/166), 52,41% (87/166) e 34,34% (57/166) foram reagentes aos testes RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente. A variável sexo foi considerada um fator associado com a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em equídeos quando foram realizadas as técnicas de RIFI ($p=0,0093$), ELISA ($p=0,0030$) e RIFI/ELISA ($p=0,00082$) (Tabela 10). Analisando a estimativa de risco (*odds ratio*) dos resultados obtidos na RIFI/ELISA, as fêmeas tiveram 84,96% de chance a mais de se infectarem por *Leishmania* sp.

Tabela 10. Frequência de amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com o sexo, em investigação da soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil no período de Abril a Maio de 2016.

Sexo (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ELISA (+)	RIFI/ELISA (-)
Macho (245-59,61%)	104 42,45%	141 57,55%	91 37,14%	154 62,86%	54 22,04%	191 77,96%
Fêmea (166-40,39%)	93 56,02%	73 43,98%	87 52,41%	79 47,59%	57 34,34%	109 65,66%
Total (411-100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado	0,0093		0,0030		0,0082	

Das fêmeas analisadas, 4,21% (7/166) tinham entre seis meses e dois anos, 24,70% (41/166) tinham entre 2,1 e 5 anos, 49,40% (82/166) tinham entre 5,1 e 10 anos e 21,69% (36/166) com idade > 10 anos. Foram reagentes na RIFI 42,86% (3/7), 48,78% (20/41), 56,10% (46/82) e 66,67% (24/36) das fêmeas, respectivamente; no ELISA 28,57% (2/7), 39,02% (16/41), 58,54% (48/82) e 58,33% (21/36), respectivamente; e em ambos RIFI/ELISA 14,29% (1/7), 24,39% (10/41), 36,59% (30/82) e 44,44% (16/36) fêmeas nas idades entre seis meses a dois anos, 2,1 a 5 anos, 5,1 a 10 anos e > 10 anos, respectivamente.

Analisando as fêmeas com idade entre 5,1 a 10 anos, que apresentaram a maior frequência de animais reagentes no RIFI e ELISA, os seguintes resultados foram encontrados: a) quanto ao local aonde vivem, das 42 fêmeas que vivem na propriedade soltas a menos de 200 metros da residência do tutor, 52,38% (22/42) estavam nesta faixa etária, sendo 40,41% (9/22) reagentes na RIFI, 77,27% (17/22) reagentes no ELISA e 36,36% (8/22) reagentes na RIFI/ELISA; das oito fêmeas que vivem soltas na propriedade a mais de 200 metros, 50% (4/8) estavam nesta faixa etária, 50% (2/4) reagentes na RIFI, 25% (1/4) reagente no ELISA e 25% (1/4) reagente na RIFI/ELISA; das 34 fêmeas que vivem em currais comunitários nesta faixa etária 61,76% (21/34) foram reagentes na RIFI, 55,88% (19/34) reagentes no ELISA e 38,24% (13/34) reagentes na RIFI/ELISA. Das 15 fêmeas que vivem em baia individual na propriedade a menos de 200 metros da casa do tutor, nesta faixa etária, 66,67% (10/15) foram reagentes na RIFI, 53,33% (8/15) reagentes no ELISA e 40% (6/15) reagentes na RIFI/ELISA; das 7 fêmeas que vivem em baias com distância superior a 200 metros 57,14% (4/7) foram reagentes na RIFI, 42,6% (3/7) reagentes no ELISA e 28,57% (2/7) reagentes em ambos os testes, RIFI/ELISA.

Analisando as fêmeas com idade superior a dez anos, apenas 12,5% (1/8) vive na propriedade a mais de 200 metros da residência, e esta foi sororreagente somente no ELISA; oito vivem na propriedade a menos de 200 metros, sendo 75% (6/8) reagentes na RIFI; 25% (2/8) reagentes no ELISA e na RIFI/ELISA; 18 fêmeas vivem em currais comunitários, sendo 72,22% (13/18) reagentes na RIFI, 66,67% (12/18) reagentes no ELISA e, 55,56% (10/18) reagentes na RIFI/ELISA; oito fêmeas vivem na propriedade, em baias a uma distância inferior a 200 metros da residência, sendo 62,5% (5/8) reagentes na RIFI e no ELISA e, 50% (4/8) reagentes em ambos os testes sorológicos, RIFI/ELISA; e, apenas uma fêmea vive em baia a mais de 200 metros da residência, sendo reagente somente no ELISA.

4.3.7 Abrigo do animal

Outro parâmetro analisado de importância para a epidemiologia da doença é saber o local aonde o animal permanece quando não está trabalhando. Alguns animais vivem soltos na própria propriedade a mais de 200 metros da casa do tutor (A)(6,33% (26/411)) ou a uma distância inferior a 200 metros (B)(20,92% (86/411)). Os resultados da sorologia mostraram que desses animais, 38,46% (10/26) e 48,84% (42/86) foram reagentes na RIFI, 46,15% (12/26) e 53,49% (46/86) foram reagentes no ELISA e 19,23%(5/26) e 32,56% (28/86) reagentes nos testes RIFI/ELISA, respectivamente. Muitos animais vivem em currais comunitários (C),46,72% (192/411), distantes da propriedade, sendo 48,95% (94/192) reagentes na RIFI, 39,58% (76/192) reagentes no ELISA e 26,04% (50/192) reagentes em ambos os testes sorológicos. Outra forma do animal viver é na estabulação, em baia individual na própria propriedade e, os itens referentes a este questionamento foram: em baia individual, na propriedade, a < 200 metros (D) e em baia individual, na propriedade, a > 200 metros (E); os resultados obtidos respectivamente em ambos os itens foram: 20,68% (85/411) e 5,35% (22/411)

reagentes somente na RIFI; 44,71% (38/85) e 59,09% (13/22), reagentes no ELISA; 40% (34/85) e 45,45% (10/22), e 24,71% (21/85) e 31,82% (7/22) reagentes em ambos os testes RIFI/ELISA, respectivamente. A análise estatística não foi significativa ($p>0,05$) quando essa variável foi associada com resultados dos animais reagentes na sorologia (Tabela 11).

Tabela 11. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com o abrigo dos animais, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Aonde o animal dorme (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
Solto ao lado da casa > 200 metros (26-6,33%)	10 38,46%	16 61,54%	12 46,15%	14 53,85%	5 19,23%	21 80,77%
Solto ao lado da casa <200 metros (86- 20,92%)	42 48,84%	44 51,16%	46 53,49%	40 46,51%	28 32,56%	58 67,44%
Em curral comunitário (192-46,72%)	94 48,96%	98 51,04%	76 39,58%	116 60,42%	50 26,04%	142 73,96%
Em baía na propriedade a < 200 metros (85-20,68%)	38 44,71%	47 55,29%	34 40%	51 60%	21 24,71%	64 75,29%
Em baía na propriedade a > 200 metros (22-5,35%)	13 59,09%	9 40,91%	10 45,45%	12 54,55%	7 31,82%	15 68,18%
Total (411-100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado	0,6454		0,2654		0,6058	

Outra análise foi realizada estratificando os animais em: aqueles que vivem na propriedade a menos de 200 metros da residência do tutor, aqueles que vivem na propriedade a mais de 200 metros da casa do tutor e aqueles que vivem em curral comunitário. 11,68% (48/411) dos animais vivem na propriedade a menos de 200 metros da residência do tutor, e destes, 47,92% (23/48) foram reagentes na RIFI, 45,83% (22/48) no ELISA 25% (12/48) na RIFI/ELISA; 41,61% (171/411) dos animais vivem na propriedade a mais de 200 metros da casa do tutor, sendo 46,78% (80/171) reagentes na RIFI, 46,78% (80/171) no ELISA e 28,66% (49/171) na RIFI/ELISA. Dentre os animais (46,72% (192/411)) que vivem distantes da propriedade, junto com outros animais, em currais comunitários, 48,95% (94/192) foram reagentes na RIFI, 39,58% (76/192) no ELISA e 26,04% (50/192) na RIFI/ELISA. No entanto, também não foi observada associação significativa ($p>0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a distância entre o abrigo dos animais e a residência humana, em

investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Aonde o animal dorme (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
Ao lado da casa > 200 metros (48-11,68%)	23 47,92%	25 52,08%	22 45,83%	26 54,17%	12 25%	36 75%
Ao lado da casa < 200 metros (171-41,61%)	80 46,78%	91 53,22%	80 46,78%	91 53,22%	49 28,65%	122 71,35%
Em curral comunitário (192-46,71%)	94 48,96%	98 51,04%	76 39,58%	116 60,42%	50 26,04%	142 73,96%
Total (411-100%)	47,93% 197	52,07% 214	43,31% 178	56,69% 233	27,01% 111	72,99% 300
Qui-Quadrado	0,9179		0,3586		0,8088	

4.3.8 Acesso dos equídeos a locais de risco

28,22% (116/411) dos animais analisados entram em área de mata, sendo a maioria dessa entrada ocorrendo ao longo de todo o dia. Desses animais, 42,24% (49/116) foram reagentes na RIFI, 47,41% (55/116) no ELISA e 25% (29/116) nos dois testes (RIFI/ELISA). No entanto, essa variável não foi considerada significativa (Tabela 13). Quanto aos locais de acesso desses animais (pastagem, córrego, mata e ambiente urbano), os seguintes resultados foram obtidos: 66,18% (272/411) têm acesso a áreas de pasto, sendo 47,06% (128/272) reagentes na RIFI, 43,38% (118/272) no ELISA e 25,37% (69/272) na RIFI/ELISA; 14,60% (60/411) dos animais têm acesso a áreas de córrego, sendo 55% (33/60) reagentes na RIFI, 50% (30/60) reagentes no ELISA e 38,33% (23/60) reagentes em ambos os testes RIFI/ELISA. 29,93% (123/411) entram em áreas de mata, sendo 44,72% (55/123) reagentes na RIFI, 45,53% (56/123) reagentes no ELISA e 27,64% (34/123) reagentes na RIFI/ELISA. 99,76% (410/411) dos animais têm acesso à área urbana, sendo desses, 48,05% (197/410) reagentes na RIFI, 43,17% (177/410) reagentes no ELISA e 27,07% (111/410) reagentes na RIFI/ELISA. As variáveis não foram associadas à infecção por *Leishmania* quando avaliadas isoladamente para cada um dos itens, exceto o fato do animal ter acesso ao córrego, que, na análise da RIFI/ELISA, foi considerado estar associado com a soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* ($p=0,0476$) (Tabela 13). Além disso, a entrada dos equídeos em córregos resultou em uma estimativa de risco de 85,78% de chance a mais de entrarem em contato com *Leishmania* sp. ($odds\ ratio = 1,8578$, $p=0,0476$ e IC 95% 1,0468 – 3,2972).

Tabela 13. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a entrada dos animais em áreas de mata, pasto, córregos, e urbana em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

AMBIENTE (n)		Testes					
		RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
Mata questão 7	Sim (116-28,22%)	49 42,24%	67 57,76%	55 47,41%	61 52,59%	29 25%	87 75%
	Não (295-71,78%)	148 50,17%	147 49,83%	123 41,69%	172 58,31%	82 27,80%	213 72,20%
	Qui-Quadrado	0,1808		0,3459		0,6518	
Pasto	Sim (272-66,18%)	128 47,06%	144 52,94%	118 43,38%	154 56,62%	69 25,37%	203 74,63%
	Não (139-33,82%)	69 49,64%	70 50,36%	60 43,17%	79 56,83%	42 30,22%	97 69,78%
	Qui-Quadrado	0,6956		0,9496		0,3524	
Córrego	Sim (60-14,60%)	33 55%	27 45%	30 50%	30 50%	23 38,33%	37 61,67%

	Não (351-85,40)	164	187	148	203	88	263
		46,72%	53,28%	42,17%	57,83%	25,07%	74,93%
	Qui-Quadrado	0,2955		0,3217		0,0476	
Mata	Sim (123-29,93%)	55	68	56	67	34	89
		44,72%	55,28%	45,53%	54,47%	27,64%	72,36%
	Não (288-70,07%)	142	146	122	166	77	211
		49,31%	50,69%	42,36%	57,64%	26,74%	73,26%
	Qui-Quadrado	0,4562		0,6279		0,9456	
Urbano	Sim (410-99,76%)	197	213	177	233	111	299
		48,05%	51,95%	43,17%	56,83%	27,07%	72,93%
	Não (0,24%-1)	0	1	1	0	0	1
			100%	100%			100%
	Qui-Quadrado	0,9669		0,9313		0,6041	

4.3.9. Prevenção individual e ambiental

Para avaliar o método utilizado para redução de insetos, foi verificado se o tutor fazia uso de inseticidas no animal ou remoção de matéria orgânica e lixo no ambiente. O uso de repelentes individuais é uma das medidas de proteção individual contra flebotomíneos indicadas pelo MS para seres humanos.

Com relação à proteção individual desses animais, 37,96% (156/411) dos tutores fazem uso de algum tipo de inseticida nos animais, contra 62,04% (255/411) que nada fazem. Dentre os animais cujos tutores usam inseticidas, 46,15% (72/156) foram reagentes na RIFI, 37,18% (58/156) foram reagentes no ELISA e 21,15% (33/156) foram reagentes em ambos os testes sorológicos (RIFI/ELISA). A frequência dessas aplicações foi: 19,23% (30/156) até uma vez por mês, 8,97% (14/156) a cada dois meses, 19,87% (31/156) a cada três meses, 3,85% (6/156) a cada quatro e cinco meses, 33,33% (52/156) a cada seis meses e 10,26% (16/156) faz uso anualmente. Quanto aos que não fazem nenhum tipo de proteção, 49,02% (125/255) dos animais foram reagentes na RIFI, 47,06% (120/255) no ELISA e 30,59% (78/255) na RIFI/ELISA. Foi encontrada associação significativa ($p=0,0482$) entre a utilização de inseticidas e a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. nas análises de RIFI/ELISA (Tabela 14), demonstrando que o uso de inseticidas é considerado um fator de proteção para leishmaniose ($odds\ ratio=0,6088$, $p=0,0482$, $IC95\%=0,3814 - 0,9717$).

Com relação ao manejo de prevenção no ambiente, 81,27% (334/411) realizam alguma forma de controle ambiental dos insetos, sendo que 99,70% (333/334) faziam a remoção mecânica de fezes e restos de alimento, 15,27% (51/334) faziam uso de inseticidas no ambiente e 14,97% (50/334) utilizavam as duas formas de proteção. Nenhum proprietário utilizava vassoura de fogo e 18,73% (77/411) não fazia qualquer tipo de manejo de prevenção ambiental. Dentre os animais que vivem em local em que se aplica algum método para redução de insetos no ambiente, 48,20% (161/334) foram reagentes na RIFI, 39,52% (132/334) no ELISA e 25,75% (86/334) na RIFI/ELISA. Dentre os animais cujos tutores nada fazem para reduzir insetos no ambiente, 46,75% (36/77) foram reagentes na RIFI, 32,47% (25/77) no ELISA e na RIFI/ELISA. Essa variável não demonstrou nenhum tipo de associação com os resultados para RIFI e RIFI/ELISA, entretanto, foi observada associação quando utilizada a técnica de ELISA ($p=0,0019$) (Tabela 14).

Tabela 14. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a proteção individual contra insetos e ectoparasitas realizada nos animais e de acordo com a remoção de matéria orgânica e lixo do ambiente em que vive o animal, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Método de redução de insetos		Testes					
		RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ELISA (+)	RIFI/ELISA (-)
Aplica repelente no animal	Sim (156-37,96%)	72 46,15%	84 53,85%	58 37,18%	98 62,82%	33 21,15%	123 78,85%
	Não (255-62,04%)	125 49,02%	130 50,98%	120 47,06%	135 52,94%	78 30,59%	177 69,41%
Qui-Quadrado		0,6436		0,0630		0,0482	
Reduz matéria orgânica no ambiente	Sim (334-81,27%)	161 48,20%	173 51,80%	132 39,52%	202 60,48%	86 25,75%	248 74,25%
	Não (77-18,73%)	36 46,75%	41 53,25%	25 32,47%	52 67,53%	25 32,47%	52 67,53%
Total (411-100%)		197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado		0,9179		0,0019		0,2916	

4.3.10 Assistência médico-veterinária

Foi avaliado também o acesso desses animais ao serviço Médico-Veterinário, uma vez que os mesmos podem fazer um diagnóstico precoce dessa doença. 65,94% (271/411) nunca receberam assistência veterinária, destes 47,60% (129/271) foram reagentes na RIFI, 45,76% (124/271) foram reagentes no ELISA e 29,15% (79/271) foram reagentes em ambos os testes sorológicos (RIFI/ELISA). 28,22% (116/411) só receberam assistência veterinária quando estiveram doentes, sendo 46,55% (54/116) reagentes na RIFI, 40,53% (47/116) reagentes no ELISA e 22,41% (26/116) reagentes a RIFI/ELISA. 0,49% (2/411) dos animais somente receberam visita do veterinário para serem vacinados ou realizarem exames de Anemia Infecciosa Equina (AIE), sendo 100% (2/2) reagentes na RIFI, 50% (1/2) reagentes no ELISA e 50% (1/2) na RIFI/ELISA. 5,35% (22/411) dos animais têm assistência veterinária como rotina, sendo destes, 54,55% (12/22) reagentes na RIFI, 27,27% (6/22) reagentes no ELISA e

22,73% (5/22) reagentes em ambos os testes de diagnóstico (RIFI/ELISA). Não foi encontrada associação significativa com a variável assistência veterinária e os resultados dos testes RIFI, ELISA e RIFI/ELISA (Tabela 15).

Tabela 15. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a assistência médico-veterinária realizada nos animais, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Assistência Veterinária (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ELISA (+)	RIFI/ELISA (-)
Nunca (271-65,94%)	129 47,60%	142 52,40%	124 45,76%	147 54,24%	79 29,15%	192 70,85%
Quando doente (116-28,22%)	54 46,55%	62 53,45%	47 40,52%	69 59,48%	26 22,41%	90 77,59%
Para vacinar (2-0,49%)	2 100%	0	1 50%	1 50%	1 50%	1 50%
Como rotina (22-5,35%)	12 54,55%	10 45,45%	6 27,27%	16 72,73%	5 22,73%	17 77,27%
Total (411-100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado (p)	0,4473		0,3380		0,4550	

4.3.11 Conhecimento dos tutores sobre a doença

O desconhecimento sobre a leishmaniose é uma realidade no Brasil e no mundo. Para avaliar o conhecimento dos tutores a respeito da doença, foi questionado se eles já haviam ouvido falar a respeito da doença: 44,28% (182/411) responderam não conhecer a doença (A); 7,54% (31/411) afirmaram conhecer a doença e sua forma de transmissão (B); e, 48,18% (198/411) afirmaram conhecer a doença, mas não sabiam sua forma de transmissão (C). De acordo com as respostas dos tutores (A, B ou C) o resultado da sorologia foi: A) 50% (91/182) dos animais reagentes na RIFI; 45,60% (83/182) no ELISA e 27,47% (50/182) na RIFI/ELISA. B) 45,16% (14/31) dos animais reagentes na

RIFI; 38,71% (12/31) no ELISA e; 25,81% (8/31) na RIFI/ELISA e, C) 46,46% (92/198) dos animais reagentes na RIFI, 41,92% (83/198) no ELISA e 26,77% (53/198) na RIFI/ELISA. No entanto, essa variável não foi considerada significativa quando foi associada com os resultados dos animais na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA (Tabela 16).

Tabela 16. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com o conhecimento do proprietário em relação a doença pesquisada, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016

Conhece a doença (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
A (182-44,28%)	91 50%	91 50%	83 45,60%	99 54,40%	50 27,47%	132 72,53%
B (31-7,54%)	14 45,16%	17 54,84%	12 38,71%	19 61,29%	8 25,81%	23 74,19%
C (198-48,18%)	92 46,47%	106 53,53%	83 41,92%	115 58,08%	53 26,77%	145 73,23%
Total (411-100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado (p)	0,5577		0,6042		0,9796	

4.3.12 Presença de pessoas ou animais com lesões que não cicatrizam

Os tutores foram questionados se existiam pessoas e outras espécies de animais com lesões. 3,16% (13/411) dos tutores responderam haver lesão em pessoas, enquanto 2,68% (11/411) responderam haver lesões em animais. Dos tutores que responderam haver lesão em pessoas, 38,46% (5/13) dos animais foram reagentes na RIFI, 38,46% (5/13) no ELISA e 23,08% (3/13) na RIFI/ELISA. Quanto à presença de lesão em animais, o resultado da sorologia foi: 63,63% (7/11) dos equídeos reagentes na RIFI, 54,55% (6/11) no ELISA e 45,45% (5/11) na RIFI/ELISA. Não houve associação significativa quando ambas as variáveis foram analisadas pelas técnicas RIFI, ELISA e RIFI/ELISA (Tabela 17).

Tabela 17. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a ocorrência de lesão em seres humanos e em animais, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Lesões		Testes					
		RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
Pessoas	Sim (13- 3,16%)	3 23,08%	10 76,92%	5 38,46%	8 61,54%	3 23,08%	10 76,92%
	Não (398- 96,84%)	194 48,74%	204 51,26%	173 43,47%	225 56,53%	108 27,14%	290 72,86%
Qui-Quadrado		0,1234		0,9410		0,9945	
Animais	Sim (11- 2,68%)	7 63,64%	4 36,36%	6 54,55%	5 45,45%	5 45,45%	6 54,55%
	Não (400- 97,32%)	190 47,5%	210 52,5%	172 43%	228 57%	106 26,5%	294 73,5%
Total (411-100%)		197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado (p)		0,4527		0,6498		0,2925	

4.3.13 Diagnóstico positivo em familiares ou animais

Em relação ao diagnóstico positivo da doença, nenhum tutor teve animais com diagnóstico para leishmaniose, mas em relação às pessoas, 0,97% (4/411) já tiveram algum parente com diagnóstico positivo para a enfermidade. Dentre os animais dos tutores que tiveram algum parente com leishmaniose, 75% (3/4) foram reagentes na RIFI, no ELISA e em ambos (RIFI/ELISA). No entanto, essa variável não foi associada estatisticamente com o resultado da sorologia dos animais (Tabela 18).

Tabela 18. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a ocorrência de leishmaniose em alguma pessoa da família, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Parentes com a doença (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
Sim (4-0,97%)	3 75%	1 25%	3 75%	1 25%	3 75%	1 25%
Não (407-99,03%)	194 47,67%	213 52,33%	175 43%	232 57%	108 26,54%	299 73,46%
Total (411-100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado (p)	0,5578		0,4363		0,1081	

4.3.14 Exame clínico dos equídeos

Foram coletados dados específicos sobre os animais e neste momento foi realizado um exame clínico nos mesmos, onde foram avaliados: o escore corporal, a coloração de mucosas (ocular e oral), se eram visíveis distúrbios de coagulação (petéquias, equimoses, etc.) e dermatopatia. Nenhum animal apresentou distúrbios na coagulação.

Quanto ao escore corporal, 78,59% (323/411) estavam com bom nível corporal, sendo destes, 49,23% (159/323) reagentes na RIFI, 43,96% (142/323) no ELISA, e 28,17% (91/323) reagentes em ambos, RIFI/ELISA. Estavam magros, 20,68% (85/411), sendo 42,35% (36/85) reagentes na RIFI, 40% (34/85) no ELISA e, 22,35% (19/85) na RIFI/ELISA. Estavam obesos 0,73% (3/411), sendo 66,67% (2/3) reagentes na RIFI, 66,67% (2/3) no ELISA e, 33,33% (1/3) na RIFI/ELISA (Tabela19).

Quanto à mucosa ocular, 94,40% (388/411) dos animais apresentaram mucosas normocoradas, sendo 42,53% (165/388) reagentes na RIFI, 42,53% (165/388) no ELISA e 25,77% (100/388) na RIFI/ELISA. A frequência de animais que apresentaram mucosas oculares hipocoradas foi de 5,35% (22/411), sendo 63,64% (14/22) reagentes na RIFI 59,09% (13/22) reagentes no ELISA e, 50% (11/22) reagentes em ambos, RIFI/ELISA. Somente 0,24% (1/411) apresentaram mucosas oculares congestionadas, e este animal não foi reagente em nenhum teste sorológico (Tabela19).

Quanto à mucosa oral, 94,89% (390/411) dos animais apresentaram mucosas normocoradas, sendo 47,44% (185/390) reagentes na RIFI, 42,31% (165/390) no ELISA e 25,90% (101/390) em ambos os testes (RIFI/ELISA). 4,87% (20/411) dos animais apresentaram mucosas hipocoradas, sendo 60% (12/20) reagentes na RIFI, 65% (13/20) no ELISA e 50% (10/20) na RIFI/ELISA. Somente um animal (1/411) apresentou mucosa oral congesta e este animal não foi reagente em nenhum dos testes sorológicos (Tabela19).

Quanto à presença de dermatopatia, 5,84% (24/411) apresentaram algum tipo de lesão e, destes animais, 45,83% (11/24) foram reagentes na RIFI, 45,83% (11/24) ELISA, e 25% (6/24) foram reagentes em ambos os testes sorológicos, RIFI/ELISA (Tabela19).

A coloração da mucosa ocular foi associada significativamente ($p=0,0374$) com os resultados de animais reagentes nos testes RIFI/ELISA. Em relação às demais variáveis não houve associação significativa ($p>0,05$) (Tabela19). Segundo a estimativa de risco, mucosas oculares hipocoradas apresentam 2,88 vezes mais chances de o animal estar infectado por *Leishmania* sp do que animais com mucosas normocoradas (OR=2,8800, $p=0,0250$, IC=1,2112-6,8479).

Tabela 19. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a avaliação da mucosa ocular, mucosa oral, escore corporal e dermatopatias em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Parâmetros		Testes							
		RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)		
Escore corporal	Magro (85/20,68%)	36	49	34	51	19	66		
		42,35%	57,65%	40%	60%	22,35%	77,65%		
		159	164	142	181	91	232		
	Normal (323/78,59%)	49,23%	50,77%	43,96%	56,04%	28,17%	71,83%		
		2	1	2	1	1	2		
		66,67%	33,33%	66,67%	33,33%	33,33%	66,67%		
	Obeso (3/0,73%)	0,4277		0,5764		0,5440			
		Mucosa ocular	Hipocorada (22/5,35%)	14	8	13	9	11	11
				63,64%	36,36%	59,09%	40,91%	50%	50%
183	205			165	223	100	288		
Normocorada (388/94,40%)	47,16%	52,84%	42,53%	57,47%	25,77%	74,23%			
	Congesta (1/0,25%)	0	1	0	1	0	1		
			100%		100%		100%		
0,1029			0,2130		0,0374				
Qui-Quadrado (p)									

Mucosa oral	Hipocorada (20/4,87%)	12 60%	8 40%	13 65%	7 35%	10 50%	10 50%
	Normocorada (390/94,89%)	185 47,44%	205 52,56%	165 42,31%	225 57,69%	101 25,90%	289 74,10%
	Congesta (1/0,25%)	0	1 100%	0	1 100%	0	1 100%
	Qui-Quadrado (p)		0,2130		0,0927		0,0504
Dermatopatia	Sim (24/5,84%)	11 45,83%	13 54,17%	11 45,83%	13 54,17%	6 25%	18 75%
	Não (387/94,16%)	186 48,06%	201 51,94%	167 43,15%	220 56,85%	105 27,13%	282 72,87%
	Qui-Quadrado (p)		0,9988		0,9642		0,9931

4.3.15. Regiões administrativas (RA)

Foram confirmados, em todas as Regiões Administrativas, animais reagentes nos dois testes sorológicos (RIFI/ELISA): Águas Claras (2/2=100%), Brazlândia (3/15=20%), Candangolândia (4/13=30,77%), Ceilândia (24/71=33,80%), Estrutural (3/15=20%), Gama (9/26=34,62%), Guará (4/20=20%), Núcleo Bandeirante (1/3=33,33%), Paranoá (9/28=32,14%), Planaltina (4/43=9,3%), Recanto das Emas (5/17=29,42%), Riacho Fundo I (1/2=50%), Riacho Fundo II (1/11=9,00%), Samambaia (10/26=38,46%), Santa Maria (7/41=17,07%), São Sebastião (8/25=32%), Setor de Indústrias (1/6=16,67%), Sobradinho I (6/19=31,58%), Sobradinho II (2/5=40%) e Taguatinga (7/23=30,43%) (Tabela 19). Na RA de Águas Claras, 100% (2/2) dos animais foram reativos. A RA com menor quantidade de reagentes foi Riacho Fundo II (Tabela 20), uma região que apresenta uma área rural ao redor da cidade, com isso, esses animais, circulam pelas duas diariamente. Dos 11 animais submetidos aos testes, um (9,1%) apresentou resultado positivo. Os animais reagentes estavam cadastrados no serviço oficial, distribuídos em 20 RAs das 31 existentes.

Foi realizada a análise estatística para todas as regiões envolvidas para cada teste sorológico, e foi encontrada associação significativa com os animais reagentes no ELISA ($p=0,0038$). Na análise realizada em cada RA, separadamente, houve associação significativa entre as RAs do Gama ($p=0,0176$) e em Planaltina ($p=0,0174$) com os animais reagentes no ELISA, e entre a RA de Planaltina ($p=0,0185$) com os animais reagentes na RIFI/ELISA (Tabela 20).

Tabela 20. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a Região Administrativa em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Localidade (n)	Testes						Localidade (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ELISA (+)	RIFI/ELISA (-)		RIFI +	RIFI -	ELISA +	ELISA -	RIFI/ELISA +	RIFI/ELISA -
Águas Claras (2)	2	0	2	0	2	0	Gama (26)	11	57,69%	69,23%	30,77%	34,62%	65,38%
	100%	0	100%	0	100%	0		42,31%	15	18	8	9	17
Qui-quadrado (p)	0,4468		0,3691		0,6428		Qui-quadrado	0,7230		0,0176		0,5376	
Brazlândia (15)	7	8	3	12	3	12	Guará (20)	8	12	6	14	4	16
	46,67%	53,33%	20%	80%	20%	80%		40%	60%	30%	70%	20%	80%
Qui-quadrado	0,8676		0,1265		0,7602		Qui-quadrado	0,6424		0,3454		0,6650	
Candangolândia (13)	8	5	5	8	4	9	Núcleo Bandeirante (3)	1	2	1	2	1	2
	61,54%	38,46%	38,46%	61,54%	30,77%	69,23%		33,33%	66,67%	33,33%	66,67%	33,33%	66,67%
Qui-quadrado	0,4935		0,9497		0,9869		Qui-	0,9397		0,8124		0,6844	

							quadrado						
Ceilândia (71)	42	29	35	36	24	47	Paranoá (28)	15	13	15	13	9	19
	59,15%	40,85%	49,30%	50,70%	33,80%	66,20%		53,57%	46,43%	53,57%	46,43%	32,14%	67,86%
Qui-quadrado	0,1057		0,4187		0,3009		Qui-quadrado	0,7022		0,3888		0,7107	
Santa Maria 41	16		25		12		29	7	34	Setor de Indústrias 6	33,33%	66,67%	33,33%
	39,02%		60,98%		29,27%		70,73%	17,07%	82,93%		2	4	2
Qui-quadrado	0,3547		0,1162		0,2323		Qui-quadrado	0,7649		0,9405		0,9176	
Estrutural (15)	40%	60%	26,67%	73,33%	20%	80%	Planaltina 43	39,53%	60,47%	23,26%	76,74%	9,30%	90,70%
	6	9	4	11	3	12		17	26	10	33	4	39
Qui-quadrado	0,7331		0,3105		0,7602		Qui-quadrado	0,3740		0,0174		0,0185	
Recanto das Emas 17	35,29%	64,71%	58,82%	41,18%	29,41%	70,59%	Taguatinga 23	56,52%	43,48%	52,17%	47,83%	30,43%	69,57%
	6	11	10	7	5	12		13	10	12	11	7	16
Qui-quadrado	0,4385		0,3107		0,9523		Qui-quadrado	0,5567		0,5366		0,9055	
Riacho Fundo I 2	50%	50%	100%	0	50%	50%	Sobradinho I 19	52,63%	47,37%	42,11%	57,89%	31,58%	68,42%
	1	1	2	0	1	1		10	9	8	11	6	13

Qui-quadrado	0,5150		0,3691		0,9461		Qui-quadrado	0,8681		0,8940		0,8618	
Riacho Fundo II 11	36,36%	63,64%	27,27%		90,91%		Sobradinho II 5	40%	60%	60%	40%	40%	60%
	4	7	3		10			2	3	3	2	2	3
Qui-quadrado	0,6511		0,4521		0,3260		Qui-quadrado	0,9224		0,7684		0,8859	
Samambaia 26	65,38%	34,62%	61,54%	38,46%	38,46%	61,54%	São Sebastião 25	36%	64%	44%	56%	32%	68%
	17	9	16	10	10	16		9	16	11	14	8	17
Qui-quadrado	0,1275		0,1072		0,2984		Qui-quadrado	0,3401		0,8885		0,7544	

4.3.16. Dados referentes ao nascimento, tempo de posse e viagens dos equídeos para fora do DF

Foi questionado aos proprietários se os animais nasceram nas propriedades e se vieram ou viajaram para outro Estado. Dos 411 animais, 13,63% (56/411) nasceram e vivem até hoje na propriedade, 86,37% (355/411) nasceram fora da propriedade e 51,75% (59/114) dos proprietários não sabiam a procedência dos animais (Tabela 20). Dos animais que nasceram fora da propriedade, 32,11% (114/355) vieram de outros Estados, sendo 3,51% (4/114) da Bahia, 35,97% (41/114) de Goiás e 8,77% (10/114) de Minas Gerais. Dos animais provenientes da Bahia, 100% (4/4) foram reagentes na RIFI, 50% (2/4) no ELISA e 50% (2/4) na RIFI/ELISA; dos animais provenientes do DF, 46,80% (139/297) foram reagentes na RIFI, 43,10% (128/297) no ELISA e 26,60% (79/297) na RIFI/ELISA; daqueles provenientes de Goiás, 48,78% (20/41) foram reagentes na RIFI, 46,34% (19/41) no ELISA e 24,39% (10/41) na RIFI/ELISA; enquanto que dos animais provenientes de Minas Gerais, 70% (7/10) foram reagentes na RIFI, 50% (5/10) no ELISA e 30% (3/10) na RIFI/ELISA. Dentre os animais em que o tutor não sabia a procedência 45,76% (27/59) foram reagentes na RIFI, 40,68% (24/59) foram reagentes no ELISA e 28,81% (17/59) foram reagentes nos dois testes de diagnóstico (RIFI/ELISA). Neste parâmetro não houve associação significativa ($p > 0,05$) com os resultados da sorologia (Tabela 21).

Tabela 21. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a localidade do nascimento do animal, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Trânsito		Testes						Total %
(n)		RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ELISA (+)	RIFI/ELISA (-)	
Nasceu na propriedade	Sim	29	27	20	36	14	42	56
		51,79%	48,21%	35,71%	64,29%	25%	75%	13,63%
	Não	168	187	158	197	97	258	355
		47,32%	52,68%	44,51%	55,49%	27,32%	72,68%	86,37%
Qui-Quadrado		0,6332		0,2761		0,2925		
Saiu do DF	Sim	47	33	46	34	26	54	80
		58,75%	41,25%	57,5%	42,5%	32,5%	67,5%	19,47%
	Não	36	210	41	205	26	220	246
		14,63%	85,37%	16,67%	83,33%	10,57%	89,43%	59,85%
	Não sabe	36	49	41	44	26	59	85
		42,35%	57,65%	48,24%	51,76%	30,59%	69,41%	20,68%
Qui-Quadrado (p)		<0,0001		<0,0001		<0,0001		
Total		197	214	178	233	111	300	411
		47,93%	52,07%	43,31%	56,69%	27,01%	72,99%	100%

A viagem ou trânsito dos animais para outros estados também foi analisado no questionário: 19,47% (80/411) dos animais já haviam viajado para outros estados, 59,85% (246/411) não haviam viajado, enquanto 20,68% (85/411) dos tutores não sabiam se os animais tinham viajado. Dos animais que já deixaram o DF, 58,75% (47/80) foram reagentes na RIFI, 57,5% (46/80) foram reagentes no ELISA e 32,5% (26/80) foram reagentes em ambos, RIFI/ELISA. Dos animais que nunca deixaram o DF, 14,63% (36/246) foram reagentes na RIFI, 16,67% (41/246) foram reagentes no ELISA e 10,57% (26/246) foram reagentes em ambos, RIFI/ELISA. Dos tutores que não sabem se os animais já deixaram o DF, 42,35% (36/85) dos animais foram reagentes na RIFI, 48,24% (41/85) foram reagentes no ELISA e 30,59% (26/85) foram reagentes em ambos, RIFI/ELISA. O fato do animal já ter saído do DF foi associado significativamente ($p < 0,0001$) com os resultados positivos na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA (Tabela 22). A estimativa de risco do animal sair do DF foi calculada e os seguintes valores foram obtidos: *odds ratio*=4,0741, $p < 0,0001$, $IC95\% = 2,1921 -$

7,5716, o que significa que a saída do equídeo do DF, em qualquer momento da sua vida, aumenta em 407% a chance de se infectar por *Leishmania* sp.

Tabela 22. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com os nascidos na propriedade e com viagens para outros Estados em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Aonde Nasceu (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
Bahia (4/0,97%)	4 100%	0	2 50%	2 50%	2 50%	2 50%
Distrito Federal (297/72,26%)	139 46,80%	158 53,20%	128 43,10%	169 56,90%	79 26,60%	218 73,40%
Goiás (41/9,98%)	20 48,78%	21 51,22%	19 46,34%	22 53,66%	10 24,39%	31 75,61%
Minas Gerais (10/2,43%)	7 70%	3 30%	5 50%	5 50%	3 30%	7 70%
Não sabe (59/14,36%)	27 45,76%	32 54,24%	24 40,68%	35 59,32%	17 28,81%	42 71,19%
Total	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado	0,1603		0,9652		0,8471	

Outras análises realizadas foram relativas ao tempo em que os proprietários tinham a posse dos animais. Dos animais: 29,20% (120/411) estavam em posse do tutor por um período entre 0 e 6 meses, sendo 52,5% (63/120), 52,5% (63/120) e, 32,5% (39/120) reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente; 13,14%(54/411) estavam em posse do tutor entre 6,1 e 12 meses, sendo 44,44% (24/54), 44,44% (24/54) e, 24,07% (13/54) reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA , respectivamente; 38,20% (157/411) estavam em posse do tutor entre 12,1 meses e 5 anos, sendo 39,49% (62/157), 36,94% (58/157) e, 21,02% (33/157) reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente; 16,06% (66/411) entre 5,1 e 10 anos, sendo 59,09% (39/66), 45,5% (30/66) e, 34,85% (23/66) reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente e; 3,40% (14/411) a mais de 10 anos, sendo 64,29% (9/14), 21,43% (3/14) e, 21,43% (3/14) reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente.

O período de tempo onde foi encontrado o maior percentual de animais na posse dos tutores foi entre 12,1 meses e 5 anos. O tempo em que o tutor tinha a posse do animal foi significativo quando analisados RIFI($p=0,0322$) e ELISA ($p=0,0477$); entretanto, quando analisado RIFI/ELISA não houve associação significativa ($p=0,1253$) (Tabela 23).

Tabela 23. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com o tempo em que o animal vive sob a guarda do tutor, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Quanto tempo tem o animal (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ELISA (+)	RIFI/ELISA (-)
Até 6 meses (120/29,20%)	63 52,5%	57 47,5%	63 52,5%	57 47,5%	39 32,5%	81 67,5%
6,1 a 12 meses (54/13,14%)	24 44,44%	30 55,56%	24 44,44%	30 55,56%	13 24,07%	41 75,93%
12,1 meses a 5 anos (157/38,20%)	62 39,49%	95 60,51%	58 36,94%	99 63,06%	33 21,02%	124 78,98%
5,1 a 10 anos (66/16,06%)	39 59,09%	27 40,91%	30 45,45%	36 54,55%	23 34,85%	43 65,15%
➤ 10 anos (14/3,40%)	9 64,29%	5 35,71%	3 21,43%	11 78,57%	3 21,43%	11 78,57%
Total (411/100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	523 6,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado (p)	0,0322		0,0477		0,1253	

4.3.17. Idade do animal

A categoria idade dos animais foi dividida por faixa etária, onde 2,92% (12/411) dos animais se encontravam na faixa etária de 6 meses a 2 anos, sendo 50% (6/12), 25% (3/12) e 16,67% (2/12) reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente; 15,09% (62/411) na faixa etária entre 2,1 a 5 anos, sendo 45,16% (28/62), 35,48% (22/62), 20,97% (13/62) reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente; 53,04% (218/411) de 5,1 a 10 anos sendo 46,33% (101/218), 44,5% (97/218) e 26,15% (57/218) reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA respectivamente e; 28,95% (119/411) dos animais apresentavam idade superior a 10 anos, sendo 52,1% (62/119), 47,06% (56/119) e, 32,77% (39/119) reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente. Foi realizada a análise estatística e não foi encontrada associação significativa entre a idade dos animais e o resultado da sorologia (Tabela 24).

Tabela 24. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com a idade dos animais, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Qual a idade do animal (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
6 meses a 2 anos (12/2,92%)	6 50%	6 50%	3 25%	9 75%	2 16,67%	10 83,33%
2,1 a 5 anos (62/15,09%)	28 45,16%	34 54,84%	22 35,48%	40 64,52%	13 20,97%	49 79,03%
5,1 a 10 anos (218/53,04%)	101 46,33%	117 53,67%	97 44,50%	121 55,50%	57 26,15%	161 73,85%
> 10 anos (119/28,95%)	62 52,10%	57 47,90%	56 47,06%	63 52,94%	39 32,77%	80 67,23%
Total (411/100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado (p)	0,7377		0,2624		0,2739	

4.3.18. Cor de pelagem

Foram encontradas 29 cores de pelagem, dentre elas: Castanho 29,68% (122/411), tordilho 22,63% (93/411), Baia 12,17% (50/411), alazão 9,98% (41/411), tordilho pedrês 8,03% (33/411), rosilho 2,68% (11/411), preto 2,68% (11/411), pelo de rato 1,47% (6/411), 1,22% baio pampa (5/411), castanho pampa 1,22% (5/411), alazão amarelo 0,97% (4/411), pampa castanho 0,97% (4/411), tordilha pampa 0,97% (4/411), alazão apaluzado 0,73% (3/411), alazão sobre baio 0,49% (2/411), pampa tordilho 0,49% (2/411), pseudoalbino 0,49% (2/411), ruão 0,49% (2/411), apaluzado 0,24% (1/411), baio palha 0,24% (1/411), castanho apaluzado 0,24% (1/411), lobuna 0,24% (1/411), lobuna pampa 0,24% (1/411), lontra 0,24% (1/411), pampa alazão 0,24% (1/411), pampa baia 0,24% (1/411), pampa preta 0,24% (1/411), tordilho apaluzado 0,24% (1/411) e tordilho apatacado 0,24% (1/411). Foram encontradas com maior frequência as pelagens: alazã com 9,98% (41/411), baia com 12,17% (50/411), castanha com 29,68% (122/411) e tordilha com 22,63% (93/411), estando o restante dos 25,54% dos animais distribuídos em 26 outras pelagens.

Foram reagentes nas técnicas de RIFI, ELISA e RIFI/ELISA respectivamente animais com as seguintes pelagens: alazão 46,34% (19/41), 39,02% (16/41) e 21,95% (9/41); alazão amarelo 25% (1/4), 50% (2/4) e 25% (1/4); alazão apaluzado 33,33% (1/3), 33,33% (1/3) e 33,33% (1/3); alazão sobre baio 50% (1/2), 50% (1/2) e 0%; baio 38% (19/50), 34% (17/50) e 20% (10/50); baio pampa 75% (3/4), 50% (2/4) e 25% (1/4); castanho 46,72% (57/122), 49,18% (60/122) e 28,69% (35/122); castanho apaluzado e tordilho apaluzado 100% (1/1), 100% (1/1) e 100% (1/1); castanho pampa 60% (3/5), 40% (2/5), e 20% (1/5); lobuna, lobuna pampa, lontra e pampa de baio 100% (1/1) reagente somente na RIFI; pampa de alazão 100% (1/1) reagente somente no ELISA; pampa de castanho 100% (4/4), 75% (3/4) e 75% (3/4); pelo de rato 83,33% (5/6), 20% (1/5) e 20% (1/5); preto 54,55% (6/11), 45,45% (5/11) e 27,27% (3/11); pseudoalbino 50% (1/2), 50% (1/2) e 50% (1/2); rosilho 63,63% (7/11), 36,36% (4/11) e 36,36% (4/11); ruã reagente somente na RIFI em 50% (1/2); tordilho 48,39% (45/93), 47,31% (44/93) e 31,18% (29/93); tordilho pampa reagente somente na RIFI e no ELISA em 25% (1/4) cada; tordilho pedrez 45,45% (15/33), 45,45% (15/33) e 30,30% (10/33). Não foram encontrados animais reagentes com as pelagens apaluzado, pampa de preto, pampa de tordilho e tordilho apatacado. A análise estatística não foi considerada significativa quando todas as cores em conjunto ou individualmente foram comparadas com os resultados da sorologia.

Em relação às pelagens foram feitas várias análises estatísticas na tentativa de encontrar alguma relevância em relação às mesmas. Foram analisadas, primeiramente, separando as pelagens claras das escuras; depois foi realizada análise juntando num mesmo grupo as pelagens primárias e suas variantes, e por último levando em consideração as pelagens mais encontradas e suas variantes como grupos individuais e agrupando em um único grupo as pelagens menos encontradas (Tabela 25). No entanto, em nenhuma delas foi encontrada associação entre a pelagem e o resultado da sorologia dos animais, tanto para RIFI, ELISA ou RIFI/ELISA.

Levando em consideração as pelagens mais encontradas, a pelagem alazã apresentou 44% (22/50), 40% (20/50) e 22% (11/50) dos animais reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente; a pelagem baia apresentou 42,86% (24/56), 33,93% (19/56) e 19,64% (11/56) dos animais reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente; a pelagem castanha apresentou 47,66% (61/128), 49,22% (63/128) e 28,91% (37/128) dos animais reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente; a pelagem Tordilha apresentou 46,97% (62/132), 46,21% (61/132) e 30,30% (40/92) dos animais reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente.

As demais pelagens foram agrupadas em um único estrato, que apresentou 54,29% (57/105), 39,05% (41/105) e 26,67% (28/105) dos animais reagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA, respectivamente, não havendo relevância no teste estatístico ($p>0,05$) (Tabela 25).

Tabela 25. Frequência das amostras reativas e não reativas pelas técnicas da RIFI e/ou ELISA, de acordo com as principais pelagens encontradas, em investigação de soroprevalência em equídeos de tração para infecção por *Leishmania* sp. no Distrito Federal, Brasil, no período de Abril a Maio de 2016.

Pelagem (n)	Testes					
	RIFI (+)	RIFI (-)	ELISA (+)	ELISA (-)	RIFI/ ELISA (+)	RIFI/ ELISA (-)
Alazã (41/9,98%)	19 46,34%	22 53,66%	16 39,02%	25 60,98%	9 21,95%	32 78,05%
Baia (50/12,17%)	19 38%	31 62%	17 34%	33 66%	10 20%	40 80%
Castanha (122/29,68%)	57 46,72%	65 53,28%	60 49,18%	62 50,82%	35 28,69%	87 71,31%
Tordilha (93/22,63%)	45 48,39%	48 51,61%	44 47,31%	49 52,69%	29 31,18%	64 68,82%
Demais (105/25,55%)	57 54,29%	48 45,71%	41 39,05%	64 60,95%	28 26,67%	77 73,33%
Total (411/100%)	197 47,93%	214 52,07%	178 43,31%	233 56,69%	111 27,01%	300 72,99%
Qui-Quadrado (p)	0,4344		0,2705		0,5952	

5 DISCUSSÃO

5.1. Comparação entre as técnicas RIFI e ELISA

A leishmaniose equídea é uma realidade no Brasil e no mundo, sendo descrita nesses animais *L. braziliensis* e *L. infantum*, as duas manifestando a forma cutânea da doença. Equídeos de tração no DF são animais extremamente susceptíveis devido à condição insalubre a que são expostos e a má nutrição a que são submetidos, que diminuem a imunidade, favorecendo a infecção por diversas doenças. Os testes sorológicos comprovam a hipótese de que os animais vivem em áreas onde já foram notificados casos de leishmaniose em humanos e em cães, podendo esta espécie estar infectada, ou estar em contato com o parasito (SAMPAIO et al., 2009; CARRANZA-TAMAYO et al., 2010; FERREIRA et al., 2014).

Ainda não existem kits comerciais para diagnóstico de leishmaniose equídea, com isso há a necessidade de se padronizar o teste. Há uma variação na metodologia aplicada para técnica ELISA na literatura quando se refere à pesquisa de imunoglobulinas anti-*Leishmania* sp para a espécie equina. No presente trabalho, foi utilizada a cepa *L.(L.) infantum* como antígeno. No entanto, outros trabalhos foram realizados com variações metodológicas na preparação e na concentração do antígeno, bem como na diluição do soro dos animais e na titulação do conjugado: Duarte et al., (2001) usaram como antígeno a espécie *L. major*like e uma diluição de soro 1:20; Cerqueira (2001) usou *L. infantum* como conjugado anti IgG equina numa diluição de 1:10000 e soro diluído em 1:100; Cerqueira et al.(2003) usaram Proteína rK39 na diluição 1:10000 para o conjugado e 1:100 no soro; Solano-Gallego et al., (2003) usaram *L. infantum* de conjugado do tipo Proteína A, numa diluição de 1:1000, e soro diluído 1:50; Fernández- Bellon et al (2006) usaram *L. infantum* do tipo proteína A na diluição de 1µg/mL e soro diluído em 1:100; Soares et al. (2013) usaram *L. braziliensis* do tipo IgG numa diluição de 1:10000 e soro diluído 1:400. Na Europa, os trabalhos realizados com equídeos sempre foram com *L. donovani*(KOEHLER et al., 2002; SOLANO-GALEGO et al., 2003; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006).

RIFI e ELISA são testes sorológicos amplamente utilizados para diagnóstico de leishmaniose. O teste ELISA é usado principalmente para detecção de anticorpos em inquéritos soropidemiológicos por ser prático, menos oneroso e rápido. A RIFI apresenta maior grau de especificidade e o teste ELISA um maior grau de sensibilidade (TÁVORA et al., 2007). A utilização de testes altamente sensíveis, que detectam o maior número possível de animais infectados, seria o mais recomendado para ações de saúde pública, pois reduziriam o potencial de transmissão. Em contrapartida, testes altamente específicos são os desejáveis para associações de proteção animal, profissionais da área de saúde e principalmente para os donos de animais. Portanto, testes utilizados em combinação poderão melhorar a precisão e poderiam atender às demandas em saúde pública e aos tutores de animais que vivem em regiões endêmicas (ARRUDA et al., 2016). Por essa razão, o presente trabalho admitiu como resultados relevantes aqueles oriundos da combinação dos resultados positivos em ambas as técnicas, ELISA e RIFI.

Os trabalhos realizados por Duarte et al. (2001) e Fernandez-Bellón et al. (2006) em áreas endêmicas para leishmaniose encontraram 11,6% e 14,3% dos animais reagentes no ELISA, valores bem inferiores ao encontrado no presente trabalho no DF, esses valores podem ter sido inferiores devido ao antígeno utilizado ser diferente ou mesmo pelo ambiente ser menos propício a presença do parasito e seu vetor.

Soares (2012) avaliou 210 equídeos através das duas técnicas sorológicas, RIFI e ELISA, encontrando 65,20% de positividade na RIFI e 41,43% no ELISA. O índice Kappa obtido foi considerado fraco (0,131). A reatividade e a não reatividade em ambas as técnicas foram de 30,48%(64/210) e de 23,80% (50/210), respectivamente. O presente trabalho avaliou quase o dobro de animais (411) e encontrou uma maior porcentagem de reagentes na RIFI (47,93%; 197/411) do que no ELISA (43,31%; 178/411). A porcentagem de animais reagentes em ambos os testes foi de 27,01% (111/411) bem próxima a obtida por Soares (2012). O índice Kappa no presente trabalho foi classificado como regular, necessitando ainda de ajustes em futuros estudos, com melhores padronizações.

Aharonson-Raz et al. (2015) realizaram um estudo transversal sobre a soroprevalência de *Leishmania infantum* entre cavalos aparentemente saudáveis em Israel. Foram realizados exames em 338 cavalos distribuídos em 22 fazendas em todo o país durante os anos de 2011 e 2013. As amostras de soro foram testadas quanto à presença de anticorpos IgG utilizando os testes de aglutinação direta (TAD) específico para *Leishmania* sp. Dos cavalos testados, seis (1,4%) foram soropositivos para *Leishmania* sp. Comparado aos testes RIFI e ELISA no presente trabalho, o TAD se mostrou bem menos sensível ou a região não era endêmica para leishmaniose.

Truppel et al., (2014) analisaram 227 equídeos e obtiveram 25 (11%) de animais reagentes no ELISA e, nenhum apresentou lesões cutâneas. Fizeram a extração de DNA para PCR de todos os animais e 37 (16,30%) foi positivo e a espécie encontrada foi *L. braziliensis*.

Barroso-Freitas et al., (2009) e Arruda et al., (2016), realizaram trabalhos para avaliar a eficácia dos testes sorológicos RIFI e ELISA. Aqueles concluíram que a melhor eficácia para o ELISA, em sensibilidade e especificidade foram para *L. braziliensis*. Já na RIFI eles não observaram nenhuma diferença entre os antígenos testados. E para eles testes paralelos RIFI e ELISA aumentaram a sensibilidade independente do antígeno testado. Estes usaram visualização histológica direta do parasito por imuno-histoquímica ou isolamento do mesmo em cultura. Individualmente, ambos os testes apresentaram sensibilidade de 91,8% e 90,8%, e especificidade de 83,4 e 53,4%, para os testes ELISA e RIFI respectivamente. Foram incluídos 98 casos positivos e 1327 casos negativos. Quando os testes foram usados em combinação paralela, a sensibilidade atingiu 99,2%, enquanto a especificidade caiu para 44,8%. Em combinação seriada (ELISA seguido de RIFI), a sensibilidade diminuiu para 83,3% e a especificidade aumentou para 92,5%. Os testes em série aumentaram a especificidade, com perda moderada de sensibilidade.

Para Arruda et al., (2016), outras possíveis fontes de variação são as técnicas empregadas pelo laboratório, o padrão de referência selecionado para a comparação e o ponto de corte selecionado para interpretar os resultados. Fatores biológicos também podem afetar a exatidão dos testes sorológicos e a sensibilidade, que irão variar de acordo com o estágio da infecção ou a imunidade do hospedeiro. Enquanto a redução de especificidade pode ser explicada pelas reações cruzadas com outros agentes ou quando o hospedeiro realmente está infectado, mas não é adequadamente detectado pelo padrão de referência estabelecido. A maior parte dessa percepção se dá baseada em estudos realizados com amostras pré-selecionadas que são tendenciosas para melhorar a especificidade. Neste caso a especificidade dos dois testes não foi tão boa quanto se era esperado, sendo possível explicar este achado como um provável efeito de ter sido um estudo sem qualquer triagem clínica ou sorológica antes da colheita das amostras, mas todos os procedimentos de amostragem foram homogêneos e realizados em apenas um laboratório de referência. Esses fatores também foram observados no trabalho realizado

com os equídeos do DF, onde as únicas características comuns a todos os animais eram o tipo de trabalho que realizavam e o ambiente insalubre a que eram submetidos. Não foi realizado nenhum tipo de triagem que aumentasse a especificidade dos testes.

5.2. Análise das variáveis: sexo e idade dos animais

A primeira característica analisada foi em relação ao sexo dos animais, que apresentou uma associação significativa ($p < 0,05$) com os animais sororreagentes na RIFI, ELISA e RIFI/ELISA.

Considerando os animais reagentes nos dois testes de diagnóstico, 48,65% (54/111) eram machos e 51,35% (57/111) eram fêmeas, sendo que do total de animais testados 59,61% (245/411) eram machos e 40,39% (166/411) eram fêmeas. A estimativa de risco foi calculada, $OD=1,8496$, o que significa que as fêmeas apresentaram 84,96% de chance a mais de se infectarem por *Leishmania* sp. quando comparadas com os machos. Na leishmaniose cutânea em seres humanos, a maior ocorrência é no sexo masculino, devido ao padrão epidemiológico ocupacional e de lazer da doença, em função da exploração desordenada das florestas e derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidroelétricas, extração de madeira, atividades agropecuárias, treinamentos militares e ecoturismo, atividades estas exercidas em sua maioria por homens (CASTRO, 2005; BRASIL, 2006).

O período de gestação das fêmeas (que tem cerca de 11 meses para equinos e de 11 a 14 meses para asininos) e amamentação dos potros, aumentam as chances da infecção por *Leishmania* sp., pois é uma época em que elas não são submetidas ao trabalho e ficam nos currais, que no DF, apresentam poucas condições higiênico-sanitárias, propiciando o desenvolvimento do vetor e aumentando o risco de infecção por *Leishmania* sp. Além disso, há a imunossupressão natural nesses estágios fisiológicos, aumentando a susceptibilidade em adquirir doenças. Foi observado que a maior concentração de fêmeas sororreagentes nas análises RIFI e ELISA foi na faixa etária entre 5,1 a 10 anos e quando analisado RIFI/ELISA a maior porcentagem foi na faixa etária de fêmeas com idade > 10 anos, idades em que as fêmeas estão aptas ao acasalamento e se tornam gestantes, ou ainda se tornam animais idosos, sendo então considerados mais susceptíveis a doenças, em decorrência da imunossenescência. Alguns já estavam com mais de 20 anos e aposentados, trabalharam a vida toda no serviço de tração, permanecendo na propriedade e nos currais comunitários como animais de estimação. As fêmeas que viviam soltas na propriedade a menos de 200 metros e em currais comunitários tiveram maior quantidade nestas faixas etárias analisadas, podendo este tipo de ambiente ser propício para a contaminação de animais imunossenescentes.

5.3. Análise da variável: cor da pelagem

Equídeos possuem as mais variadas cores de pelagem, sendo consideradas no questionário 29 cores, variando desde Castanho a Tordilho. As variações de cores encontradas nos animais também foram analisadas por separação entre cores claras e escuras, uma vez que flebotomos têm predileção por ambientes escuros (SILVA, 2014), sendo, portanto, animais de pelagem mais escuras, mais propensos a servirem de alimentação para esses artrópodes. No entanto, não houve associação significativa ($p > 0,05$) entre a coloração da pelagem e os resultados positivos na sorologia.

5.4 Análise das variáveis: origem e trânsito dos animais

A grande maioria dos animais estudados 72,26% (297/411) tem origem no Distrito Federal, onde 59,85%(246/411) nunca deixaram o território. No entanto, 19,47% (80/411) nasceram em outros estados como Bahia, Goiás e Minas Gerais, considerados endêmicos para leishmaniose. O fato do animal ter nascido em outra localidade ou já ter deixado o DF em algum momento de sua vida foi associado estatisticamente ($p < 0,0001$) com o resultado positivo na sorologia (RIFI, ELISA e RIFI/ELISA). Quando analisado o resultado da combinação das técnicas RIFI/ELISA os animais que saíram do DF apresentaram 4,07 vezes mais chance de ter sido exposto ao agente etiológico quando comparado com os animais que nunca saíram do DF. Esse fato provavelmente se deve a geografia do DF, estando inserido dentro do Estado de Goiás de onde é proveniente muitos casos de LV e LC em humanos (SES/DF/2016) e fazendo divisa com MG, estado que já teve alguns municípios implicados em leishmaniose equídea em animais de tração causada por *L. braziliensis* e *L. infantum* (SOARES, 2012; SOARES et al., 2013). Animais que viajam para áreas endêmicas podem estar se infectando, como acontece com seres humanos e, ao retornarem para o território do DF podem atuar como potenciais reservatórios do agente.

5.5. Análise da variável: tempo de posse dos tutores

Outro fato que realmente chama a atenção é quanto ao tempo de posse dos tutores com seus respectivos animais. Houve uma grande discrepância cronológica, aonde encontramos 8,03% (33/411) dos tutores que possuíam animais há menos de um mês e outros que tinham seus animais há mais de dez anos 5,11% (21/411). Tiveram uma maior proporção de reagentes aos testes sorológicos, os animais que estavam a menos tempo com o tutor (até 6 meses). Isto provavelmente acontece porque o animal acaba sendo exposto a diversos ambientes ao longo de sua vida, propiciando uma maior probabilidade de adquirir agentes etiológicos de doenças transmitidos por vetores. Esse fator também teve relevância na análise do Qui-Quadrado quando avaliados RIFI e ELISA separadamente, obtendo $p=0,0322$ e $0,0477$, respectivamente.

5.6. Análise da variável: Região Administrativa

Outra variável que apresentou relevância quando avaliado o resultado do teste sorológico ELISA foi a localidade ($p=0,0038$). Cada RA foi analisada isoladamente, sendo Gama ($p=0,0176$) e Planaltina ($p=0,0174$) associadas com a infecção por *Leishmania* sp., no teste de ELISA; Planaltina ($p=0,0185$) também foi considerada associada com a infecção quando analisada com os resultados da RIFI/ELISA. Não houve associação entre a localidade e os resultados da RIFI. Planaltina e Gama possuem áreas urbana e rural muito próximas, e por esse motivo, os animais circulam diariamente entre as duas áreas, facilitando o encontro do vetor, que vive próximo à mata, com o hospedeiro susceptível (equídeo).

Outra característica observada foi a de tutores e seus animais abordados em uma RA, mas que viviam em outra RA, demonstrando o trânsito desses animais entre as RA do DF. Fato esperado, uma vez que o DF possui uma área territorial bem pequena, facilitando a circulação desses animais entre suas regiões. Além disso, ainda há o fato dos animais circularem entre esses tutores, uma vez que são usados para um fim e essa população de carroceiros não varia, estando esses animais sob a guarda sempre dos mesmos tutores. Com isso é bem provável que grande parte desses animais já tenha vivido em diversas dessas RAs.

Apesar da proximidade com a mata não ter sido associada com o resultado positivo da sorologia, muitas propriedades e currais comunitários ficam dentro da cidade, como é o caso do Curral do Guará (Anexo C) e do Recanto das Emas (Anexo

D), este último é separado das casas apenas por uma rua. Nesses ambientes há muito acúmulo de sujeira e matéria orgânica em decomposição, que podem propiciar o desenvolvimento dos flebotomíneos (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). Na RA do Guará foram testados 4,87% (20/411) do total de animais, sendo reagentes a RIFI 40% (8/20), ao ELISA 30% (6/20) e a RIFI/ELISA 20% (4/20). Na RA de Recanto das Emas foram testados 4,14% (17/411) do total de animais, sendo 35,29% (6/17) reagentes na RIFI, 58,82% (10/17) no ELISA e 29,41% (5/17) na RIFI/ELISA. Esses resultados não foram relevantes no teste estatístico para os três parâmetros realizados.

Recanto das Emas tem a sua localização em área delimitada pela chácara Aldeia da Paz, compreendendo a cabeceira do córrego Monjolo. No parque há duas cachoeiras, corredeiras, poços, paredões e nascentes. Está localizada a 25,8 Km da RA Brasília e limita-se ao norte com Samambaia, ao sul com Gama, a leste com Riacho Fundo II e a oeste com o município Santo Antônio do Descoberto – Goiás (<http://www.recanto.df.gov.br>). O Guará é uma região consolidada, composta por uma classe média esclarecida, alto nível de escolaridade e poder aquisitivo elevado, o que garante aos moradores uma boa qualidade de vida. Possui um parque inserido dentro da cidade, que possui atributos ambientais sensíveis como nascentes, córregos, campo de murundus e várias espécies endêmicas. Conta também com a presença de densa mata de galeria cerrado típico, que protege os recursos hídricos do local (<http://www.guara.df.gov.br/>). Riacho Fundo II possui área total urbana de 54,53 Km² e rural de 52,23 Km². Divide-se com a RA do Riacho Fundo pelo córrego denominado Riacho Fundo, corpo d'água que deságua no lago Paranoá (<http://www.riachofundoi.df.gov.br>). Todas essas regiões envolvidas no inquérito possuem como características em comum a grande quantidade de área verde inserida dentro da cidade, com uma biodiversidade, com o convívio próximo de humanos, animais domésticos, animais silvestres e artrópodes.

5.7. Análise da variável: região da residência: urbana ou rural

O DF possui uma área muito pequena, estando as áreas urbana e rural muito próximas, com isso os animais de tração percorrem ao longo do dia ambas as regiões, ficando difícil determinar em qual delas eles possam estar tendo contato com o flebotomo. A não associação no teste estatístico pode ser explicada por essa ausência de delimitação entre essas regiões.

5.8. Análise da variável: proximidade do local aonde o animal vive com a mata

Estar próximo às áreas de mata, pode ser considerado um fator de risco para o animal adquirir a infecção por *Leishmania* sp, pois é o ambiente ideal para o desenvolvimento do vetor, e principalmente se essa distância foi inferior a 200 metros, uma vez que o flebotomíneo tem pouca capacidade de vôo (SILVA, 2014). No presente trabalho não foi encontrada associação entre a proximidade da mata e os resultados da sorologia, possivelmente em decorrência da pequena distância entre as áreas urbana e rural no território do DF, não importando, portanto, a que distância os equídeos se encontram de onde deveria ser o habitat natural desses artrópodes.

5.9. Análise da variável: presença de outros animais domésticos no mesmo ambiente

A presença de outros animais, seja da mesma espécie ou não (humanos, cães, gatos, porcos, bovinos e aves) no mesmo ambiente, poderia funcionar como uma

barreira de proteção para os equídeos, uma vez que esses outros animais atuariam como fonte de repasto sanguíneo para o flebótomo. Baum et al. (2014) detectaram por meio de PCR, flebótomos se alimentando de equinos, suínos e caninos. Sales et al., (2015) detectaram através de PCR, os hospedeiros utilizados como fonte de alimentação por fêmeas de *Lutzomyia* sp. Foram encontrados DNA de: humanos em 73% dos flebótomos, de galinhas em 23%, de cães em 22%, de equídeos em 15%, de ratos em 11% e, de gatos em 2%.

No DF, é comum que as espécies animais citadas, os seres humanos e os flebotomíneos coabitem num mesmo ambiente insalubre, rico em matéria orgânica já que a residência dos tutores dos equídeos amostrados é no mesmo ambiente insalubre que os animais vivem. As residências dos tutores muitas das vezes é somente um abrigo para dormir, feito de papelão, como foi observado no Setor de Indústrias (SCIA), numa reciclagem de lixo dentro da cidade, que também serve de moradia para humanos e animais. No entanto, no presente estudo, não foi observada nenhuma associação significativa entre a presença de outros animais e os resultados da sorologia.

5.10 Análise da variável: presença de animais silvestres próximos ao habitat dos equídeos

Em relação aos animais silvestres, era esperado encontrar alguma associação entre a presença desses animais e resultados positivos na sorologia dos equídeos. Mamíferos silvestres são reservatórios naturais de algumas espécies de *Leishmania* sp. (GONTIJO; CARVALHO, 2003. BRASIL, 2010) e, no DF, devido a sua geografia, esses animais estão em contato íntimo com as áreas urbana e rural, podendo ser uma fonte de manutenção para o ciclo peridomiciliar do parasito. Sua proximidade com residências humanas e com abrigos de animais pode aumentar a ocorrência da doença em seres humanos e animais domésticos. E, esses animais não estarem funcionando como amplificadores ou protetores da doença nessas regiões, podendo caracterizar a mudança do hábito dos flebotomíneos, não necessitando da presença de animais silvestres para a manutenção da doença em níveis endêmicos no DF.

Ocorreu uma diversidade de respostas nos currais comunitários, que serviam de abrigo para animais de diferentes tutores (currais comunitários), evidenciando a falta de observação dos mesmos em relação à fauna da região ou mesmo o total desconhecimento do que é um animal silvestre. Logo, a pergunta no questionário poderia ter sido mais elucidativa, contendo como opção de respostas, algumas espécies de animais silvestres considerados reservatórios para *Leishmania* sp., tais como marsupiais, edentados e canídeos silvestres (GONTIJO; CARVALHO, 2003. BRASIL, 2010).

5.11 Análise da variável: local aonde o animal dorme

Considerando que o local aonde o animal dorme pode ser uma fonte de acúmulo de pêlos, fezes, urina, restos de alimentos, que aumentam a incidência de insetos, e ainda que flebótomos têm pouca capacidade de voo, de até 200 metros do seu abrigo (SILVA, 2014), era de se esperar que este parâmetro tivesse alguma relevância para a infecção de animais e seres humanos, pois manter o abrigo dos animais a uma distância da residência é uma das medidas preconizadas para prevenção contra a doença (TEODORO et al., 1997).

5.12 Análise das variáveis: manejo estabelecido pelos tutores aos animais e ao ambiente

Oequídeo sororreagente possivelmente pode atuar como uma fonte de infecção para o vetor, cuja a capacidade de voo é de 200 metros (SILVA, 2014), e que também vive a menos de 200 m da casa do tutor (hospedeiro susceptível), teremos em um mesmo ambiente os três elementos da cadeia epidemiológica da leishmaniose, aumentando o risco da ocorrência da doença em humanos. Muitas doenças podem ser melhor prevenidas e controladas por meio da atuação integrada entre a Medicina Veterinária, a Medicina Humana e outros profissionais de saúde, e a leishmaniose é uma delas, uma vez que reporta a tríade epidemiológica que engloba seres humanos, animais e meio ambiente. Somente haverá um avanço no controle dessa enfermidade quando este conceito de saúde única for realmente levado a sério. A saúde única é a visão integrada da saúde, composta pelas áreas: humana, animal e ambiental que são indissociáveis, e que são reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma vez que homens e animais interagem em diversos ambientes, com a possibilidade de transmissão de zoonoses, que representam 60% das doenças humanas. Este conceito nada mais é do que a atuação conjunta da Medicina veterinária, da Medicina humana e de outros profissionais da saúde, que contribuirá para o desenvolvimento de pesquisas e ampliação do conhecimento científico, que conseqüentemente, culminará na melhoria das ações da saúde pública com diminuição dos riscos na saúde mundial. A saúde única existe com o dever de prevenir e curar doenças dos animais, mas sempre tendo como objetivo a saúde humana e o serviço maior à humanidade (CFMV/2017).

Existem duas formas de manejo para reduzir a presença de insetos e ectoparasitas, sendo elas: no próprio animal, através de aplicação periódica de ectoparasiticida sobre a pele dos animais (SOLANO-GALLEGO et al., 2003), e a outra através da redução de insetos no ambiente (BRASIL, 2010). O DF é uma região aonde o clima é muito seco durante a maior parte do ano e, com isso há poucos problemas com carrapatos e pulgas, tornando o hábito de aplicar inseticidas sobre a pele dos animais pouco frequente (37,96%).

Ao compararmos a quantidade de animais reagentes nos que fazem uso de algum tipo de proteção seja individual ou ambiental com os que nada fazem, a proporção de reagentes foi maior em todos os parâmetros, exceto na RIFI quanto à redução ambiental para os animais que não recebem qualquer tipo de proteção contra insetos. O que se pode inferir é que o uso de inseticidas ou remoção mecânica de sujidades diminuem o risco de infecção.

5.13 Análise das variáveis: entrada em mata, córrego, pasto e ambiente urbano

Em relação à essas variáveis, os tutores podiam responder mais de um item. Quanto ao horário em que os animais entram nestes ambientes, houve muita dificuldade em se estabelecer qual a hora em que os equídeos frequentam estes ambientes, uma vez que esses trabalhadores não têm uma jornada ininterrupta ou diária de trabalho, então houve uma adequação a uma média diária ou semanal. Em quase todos os parâmetros analisados não houve relevância estatística, exceto quanto à entrada em áreas com córrego, onde houve relevância na análise RIFI/ELISA ($p=0,0476$). O flebotomo tem predileção por ambientes sombrios e úmidos (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; BRASIL, 2006), comuns em regiões com coleções de água, como ocorre em ambientes de córrego, sendo estes propícios ao desenvolvimento deste artrópode.

5.14. Análise da variável: assistência médico-veterinária

A leishmaniose é uma doença de difícil diagnóstico em medicina humana, aonde existem mais recursos de diagnóstico e os médicos são mais familiarizados com a

enfermidade (BORGHI et al., 2016). Em medicina veterinária esta realidade não é diferente, principalmente quando se trata de equídeos, aonde o diagnóstico não é uma rotina na clínica dermatológica, ficando este ainda, limitado a vida acadêmica. Segundo Reithinger (2007) o aumento nas notificações em humanos se deve também a uma melhora nos métodos de diagnóstico. Tal fato não ocorre com equídeos, já que não existe nenhum método padronizado de diagnóstico para esses animais, necessitando que clínicos médicos veterinários fiquem atentos para a doença nesta espécie, que ocorre na maioria das vezes na forma subclínica.

5.15 Análise da variável: exame clínico dos animais

Foram avaliados: escore corporal, mucosas oral e ocular, presença de coagulopatias e dermatopatias cutâneas. Somente teve relevância estatística pelo qui-quadrado quando avaliados em conjunto RIFI/ELISA a variável mucosa ocular. O que foi observado nesses itens de ponto interessante e concordante com a maioria dos artigos publicados é o estado de saúde dos animais, onde a grande maioria não apresentava nenhuma alteração visível (FOLLADOR et al., 1999, CERQUEIRA, 2001; CERQUEIRA et al 2003; VILLALOBOS et al., 2010; SOARES, 2012). Não houve associação estatística significativa entre a presença de dermatopatias e os resultados da sorologia, entretanto 5,84% (24/411) dos equídeos apresentaram algum tipo de dermatopatia, sendo 25% (6/24) foram reagentes aos dois testes de diagnóstico. Foi possível observar que a maioria dos reagentes em ambos os testes, 90,99% (101/111), 90,09% (100/111) e 81,98% (91/111) apresentavam mucosa oral normocoradas, mucosas oculares normocoradas e escore corporal dentro da normalidade, respectivamente.

Levando em consideração que animais reagentes aos dois testes sorológicos possam ter sido infectados com *Leishmania* sp, pode-se inferir que os animais sem lesões possam ter tido cura espontânea ou a infecção ter sido antiga e a sorologia ter detectado anticorpos IgG. Na maioria dos relatos de literatura esses animais desenvolvem leishmaniose cutânea para as duas principais espécies do parasito, *L. braziliensis* e *L. infantum* (VEXENAT et al., 1986; FALQUETO et al., 1987; BARBOSA-SANTOS et al., 1994; RAMOS-VARA, 1996; SOLANO-GALLEGO, et al., 2003, ROLÃO et al, 2005; FERNÁNDEZ-BELLON, 2006; VEDOVELLO et al., 2008; LOPES et al., 2013; SOARES et al, 2013; GAMA, 2014). Os animais reagentes também, em sua grande maioria não apresentaram dermatopatia, 94,59% (105/111), corroborando com os relatos existentes que equídeos desenvolvem formas benignas e cutâneas das leishmanioses e, em sua maioria a cura é espontânea, não havendo necessidade de tratamento com medicamentos. Este fato aumenta a importância da doença em relação ao clínico veterinário, que precisa incluir esta enfermidade no diagnóstico diferencial das dermatopatias (RAMOS-VARA, 1996; SOARES et al., 2013).

O importante desta análise é exatamente o caráter benigno da leishmaniose em equídeos, uma vez que somente 5,40% (6/111) apresentaram lesões cutâneas. O que não se sabe é se esses animais quando se infectaram desenvolveram lesões cutâneas e depois tiveram cura espontânea ou se eles tiveram contato com o parasito, produziram anticorpos, mas não desenvolveram a forma clínica da doença.

5.16 Análise da variável: conhecimento sobre a doença

Esses dados serviram para mostrar que a população sabe que a doença existe, entretanto não faz ideia dos métodos de prevenção, uma vez que não tem qualquer conhecimento do modo de transmissão. Como já foi demonstrado o desconhecimento na

avaliação do uso de repelentes nos animais e no manejo do ambiente aonde eles vivem. E ainda é muito alta a porcentagem daqueles que desconhecem totalmente a sua existência.

Atualmente, a leishmaniose é uma zoonose negligenciada, e que está entre as seis doenças parasitárias de maior importância no mundo, perdendo somente para malária, quando se refere à mortalidade (WHO, 2016) ainda se encontrar num patamar de total ignorância por parte da sociedade e de descaso por parte das autoridades sanitárias. Torna-se necessária uma intervenção urgente por parte dos órgãos internacionais de saúde para que seja dada importância devida à leishmaniose e que políticas públicas, realmente eficazes, se tornem obrigatórias em todos os países endêmicos, antes que a mesma se torne epidêmica.

5.17. Análise das variáveis: pessoas ou animais com lesões cutâneas e diagnóstico em algum familiar ou animal de estimação

Uma das respostas em que havia lesão em pessoa, o equídeo também apresentava lesão, entretanto este animal foi reagente somente no ELISA. Das respostas positivas de pessoas com lesões na família, 23,08% (3/13) relataram que já tiveram parentes positivos para a doença, e destes 66,67% (2/3) tiveram seus equídeos reagentes nos dois testes de diagnóstico.

Em relação ao diagnóstico positivo da doença, nenhum tutor já teve animais diagnosticados com a doença, mas em relação às pessoas, 0,97% (4/411) já tiveram algum parente diagnosticado com a enfermidade e, desses 75% (3/4) conheciam a doença, mas não sabiam como era transmitida e somente 25% (1/4) conhecia a doença e sabia sua forma de transmissão. Isso é um fato bastante relevante, uma vez que os tutores de equídeos já tiveram o contato próximo com indivíduos doentes, mas pelo fato de desconhecerem o modo de transmissão, inevitavelmente também não conhecem as medidas de prevenção e controle.

6 CONCLUSÕES

A prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* sp em equídeos de tração foi elevada, 27,01%, alertando para a possibilidade de os equídeos estarem atuando como potenciais reservatórios para *Leishmania* sp. no território do DF.

Equídeos fêmeas têm maiores chances de infecção por *Leishmania* sp do que os machos.

Quanto maior a faixa etária do equídeo, maior é a prevalência de IgG anti-*Leishmania* sp.

Equídeos de tração que transitam para fora do DF são mais expostos à infecção por *Leishmania* sp.

O uso de inseticida nos equídeos e a remoção mecânica das sujidades do ambiente diminuem o risco de infecção por *Leishmania* sp, funcionando como fator de proteção.

Quanto menor o tempo em que o animal fica sob a posse do tutor maior o risco de infecção por *Leishmania* sp.

Animais com mucosas oculares hipocoradas possuem maiores chances de estarem infectados por *Leishmania* sp.

A exposição dos animais à ambientes com presença de córregos aumenta o risco de infecção por *Leishmania* sp.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma nova técnica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* para equídeos foi padronizada a partir das técnicas desenvolvidas por Voller et al. (1976) no ELISA e Camargo & Rebonato (1969) na RIFI.

O presente trabalho foi de grande valor para o Distrito Federal, uma vez que nenhum tipo de inquérito soroepidemiológico já havia sido divulgado no Território com a espécie animais em questão, sendo, portanto, o primeiro trabalho que determinou a soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* sp em equídeos de tração. Entretanto, novas pesquisas devem ser iniciadas na tentativa de elucidar a real importância dos equídeos na manutenção da leishmaniose em níveis endêmicos. É importante que, futuramente, exames confirmatórios da presença do parasito nesses animais, como PCR ou xenodiagnóstico, sejam realizados, para se verificar se equídeos são bons reservatórios de *Leishmania* sp., e se eles são capazes de infectar flebotomíneos. É importante usar um padrão ecológico integrado para cada espécie de hospedeiro na manutenção e amplificação das diversas espécies de agentes da leishmaniose (ROQUE; JANSEN, 2014). Deveria ser adotada como prioridade a identificação dos fatores que influenciam na transmissão aos vetores e na amplificação de focos enzoóticos, que constituem risco para transmissão para humanos e, se equídeos são capazes de participar ativamente deste processo. Conhecer e compreender os sistemas de reservatórios, bem como a importância do papel dos equídeos na manutenção deste tripanossomatídeo na natureza. Procurar descobrir se equídeos infectados são capazes de servir como fonte de infecção para os vetores, quais as espécies de *Leishmania* estão envolvidas com esses animais no DF e sua capacidade de transmissibilidade para seres humanos. Conhecer a fisiopatogenia das leishmanioses em equídeos, além de sua participação na manutenção do ciclo nos meios urbano e rural é um desafio para os próximos pesquisadores, bem como detectar possíveis reações cruzadas nos testes sorológicos com *Trypanosoma evansi*, *Toxoplasma gondii* e *Theileria equi*, fato já comprovado em cães com *Ehrlichia canis*, *Trypanosoma caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (SILVA et al., 2011).

São necessários: detectar o parasito, isolar e caracterizar o agente etiológico. Os testes moleculares fornecem informações importantes para o diagnóstico conclusivo das leishmanioses, além de ajudar a elucidar aspectos importantes nos ciclos enzoóticos e zoonóticos das leishmanioses tegumentares (BRANDÃO-FILHO; SHAW, 2006). Os testes sorológicos apresentam algumas restrições, porém os baixos custos e a facilidade na execução são vantagens para que os mesmos sejam utilizados como métodos de triagem e de diagnóstico em regiões onde biópsia e histologia são de difícil ou mesmo impossível execução (BARROSO-FREITAS et al., 2009). Entretanto, os valores obtidos por essas técnicas devem ser interpretados de forma criteriosa, uma vez que reações cruzadas determinarão falso-positivos, como ocorre na doença de chagas com humanos (BRASIL, 2010) e os baixos títulos de anticorpos acarretarão em falso-negativos. E, quando se trata de equídeos é necessário um aperfeiçoamento desses testes, que foi realizado no presente trabalho. Sendo assim, estas técnicas são excelentes ferramentas de triagem para as leishmanioses nesses animais, em áreas endêmicas para a doença, como é o DF, área endêmica por leishmaniose em humanos e cães.

Os testes sorológicos são difíceis de interpretar, devido diversas variáveis existentes, como a possibilidade de reações cruzadas com outras enfermidades, o período pré patente (PPP) entre o momento da infecção e a produção de anticorpos, quantidade de indivíduos imunossuprimidos que não fazem soroconversão, queda nos níveis de anticorpos, população que não soroconverte devido a uma resposta inata eficiente (REITHINGER et al., 2003). Além de poder ocorrer em áreas endêmicas uma

positividade maior do que a detecção da infecção e, essa ser maior que a da doença (AGUILAR et al., 1984; DESJEUX, 2004). Apesar de todas essas considerações, os testes sorológicos ainda são a principal ferramenta nos inquéritos soroepidemiológicos (REITHINGER et al., 2003).

Já foram demonstradas que diferentes espécies de mamíferos se infectam com as espécies de *Leishmania*. Agora é importante identificar as espécies que possam ser fontes de infecção aos flebotomíneos e, que estejam servindo de amplificadores em focos enzoóticos, um risco para seres humanos. Focos estes que são específicos e temporários para cada região estudada. É necessário mudar as diretrizes das pesquisas e do sistema de vigilância dos reservatórios selvagens deste parasito, possibilitando montar estratégias de controle e vigilância para cada região, diminuindo com isso a incidência da doença e sua disseminação por todo o mundo, através do desenvolvimento de forma sustentável de medidas que sejam realmente efetivas, para que ocorra uma vigilância eficaz contra as leishmanioses (ROQUE; JANSEN, 2014).

Com o aumento crescente da urbanização, os padrões de transmissão das leishmanioses estão cada vez mais alterados, aonde o parasito se adapta facilmente a novos vetores e hospedeiros. Hoje é correto afirmar que não somente os cães devem receber atenção nos focos envolvendo humanos, pois os demais animais domésticos provavelmente possuem um papel importante na epidemiologia das leishmanioses. Funcionam como fonte de infecção para os flebotomíneos, bem como os atrai para o ambiente doméstico, servindo como fonte de alimento, colaborando com sua reprodução e multiplicação. Mas para que uma determinada espécie seja incriminada como reservatório será necessário saber a prevalência da infecção na população, a taxa de repasto sanguíneo dos flebotomíneos nos indivíduos e do potencial de infectividade que os mesmos têm para esses artrópodes (SOARES, 2012).

O presente estudo demonstrou que equídeos de tração do DF apresentaram níveis de anticorpos sugerindo uma infecção pelo agente etiológico das leishmanioses e, essa ainda é uma doença extremamente negligenciada na clínica veterinária de equinos. Novos estudos devem ser realizados para a detecção das espécies de *Leishmania* sp. que circulam entre os equídeos de tração do DF, para melhor entendimento da epidemiologia da doença no território e o papel desses animais na manutenção do agente. Doença na maioria das vezes assintomática, mas que pode apresentar um curso auto-limitante e benigno, sendo necessário um maior cuidado por parte dos Médicos Veterinários em relação ao diagnóstico diferencial com outras enfermidades cutâneas. As leishmanioses ainda representam um desafio para os órgãos de Saúde Pública no Brasil e no Mundo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMINISTRAÇÃO REGIONAL DO GUARÁ, <http://www.guara.df.gov.br/>, consulta em 12/02/2017.

ADMINISTRAÇÃO REGIONAL DE RECANTO DAS EMAS, <http://www.recanto.df.gov.br/>, consulta em 12/02/2017.

ADMINISTRAÇÃO REGIONAL DO RIACHO FUNDO II, <http://www.riachofundoii.df.gov.br/>, consulta em 12/02/2017.

AGUIAR, G.M.; MEDEIROS, W.M. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil. In: Rangel, E.F., Lainson, R., Ed. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p.207-255, 2003.

AGUILAR C.M.; RANGEL E.F. Leishmaniose tegumentar em uma mula (*equus caballus x Equus asinus*) em área endêmica no Estado do Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.81, n.2, p. 239-240, 1986.

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

AGUILAR, C.M.; RANGEL, E.F.; GRIMALDI FILHO, G.; MOMEM, H. Human, canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic área in the state of Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.82, n.1, p.143, 1987.

AHARONSON-RAZ K., BANETH G., LOPES A.P., BRANCAL H., SCHALLIG H., CARDOSO L., STEINMAN A. Low Seroprevalence of *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in the Horse Population in Israel. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, v.15, n.12, p.726-731, 2015.

AKHOUNDI, M.; KUHLS K.; VOTÚPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A historical overview of the classification, evolution and dispersion of *Leishmania* Parasites and sandflies. *PlosNeglected Tropical Diseases*, v.10, n.3, 2016.

ALMEIDA, P.S.; ANDRADE A.J.; SCIAMARELLI, A.; MENEGATTI, J.A.; HERMES, S.C.; CARVALHO, MDO, S.; GURGEL-GONÇALVES, R. Geographic distribution of phlebotomines and fly species (Diptera: Psychodidae) in Central-west Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.110, n.4, p.551-559, 2015.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C., Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, v.22, n.12, p.552-557, 2006.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN C.; HERRERO, M; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.D. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PlosONE*, v.7, n.5, p.1-12, 2012.

ARRAES, S.M.A.A.; MARINI, M.T.; MARTELLO, D.; SILVEIRA, T.G.V.; LONARDONI, M.V.C.; NANNI, M.R. Investigação sorológica de casos subclínicos de leishmaniose tegumentar após um surto em uma localidade endêmica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41, n.2, p.205-208, 2008.

ARRUDA, M.M., FIGUEIREDO, F.B., MARCELINO A.P., BARBOSA, J.R., WERNECK, G.L., NORONHA, E.F., ROMERO, G.A.S. Sensitivity and specificity of

parallel or serial serological testing for detection of canine *Leishmania* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.111, n.3, p.168-173, 2016.

BADARÓ, R.; REED, S.G.; CARVALHO, E.M. Immunofluorescence antibody test in american visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.32, n.3, p.480-484, 1983.

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

BARI, A.U. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, v.16, p. 24-27, 2006.

BARROSO-FREITAS, A.P.T.; PASSOS, S.R.L.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SANTOS, G.P.L.; NASCIMENTO, L.D.; MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Accuracy of an ELISA indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.103, n.4, p.383-389, 2009.

BASANO S.D. & CAMARGO L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectiva de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, n.3, p.328-337, 2004.

BAUM M.; CASTRO, E.A.; PINTO, M.C.; GOULART, T.M.; BAURA, W.; KLISIOWICZ, D.R.; COSTA-RIBEIRO, M.C.V. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. *Acta tropica*, v.143, p.8-12, 2015.

BENVENGA, G.U. 2013.101f. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BORGHI, S.M., FATTORI, V., CONCHON-COSTA, I., PINGE-FILHO, P., PAVANELLI, W.R., VERRI, W.A. *Leishmania* infection: painful or painless? *Parasitology Research* DOI 10.1007/s00436-016-5340-7, 2016.

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

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana*. Ed, Brasília. Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde-NED/ASCOM/FUNASA, Brasília/DF, 62p, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 120 p, 2006.

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

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]*. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de

Vigilância das Doenças Transmissíveis/ Ministério da Saúde, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 190 p; 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Nota Técnica Conjunta* n.1/2011. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Brasília, 2011.

BRILHANTE, A.F.; DORVAL, M.E.M.C.; GALATI, E.A.B.; ROCHA, H.C.; CRISTALDO, G.; BRANDÃO, V.L.N.; Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in na área of fishing tourism in Central-Western Brazil). *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. São Paulo, v.57, n.3, p.233-238, 2015.

CAMARGO, M.E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies a simple inhibition procedure to ensure specific results. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v.18, p.500-5, 1969

CARDOSO, E.A.; SILVA, A. R.; CARVALHO, G.C.; FRAGA, A.G.M.; BARBOSA, M.L.C.; SANTOS, A.L.S.; CASTRO, H.C.; LIONE, V.; Leishmaniasis: History, Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. *Current Biotechnology*, v.3, n.4, 2014.

CARRANZA-TAMAYO, C.O., ASSIS, T.S.M., NERI, A.T.B., CUPOLILLO, E., RABELLO, A., ROMERO, G.A.S. Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasilia, Federal District, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.103, p.743-748, 2009.

CARRANZA-TAMAYO C.O., CARVALHO M.S.L.; BREDT, A.; BOFIL, M.I.R.; RODRIGUES, R.M.B.; SILVA, A.D.; CORTEZ, S.M.F.C.; ROMERO, G.A.S. Autochthonous visceral leishmaniasis in Brasilia, Federal District, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.43, n.4, p.396-399, 2010.

CARVALHO M.S.L.; BREDT, A.; MENEGHIN, E.R.S.; OLIVEIRA, C. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. *A Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília*, v.19, n.3, p. 227-237, 2010.

CASTRO, E.A.; LUZ, E.; TELLES, F.Q.; PANDEY, A.; BISETO, A.; DINAISKI, M.; SBALQUEIRO, I.; SOCCOL, V.T. Eco-Epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Tropica*, v.93, n.2, p.141-149, 2005.

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

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

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, CFMV, <http://portal.cfmv.gov.br>, consulta em 14/02/2017.

- CONTI, R.V.; LANE, V.F.M.; MONTEBELLO, L.; PINTO-JUNIOR, V. L. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. *Journal Vector Borne Disease*, n.53, p.99-104, 2016.
- COSTA, J. M.L., SALDANHA, A.C.R., NASCIENTO, D., SAMPAIO, G., CARNEIRO, F., LISBOA, E., SILVA, L.M., BARRAL, A. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose. *Gazeta Médica da Bahia*, v.79, n.3, p.70-83, 2009.
- COUTINHO, S.G.; NUNES, M.P.; MARZOCHI, M.C.A. & TRAMONTANO, N.A. Survey for american cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.80, p.17-22, 1985.
- COX F.E.G. History of human parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15 n.4, p.595-612, 2002.
- COX, F.E.G. The Golden Age of parasitology-1875–1925: the Scottish contributions. *London School of Hygiene and Tropical Medicine*, p. 1-15, 2016.
- DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.27, n.5, p.305-318, 2004.
- Distrito Federal: Aspectos do Distrito Federal, Brasil Escola, <http://brasilecola.uol.com.br/brasil/distrito-federal.htm>, consulta dia 11/12/2016.
- 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, MS. *RIO SCZ Boletim de Divulgação Técnica e Científica*, ano 2, n.4, 2001.
- FALQUETO A.; VAREJÃO J.B.M.; SESSA P.A. Cutaneous leishmaniasis in a horse (*Equus caballus*) from endemic área in the State of Espirito Santo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, RJ, v.82, n.3, p.443, 1987.
- FARAHMAND, M.; NAHREVANIAN, H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. *Iranian Biomedical Journal*, v.20, n.3, p.128-134, 2016.
- FERNÁNDEZ-BELLON H.; SOLANO-GALLEGO L.; BARGADÍ, M.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Veterinary Parasitology*. v.135, n.2, p.181-185, 2006.
- FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.3, n.2, p.47-57, 2012.
- FERREIRA J.B.C.; MACEDO M.A.; ROCHA, D.A.; FERREIRA, T.S.; OBARA, M.T.; GURGEL-GONÇALVES, R. Ocorrência de flebotômíneos (Diptera: Psychodidae) em matas de galeria no Distrito Federal, Brasil. *EntomoBrasilis*, v.7, n.3, p.216-221, 2014.
- FERREIRA, W.; ÁVILA, S.L.M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2^a ed., 2001.
- FOLLADOR, I.A.C.; CARDOSO M.A.; TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; MIRANDA J.C.; BITTENCOURT A.; CARVALHO E.M. Surto de leishmaniose

tegumentar americana em Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.32, n.5, p.497-503, 1999.

FORATTINI, O.P. *Entomologia Médica*. 4v. São Paulo: Edgard Blücker/EDUSP, 678p, 1973.

GAMA A., ELIAS J.; RIBEIRO, A.J.; ALEGRIA, N.; SCHALLIG, H.D.F.H.; SILVA, F.; SANTARÉM, N.; CARDOSO, L.; COTOVIO, M. Cutaneous leishmaniasis in a horse from northern Portugal. *Veterinary Parasitology*, v.200,n.1-2,p.189-192, 2014.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, n.1, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infectious Diseases Clinics*, n.26, p.293–307, 2012.

GOVERNO DE BRASÍLIA, <http://www.brasilia.df.gov.br/index.php/2015/10/21/333/>; consulta em 11/12/2016.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, v.35, p.1169-1180, 2005.

HANDLER, M.Z.; PATEL, P.A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. [*Journal of the American Academy of Dermatology*](#),v.73, n.6, p.911-926, 2015.

HERENIO, E.M; FORTES, R.C; RINCON, G. Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. *Journal of the Health Sciences Institute*, v.32, n.2, p.126-9, 2014.

HOMMEL, M.; PEKIS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M.; LANOTTE, G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.72, p.213-218, 1978.

IBGE: Geografia do Distrito Federal (<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=df>), consulta em 14/12/2016.

KOEHLER, K.; STECHELE M.; HETZEL, U.; DOMINGO, M.; SCHÖNIAN, G.; ZAHNER, H.; BURKHARDT, E. Cutaneous leishmaniasis in a horse in Southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary parasitology*, v.109, n.1-2, p.9-17, 2002.

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

LARSON, M., TOEPP, A., SCOTT, B., KURTZ, M., FOWLER, H., ESFANDIARI, J., HOWARD, R, F. DUTHIE, M.S., PETERSEN, C. Semi-quantitative measurement of asymptomatic *L. infantum* infection and symptomatic visceral leishmaniasis in dogs using Dual-Path Platform® CVL. *Applied Microbiology and Biotechnology*, p.1-10, 2016.

LOBSINGER, L., MÜLLER, N., SCHWEIZER, T., FREY, C.F., WIEDERKEHR, D., ZUMKEHR, B., GOTTSTEIN, B. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, n.169, p.408–414, 2010.

- LOPES, A.P.; SOUSA, S.; DUBEY, J.P.; RIBEIRO, A.J.; SILVESTRE, R.; COTOVIO, M.; SCHALLIG, H.D.F.H.; CARDOSO, L.; SILVA, A.C. Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in horses from the north of Portugal. *Parasites & Vectors*, v.6, p.178, 2013.
- LYNN, M.A.; MCMASTER, W.R. *Leishmania*: conserve devolution-diverse diseases. *Cellpress*, v.24, n.3, p.103-105, 2008.
- MANSUETO, P.; SEIDITA, A.; VITALE, G.; CASCIO, A. Leishmaniasis in travelers: a literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v.12. p.563-581, 2014.
- MENEZES, J.P.B.; GUEDES, C.E.S.; PETERSEN, A.L.O.A.; BITTENCOURT, D.; FRAGA, M.; VERAS, P.S.T. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. [Biomed Research International](#), 2015.
- MENON, S.S.; ROSSI, R.; NSHIMYUMUKISA, L.; ZINSZER, K. Decentralized control of human visceral leishmaniasis in endemic urban areas of Brazil: a literature review. *Tropical Medicine and Health*, v.44, n.9, 2016.
- MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New world cutaneous leishmaniasis: Update review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*. v.63, n.2, p.309-322, 2010.
- MORALES, A.A; GARCIA, F.; ROSSINI, M.V.; COMERMA, S.S.; CHACÓN, T.; HERRERA, L.; GÓMEZ, M.S. Lesiones cutâneas parasitarias em el asno *Equus asinus* de Choroní, Estado Aragua, Venezuela. *Neotropical Helminthology*, v.4, n.2., p.179-182, 2010.
- MÜLLER, N.; WELLE, M.; LOBSIGER, L.; STOFFEL, M.H.; BOGHENBOR, K.K.; HILBE, M.; GOTTSTEIN, B.; FREY, C.F.; GEYER, C.; VON BOMHARD, W. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Veterinary Parasitology*, v.166, n.3-4, p.346-351, 2009.
- NEGRÃO, G.N.; FERREIRA, M.E.M.C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro, Maringá, v.6, n.1, p.147-168, 2014.
- OLIVEIRA, C.G., LACERDA, H.G., MARTINS, D.R.M., BARBOSA, D.A., MONTEIRO, G.R., QUEIROZ, J.W., SOUSA, J.M.A., XIMENES, M.F.F.M; JERONIMO, S.M.B. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural. *Interface Acta Tropica*, n 90, p.155-16, 2003.
- OLIVEIRA-NETO, M.P.; PIRMEZ, C.; Rangel, E.; SCHUBACH A. & GRIMALDI JR, G.; An outbreak of american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban área of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, vol. 83, n.3, p.427-435, 1988.
- PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v.13, n.9, p.1123-1138, 2015.
- PEREIRA, M.G. *Epidemiologia: teoria e prática*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1995.
- PONS, R.A.; LONDRES, H. Leishmaniasis tegumentária americana em el asentamiento campesino de Zypayare. Aspectos epidemiológicos, clínicos e inmunológicos Su importância in la reforma agraria. *Kasmerra*, v.3, p.5-59, 1968.

- PORFIRIO-PASSOS, G.; SILVA, P.M.A.; ALMEIDA, S.L.H.; PORFIRIO, L.C.; ZANINI, M.S. Métodos para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana-Revisão. *Enciclopédia Biosfera*, Centro científico conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p.1232-1248, 2012.
- POURMOHAMMADI, B.; MOTAZEDIAN, M.H.; HATAM, G.R.; KALANTARI, M.; HABIBI, P.; SARKARI, B. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Iranian Journal of Parasitology*, v.5, n.4, p.1-8, 2010.
- QUARESMA, P.F., RÊGO, F.D., BOTELHO, H.A., SILVA, S.R., MOURA-JÚNIOR, A.J., TEIXEIRA-NETO, R.G., MADEIRA, F.M., CARVALHO, M.B., PAGLIA, A, P., MELO, M.N., GONTIJO, C.M.F.F. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, n.105, p.579-585, 2011.
- RAMOS-VARA, J.A.; ORTIZ-SANTIAGO, B. SEGALÈS, J.; DUNSTAN, R.W. Cutaneous leishmaniasis in two horses. *Veterinary Pathology*,v.33, p.731-734, 1996.
- REITHINGER. R.; DUJARDIN, J. C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.1, p.21-25, 2007.
- REITHINGER R.; DUJARDIN, J, C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, v.7, n.9, p.581-96, 2007.
- REUSS S.M.; DUNBAR M.D.; MAYS, M.B.C.; OWEN, J.L.; MALLICOTE, M.F.; ARCHER, L.L.; WELLEHAN-JUNIOR, J.F.X.; Autochthonous *Leishmania siamensis* in horse, Florida, USA. *Emerging Infectious Diseases*, v.18, n.9, 2012.
- RIBEIRO, F.C.; SCHUBACH DE O. A.;MOUTA-CONFORT, E.;SCHUBACH, T.M.; MADEIRA, F.M.;MARZOCHI, M.C. Use of ELISA employing *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. *Veterinary Parasitology*,v.148; n.3-4; p.200-206, 2007.
- RODRIGUES I.A.; MAZOTTO A.M., CARDOSO, V.; ALVES, R.L.; AMARAL, A.C.F.; SILVA, J.R.A.; PINHEIRO, A.S.; VERMELHO, A.B. Natural products: Insights into Leishmaniasis inflammatory response. *Hindawi Publishing Corporation*, v. 2015, article ID 835910, 2015.
- RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; FRANCINO, O.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMÓN, M.; ALBEROLA, J. *Leishmania* infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a “Gold Standard”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.82, n.2, p.251-256, 2010.
- ROLÃO N; MARTINS M.J.; CAMPINO L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite Journal*, v.12, n.2, p.183-186, 2005.
- ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, v.3, p.251–262, 2014.
- SALES, K.G.S.; COSTA, P.L.C.; MORAIS, R.C.S.; OTRANTO, D.; BRANDÃO-FILHO, S.P.; CAVALCANTI, M.P.; DANTAS-TORRES, F. Identification of

phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. *Parasites & Vectors*, v.8. n.230, 2015.

SAMPAIO, R.N.R.; DE PAULA, C.D.R. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.32, n.5, p.523-528, 1999.

SAMPAIO, R.N.R.; GONÇALVES, M.C.; LEITE, V.A.; FRANÇA, B.V.; SANTOS, G.; CARVALHO, M.S.L.; TAUIL, P.L. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.42, n.6, p.686-690, 2009.

SANCHES, L.C.; MARTINI, C.C.; NAKAMURA M.E.B.; LIMA, B.D.; LIMA V.M.F.; Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, Jaboticabal, v.25, n.4, p.465-469, 2016.

SAVOIA D. Updates and perspectives on leishmaniasis. *The Journal Infection in Developing Countries*, v.9; n.6, p.588-596, 2015.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE. Informativo epidemiológico das leishmanioses no distrito federal. Ano 08, nº 1, janeiro de 2016.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE. Informativo epidemiológico das leishmanioses no distrito federal. Ano 08, nº 2, abril de 2016.

SENRA N. (org) veredas de Brasília: as expedições geográficas em busca de um sonho. RJ: IBGE, 2010.

SEVÁ, A.P.; OVALLOS, F.G.; AMAKU M.; CARRILLO, E.; MORENO, J.; GALATI, E.A.B.; LOPES, E.G.; SOARES, R.M.; FERREIRA, F. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PlosOne*, v.11, n.7, 2016.

SILVA, A.V.M.; CANDIDO, C.D.S; PEREIRA, D.P.; BRAZIL, R.P.; CARREIRA, J.C.A. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica*, v.105, p.92-94, 2008.

SILVA, D. A.; PERIÉ, C. S. F. S.; MENDES JÚNIOR, A. A. V.; MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B. Leishmaniose visceral canina em Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro – relato de caso. *Clínica Veterinária*, v.18, n.95, p.64-68, 2011.

SILVA, C.B. diagnóstico sorológico e aspectos epidemiológicos da leishmaniose canina na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária, 2012.

SILVA, C.L.G. Nematocera- Mosquitos. In: MONTEIRO, S.G. *Parasitologia na Medicina Veterinária*. São Paulo, Roca, p.97-108, 2014.

SILVA, D.A., MADEIRA, M.F., BARBOSA-FILHO, C.J.L., SCHUBACH, E.Y.P., BARROS, J.H.S., FIGUEIREDO, F.B. *Leishmania* (*Leishmania*) *hertigi* in a porcupine (*Coendou*sp.) found in Brasília, Federal District, Brazil. *Revista de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v.22, n.2, p.297-299, 2013.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease

in Amazonian Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.99, n.3, p.239-251, 2004.

SÓ Geografia- Distrito Federal.
[http://www.sogeografia.com.br/conteudos/estados/Distrito Federal](http://www.sogeografia.com.br/conteudos/estados/Distrito%20Federal). Consulta em 11/12/2016.

SOARES, I.R. 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, Belo Horizonte, Escola de Veterinária – UFMG, 2012.

SOARES, I.R.; SILVA, S.O.; SILVA, S.O.; MOREIRA, F.M.; PRADO, L.G.; FANTINI, P. MARANHÃO, R.P.A.; SILVA FILHO, J.M.; MELO, M.N.; PALHARES, M.S. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, v.197, n.3-4, p.665-669, 2013.

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

SOUSA, T.C.; FRANCISCO, A.K.P.; SANTOS, I.B. Leishmaniose canina em Brasília, DF: Uma revisão de literatura. *Tempus, Actas de Saúde Coletânea*, Brasília, v.9, n.3, p. 187-202, 2015.

STEBUT, E.V. Leishmaniasis, *Journal of The German Society of Dermatology*, DOI: 101111, p.191-201, 2015.

TÁVORA, M.P.; PEREIRA, M.A.; SILVA, V.L.; VITA, G.F. Comparative validation study between the ELISA and RIF techniques for diagnosing *Leishmania* sp in stray dogs caught in the municipality of Campos de Goytacazes, State of Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.4, p.482-483, 2007.

TEODORO, U.; KÜHL, J. B. Interação flebotomíneos, animais domésticos e dominância de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) em área com alto grau de antropia, no sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.31, n.5, p.512-516, 1997.

TEVA, A.; FERNANDEZ, J.C.C; LAURENTINO-SILVA, V. *Imunologia*. In: MOLINARO, E.M; CAPUTO, L.F.G; AMENDOEIRA, M.R.R (Org.). *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Oswaldo Cruz, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2009-2010. v.4, p.19 – 124.

TRUPPEL J.H.; OTOMURA F.; OTOMURA, F.; TEODORO, U.; MASSAFERA, R.; COSTA-RIBEIRO, M.C.V.; CATARINO, C.M.; DALAGRANA, L.; FERREIRA, M.E.M.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Can equines be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? *Plos one* v.9, n.4, april, 2014.

VEDOVELLO FILHO, D.; JORGE F.A.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V. American cutaneous leishmaniasis in horses from endemic areas in the north-central mesoregion of Paraná state, Brasil. *Zoonoses Public Health*. V.55, n.3, p.149-155, apr, 2008.

VEXENAT, J.A.; BARRETTO, A.C; ROSA, A.C.O.; SALES, C.C.; MAGALHÃES, A.V. Infecção natural de *Equus asinus* por *Leishmania braziliensis braziliensis* –Bahia, Brasil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, vol.81,n.2,p.237-238, abr/jun 1986.

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. *MiddleEast Journal of Scientific Research*, v.5, n.6, p.520-534, 2010.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E., BARTLETT, A.N.N. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organization*, v.53, p.55-65; 1976;

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, *WHO Library Cataloguing-in-Publication*, Geneva, 22-26 March 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016. leishmaniasis Burden and distribution. www.who.int/leishmaniasis/burden/en/ , consulta em 23/02/2016.

YOSHIDA, E.L.A.; CORREA, F.M.A.; MARQUES, S.A.; STOLF, H.O.; DILLON, N.L.; MOMEN, H.; GRIMALDI, Jr, G. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (=L. *Braziliensis braziliensis*) in the South-west region of São Paulo state, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.85, n.1, p.133-134, 1990.

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

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) voluntário

Eu, Nádia Valesca Biral de Oliveira Peixoto de Mello, Médica Veterinária, Mestranda no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, solicito a sua participação e autorização para a pesquisa intitulada “Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose em equídeos de tração do Distrito Federal, Brasil”, realizada a orientação da professora Dra Isabele da Costa Angelo. O estudo envolve a aplicação de questionários impressos a tutores de equídeos de tração do distrito Federal. Serão coletadas e analisadas informações referentes a sua escolaridade e local de residência, e informações referentes aos hábitos de vida de seu animal e possíveis fatores de risco para a ocorrência de Leishmaniose. Esse estudo é essencial para que possamos identificar a prevalência desta zoonose em equídeos de tração e avaliar possíveis fatores de risco para a ocorrência da Leishmaniose nesses animais. Sua participação consiste em responder o questionário. Possíveis riscos durante a pesquisa, mesmo que mínimos, como constrangimento, emocional ou psicológico, ou qualquer outro não previsto pelos pesquisadores podem ocorrer. Almejando-se acelerar o processo de coleta de dados optou-se por excluir a participação de menores de idade. Tal exclusão não trará prejuízos significativos, tendo em vista que o número de indivíduos menores de idade nessa situação é extremamente reduzido.

A colaboração nesse estudo é voluntária e se você decidir não participar ou se quiser desistir de continuar em qualquer momento do estudo, tem absoluta liberdade de fazê-lo. Os dados coletados serão publicados de modo a não identificar os participantes; a coleta dos dados terá início somente após a aprovação pelo Comitê de Ética na Pesquisa da UFRRJ. Apesar de não ter benefícios diretos em participar da pesquisa, indiretamente você estará contribuindo para a compreensão do fenômeno estudado e melhorias em sua aplicação na Saúde Pública. Você não terá nenhum tipo de despesa por participar deste estudo, bem como não receberá nenhum tipo de pagamento por sua participação. Dúvidas em relação à pesquisa poderão ser esclarecidas pelo email do pesquisador(a) responsável (isabeleangelo@yahoo.com.br).

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre em participar da pesquisa.

Eu, _____,
portador do RG nº _____, declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, na pesquisa intitulada “Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose em equídeos de tração do Distrito Federal, Brasil.”. Autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Voluntário

Local e data

**ANEXO B QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO
SEMIESTRUTURADO**

QUESTIONÁRIO (Nº _____)

- 1) Nome completo do Proprietário

- 2) Endereço/telefone _____
- 3) Tipo de residência do proprietário () madeirite () alvenaria () outros.
Qual _____
- 4) () Zona rural () Zona urbana
- 5) Escolaridade: () nunca frequentou escola () ensino fundamental incompleto ()
ensino fundamental completo () ensino médio incompleto () ensino médio
completo () ensino superior incompleto () ensino superior completo
- 6) Trabalha em: () carroça () atividade agrícola () comércio () outros

- 7) Vai à mata? () Não () Sim. Quantas vezes por semana e em qual
horário? _____
- 8) Nome do animal _____
- 9) Endereço de onde o animal vive/coordenadas _____
- 10) Animal dorme:
() ao lado da casa, a mais de 200 metros
() ao lado da casa, a menos de 200 metros
() em outro local, com outros animais, currais comunitários.
() em baia individual, na propriedade, a menos de 200 metros
() em baia individual, na propriedade, a mais de 200 metros
- 11) O local aonde vive o animal é próximo à área de mata?
() não
() sim, a menos de 200 metros
() sim, a mais de 200 metros
- 12) Próximo ao local onde vive o animal, há presença de animais silvestres?
() não
() sim, a menos de 200 metros. Qual(is) animal (is)? _____
() sim, a mais de 200 metros. Qual(is) animal (is)? _____
- 13) Possui outros animais que convivem próximo ao seu?
() equídeos () bovinos () cães () gatos () galinhas () outros:

- 14) Aplica algum produto químico no animal?
() não () sim, qual? _____. Qual a frequência _____
- 15) Chama o Veterinário quando?
() nunca
() somente quando o animal está doente
() somente para vacinar o animal
() como rotina

- 16) O animal freqüenta ambientes de mata ou locais onde haja acúmulo de matéria orgânica, com presença de insetos?
 não
 sim. Com que freqüência: diária(), semanal (), mensal()
- 17) Utiliza algum método de reduzir insetos no local aonde vive o animal?
 não
 sim, qual? inseticida, vassoura de fogo, remoção mecânica (vassoura e água).
- 18) Há alguma pessoa em casa com lesões de pele?
 não
 sim. Local:_____.
 Aspecto:_____
- 19) Há algum animal em casa com feridas que não cicatrizam?
 não
 sim, cão. Local da lesão:_____Aspecto:_____
- sim, equídeo. Local da lesão:_____Aspecto:_____
- sim, gato. Local da lesão:_____ Aspecto:_____
- 20) Já ouviu falar em Leishmaniose?
 não
 sim e sabe como pega
 sim, mas não sabe como pega
- 21) Alguém ou algum animal da casa já foi diagnosticado com Leishmaniose?
 não
 sim. Quem:_____

Dados do Animal

- 1) Sexo: Macho Fêmea Raça: _____ Cor: _____
- 2) Animal nascido na propriedade? sim não Não Sabe. Se sim, de onde veio o animal? _____
- 3) Há quanto tempo está com o animal? _____
- 4) O animal já esteve fora do DF? sim não Não Sabe Se sim, aonde _____
- 5) Escore: caquético magro normal obeso
- 6) Idade: <6 meses 6 meses a 2 anos 2 a 5 anos 5 a 10 anos > 10 anos
- 7) Mucosa ocular: hipocorada normocorada ictérica congesta
- 8) Mucosa oral: hipocorada normocorada ictérica congesta
- 9) Distúrbios atuais de coagulação na pele: petéquias equimoses outros: _____

10) Locais de acesso do animal: () pastagens () córregos () matas ()
ambiente urbano

11) Dermatopatias? () não () sim.

Local: _____ Aspecto: _____

ANEXO C. CURRAL COMUNITÁRIO DA REGIÃO ADMINISTRATIVA DO GUARÁ, DISTRITO FEDERAL, COM ÊNFASE NA RESIDÊNCIA DE TUTORES DE EQUÍDEOS E ACÚMULO DE LIXO.



ANEXO D. CURRAL COMUNITÁRIO DA REGIÃO ADMINISTRATIVA DO RECANTO DAS EMAS, DISTRITO FEDERAL COM ÊNFASE NA SUA LOCALIZAÇÃO A MENOS DE 200 METROS DE REGIÃO DE MATA E GRANDE QUANTIDADE DE ACÚMULO DE LIXO.

