

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Gabriela de Freitas Daudt

**ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp. EM EQUINOS DE ÁREAS DO RIO
GRANDE DO SUL COM DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS
QUANTO À TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Santa Maria, RS
2023

Gabriela de Freitas Daudt

ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp. EM EQUINOS DE ÁREAS DO RIO GRANDE DO SUL COM DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS QUANTO À TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Fernanda Silveira Flôres Vogel

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Daudt, Gabriela de Freitas
ANTICORPOS ANTI-Leishmania spp. EM EQUINOS DE ÁREAS
DO RIO GRANDE DO SUL COM DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES
EPIDEMIOLÓGICAS QUANTO À TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE
VISCERAL / Gabriela de Freitas Daudt.- 2023.
41 p.; 30 cm

Orientadora: Fernanda Silveira Flôres Vogel
Coorientadora: Juliana Felipetto Cargnelutti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2023

1. Leishmania spp. 2. Anticorpos 3. Equinos 4. Rio
Grande do Sul I. Silveira Flôres Vogel, Fernanda II.
Felipetto Cargnelutti, Juliana III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, GABRIELA DE FREITAS DAUDT, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Gabriela de Freitas Daudt

**ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp. EM EQUINOS DE ÁREAS DO RIO
GRANDE DO SUL COM DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS
QUANTO À TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL**

Aprovada em 28 de fevereiro de 2023.

Fernanda Silveira Flôres Vogel, Dra. (UFSM)

Luis Antonio Sangioni, Dr. (UFSM)

Thirssa Helena Grando, Dra. (IFFar)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família, pelo apoio, suporte e incentivo que foram essenciais durante essa trajetória.

À professora Fernanda Silveira Flôres Vogel, pela oportunidade e por toda a orientação. Também à professora Juliana Felipetto Cargnelutti por todo o carinho e contribuições.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) e do Laboratório de Bacteriologia (LABAC), pela parceria, colaboração e troca de experiências.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária, por me possibilitarem chegar até aqui.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro à pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução do trabalho e conclusão dessa etapa!

Muito obrigada!

RESUMO

ANTICORPOS ANTI-*Leishmania* spp. EM EQUINOS DE ÁREAS DO RIO GRANDE DO SUL COM DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS QUANTO À TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE VISCERAL

AUTORA: Gabriela de Freitas Daudt
ORIENTADORA: Fernanda Silveira Flôres Vogel

Os protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos da leishmaniose, mantidos em reservatórios silvestres e urbanos. A importância do estudo da leishmaniose em equinos está relacionada ao fato desses animais, assim como os cães, estarem em contato direto com os humanos e, em alguns casos, poderem desenvolver a doença clínica. Considerando a escassez de dados quanto à detecção de *Leishmania* spp. em equinos na região Sul do Brasil e os estudos sugerindo a participação da espécie no ciclo epidemiológico da doença, o objetivo dessa dissertação foi investigar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em amostras de soro de equinos provenientes de áreas com diferentes classificações epidemiológicas quanto a ocorrência de leishmaniose visceral (LV) no Rio Grande do Sul. Para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp., amostras de soro de 436 cavalos foram submetidas à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) na diluição de 1:40 e utilizando formas promastigotas de uma cepa padrão de *Leishmania infantum* como antígeno. As amostras foram classificadas de acordo com a origem (áreas de transmissão de LV ou áreas silenciosas) e local de criação dos cavalos (área urbana ou campo). Anticorpos anti-*Leishmania* spp. foram detectados em 9,17% das amostras. A maior frequência de detecção ocorreu nos animais das áreas de transmissão de LV (29,41%), seguido pelos animais de áreas silenciosas, onde não há transmissão comprovada da doença (6,49%). As frequências de detecção de anticorpos em equinos de tração e de campo foram de 9,46% e 8,8%, respectivamente. Esses resultados mostram que *Leishmania* spp. está circulando no Rio Grande do Sul, tanto em áreas com transmissão, quanto em áreas consideradas silenciosas. O estudo também sugere que os equinos possam atuar como reservatórios, apesar de ainda serem necessários mais estudos investigando a patogênese, a epidemiologia da infecção por *L. infantum* na espécie e o seu papel na transmissão do protozoário entre humanos e animais.

Palavras-chave: Sorologia. *Leishmania* spp. Cavalos. Leishmaniose visceral. Frequência de detecção.

ABSTRACT

ANTIBODIES ANTI-*Leishmania* spp. IN HORSES FROM AREAS WITH VARIED VISCERAL LEISHMANIASIS TRANSMISSION STATUS IN RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: Gabriela de Freitas Daudt
ADVISOR: Fernanda Silveira Flôres Vogel

Protozoans of the *Leishmania* genus are the etiological agent of leishmaniasis that are maintained in wild and urban reservoirs. The importance of studying leishmaniasis in horses is due to their closely contact with humans, as dogs, and to being able to develop clinical disease. Considering that the data on *Leishmania* spp. detection in horses in the South Brazil is limited and the studies suggesting that horses participate in the leishmaniasis epidemiology, this dissertation aimed to investigate the presence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in serum samples of horses from areas with different occurrence of visceral leishmaniasis (VL) transmission. Serum samples of 436 horses were diluted (1:40) and tested by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) for antibodies against *Leishmania* spp. using a *Leishmania infantum* strain as antigen. Samples were classified according to the origin (visceral leishmaniasis transmission or silent areas) and housing type and purpose of the horses (traction or farming). Antibodies anti-*Leishmania* spp. were detected in 9,17% of the samples. The highest detection frequency was reported in animals from transmission areas (29.41%), followed by the silent areas (6.49%). The frequency of antibodies detection was 9,46% and 8,8%, to traction and to farming horses, respectively. These results revealed that *Leishmania* spp. is circulating in both evaluated regions. It also suggests that horses may act as reservoirs, but further studies are required to clarify the pathogenesis and epidemiology of *Leishmania* spp. infection in horses and their role in spreading leishmaniasis between humans and animals.

Keywords: Serology. *Leishmania* spp. Horses. Visceral leishmaniasis. Frequency of detection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Classificação taxonômica do gênero <i>Leishmania</i>	12
FIGURA 2 – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	14
TABELA 1 – Detection frequency of antibodies anti-leishmania spp. by indirect fluorescent antibodies test (IFAT) in serum samples of horses from two regions, with different occurrence of visceral leishmaniasis transmission, classified as traction and farming horses according to their housing type and purpose.....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 PROTOZOÁRIO LEISHMANIA E A LEISHMANIOSE.....	11
2.2 CICLO BIOLÓGICO.....	13
2.3 HOSPEDEIROS E RESERVATÓRIOS.....	14
2.4 INFECÇÃO EM EQUINOS.....	16
2.4.1 Diagnóstico	18
2.5 LEISHMANIOSE VISCERAL NO RIO GRANDE DO SUL.....	19
3 CAPÍTULO 1 - Anti-<i>Leishmania</i> spp. antibodies in horses from visceral leishmaniasis silent and transmission areas	22
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma enfermidade infecciosa de caráter agudo ou crônico, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, apresentando uma forma promastigota no tubo digestivo do inseto vetor e outra amastigota nos tecidos dos vertebrados (BRASIL, 2014).

Tem distribuição mundial e compreende uma importante zoonose, mantida em reservatórios silvestres e urbanos. No Brasil, a transmissão do protozoário ocorre por meio da picada de flebotomíneos conhecidos como mosquitos-palha, do gênero *Lutzomyia*, em especial *Lutzomyia longipalpis*, sendo que a doença pode apresentar-se clinicamente sob as formas cutânea, mucocutânea e visceral, que, humanos, é potencialmente fatal se não tratada (WHO, 2010; MAROLI et al., 2013).

Além de acometer os humanos, a leishmaniose visceral também afeta mamíferos domésticos. Cães infectados são os principais reservatórios em áreas urbanas, sendo que a infecção nesses animais é mais prevalente e a enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos (LIMEIRA et al., 2019; BRASIL, 2014). Estudos vêm sendo desenvolvidos para identificar outras espécies de animais que possam participar do ciclo do protozoário, das quais destacam-se os equinos.

Segundo Limeira *et al.* (2019), a importância do estudo da leishmaniose em equinos está relacionada ao fato desses animais, assim como os cães, estarem em contato direto com os humanos, podendo desenvolver a doença clínica. Vários estudos realizados no Brasil e em outros países mostram resultados positivos na pesquisa direta e indireta por *Leishmania* spp. em espécies de equinos (BENASSI et al., 2018; VEDOVELLO FILHO et al., 2008; GAO et al., 2015; KENUBIH et al., 2015; KOEHLER et al., 2002; LOPES et al., 2013; MUKHTAR et al. 2000; ROHOUSOVA et al., 2015; TRUPPEL et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2017; EVERS et al., 2017; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006; KOUAM et al., 2010; FEITOSA et al., 2012; SGORBINI et al., 2014).

A presença dos equinos em áreas peridomiciliares associada à de cães, aumenta o risco de transmissão do protozoário por serem atrativos ao vetor e contribuírem para sua manutenção como fonte de alimento (XIMENES et al. 1999; OLIVEIRA et al., 2012). Após as primeiras evidências de equinos infectados por

Leishmania spp. em 1927, na Argentina, autores vêm sugerindo que cavalos, burros e mulas possam atuar como hospedeiros acidentais ou mesmo reservatórios de *Leishmania* spp., desempenhando um papel importante na epidemiologia da leishmaniose. As manifestações clínicas dos equinos infectados são lesões cutâneas, contudo, relatos como o de Benassi et al. (2018), identificaram equinos positivos para *Leishmania* spp. de forma assintomática.

Considerando a escassez de dados quanto à detecção direta e indireta de *Leishmania* spp. em equinos no Rio Grande do Sul, que são usualmente restritas a áreas endêmicas para leishmaniose visceral (LV), a patogenicidade da enfermidade e os estudos que sugerem a participação dessas espécies no ciclo epidemiológico da doença, torna-se importante o levantamento de dados referentes ao contato de equinos com o agente, principalmente em áreas de transição epidemiológica ou onde a transmissão da doença está em expansão. Assim, o objetivo dessa dissertação foi investigar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em amostras de soro de equinos de áreas silenciosas e de transmissão de LV no Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTOZOÁRIO LEISHMANIA E A LEISHMANIOSE

Em meados do século 19, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna identificaram de forma independente o protozoário causador da leishmaniose, que foi nomeado genericamente de leishmania por Ronald Ross (WHO, 2010). Essa doença é uma zoonose de grande importância para a saúde pública, com crescente número de casos em humanos e animais, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, incluindo América Central, do Norte e do Sul, bacia do Mediterrâneo, sudeste da Europa, Oriente Médio, Centro e Sudeste da Ásia, Índia, África e Austrália (AKHOUNDI et al., 2016; BIRAL et al., 2021).

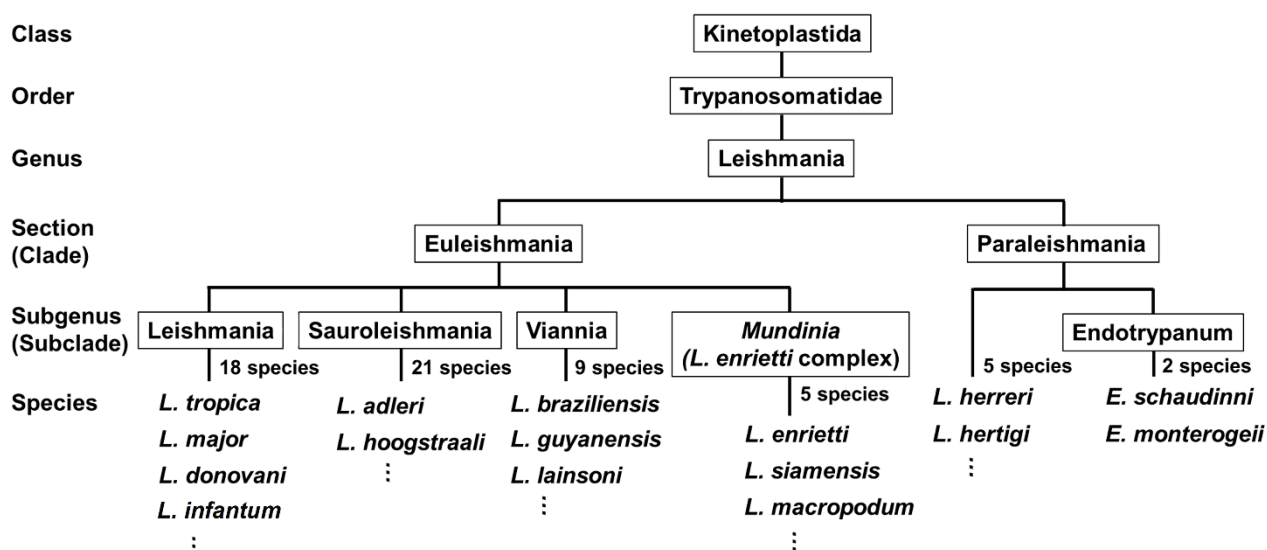
Quanto à classificação do agente *Leishmania*, apesar da divisão em subgêneros e agrupamentos de espécies definidos como “complexos” por Lainson e Shaw ter ganhado ampla aceitação, existem discordâncias quanto as composições dos grupos e, mesmo com a introdução de métodos moleculares, ainda não foi possível classificar todas as espécies descritas (AKHOUNDI et al., 2016). A classificação mais atual, que propõe a divisão do gênero *Leishmania* em quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia*. Ainda, espécies que não se encaixam em nenhum desses grupos, ficaram classificadas como *Paraleishmania* (AKHOUNDI et al., 2016; ESPINOSA et al., 2016).

A classificação em *Leishmania* e *Viannia* se dá pelo padrão de desenvolvimento do protozoário no intestino do inseto vetor. O subgênero *Viannia* está restrito ao Novo Mundo, enquanto *Leishmania* ocorre no Novo e no Velho Mundo (AKHOUNDI et al., 2016). Inicialmente, as espécies eram classificadas de acordo com características geográficas, biológicas e clínicas. Contudo, a partir da década de 70, critérios imunológicos, bioquímicos e genéticos passaram a ser utilizados para determinação das espécies, levando a um esquema taxonômico desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde em 1990 (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007).

Os novos métodos de detecção, isolamento e identificação molecular resultaram em um grande aumento no número de espécies descritas, como é indicado na figura 2. Atualmente, existem 53 espécies reconhecidas, 29 no Velho Mundo, 20 no Novo Mundo, sendo três comuns em ambos (*L. siamensis*, *L. martiniquensis*, e *L.*

infantum) e uma espécie reconhecida na Austrália (*L. australiensis*) (AKHOUNDI et al., 2016). Dessas, cerca de 20 espécies são conhecidas por serem patogênicas para humanos e animais (DANTAS-TORRES, 2007).

Figura 1 – Classificação taxonômica do gênero *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Klatt et al. (2019).

As infecções por *Leishmania* spp. em humanos apresentam basicamente três formas clínicas, de acordo com a localização do parasito nos tecidos: leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea. A LV é uma doença geralmente crônica, grave, potencialmente fatal se não tratada. A leishmaniose cutânea se caracteriza por lesões dermatológicas localizadas e geralmente autolimitantes, enquanto a mucocutânea inicialmente apresenta lesões na pele que posteriormente invadem as mucosas (WHO, 2010). No Brasil, as principais espécies do gênero *Leishmania* causadoras das formas cutânea e mucocutânea são *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, enquanto o agente da leishmaniose visceral é *L. infantum* (WHO, 2010; ANVERSA et al., 2018)

Em humanos a apresentação mais comum é a forma cutânea, sendo que a maioria dos casos ocorre em países das Américas, na bacia do Mediterrâneo e no oeste de Ásia, principalmente no Afeganistão, Irã, Arábia Saudita, Síria, Argélia, Tunísia, Brasil, Colômbia, Costa Rica e Peru. Quanto à leishmaniose visceral, mais

de 90% dos relatos concentram-se em sete países: Bangladesh, Índia, Nepal, Etiópia, Quênia, Sudão e Brasil (ALVAR et al., 2012).

Essa classificação da leishmaniose em visceral e cutânea, observada em humanos, não é constatada na infecção em outros mamíferos. Cães infectados com *L. infantum* apresentam manifestações viscerais e cutâneas (ROQUE; JANSEN, 2014). A leishmaniose canina é uma doença sistêmica, geralmente de caráter crônico, que pode causar: anemia, linfadenomegalia generalizada, hepatoesplenomegalia, perda de peso, lesões cutâneas, renais, oftálmicas, digestivas, locomotoras e neurológicas (MARCONDES; ROSSI, 2013).

Na leishmaniose canina, inicialmente, os parasitos estão presentes no local da picada e, posteriormente, ocorre a infecção de vísceras e distribuição através da derme, sendo que o aparecimento das manifestações clínicas vai depender da imunocompetência do organismo. Quando há evolução aguda e grave do quadro, o animal pode vir a óbito em poucas semanas. Em alguns cães, a doença pode permanecer latente, sendo que, no Brasil, a forma assintomática da doença representa 40 a 60% de uma população soropositiva (BRASIL, 2014).

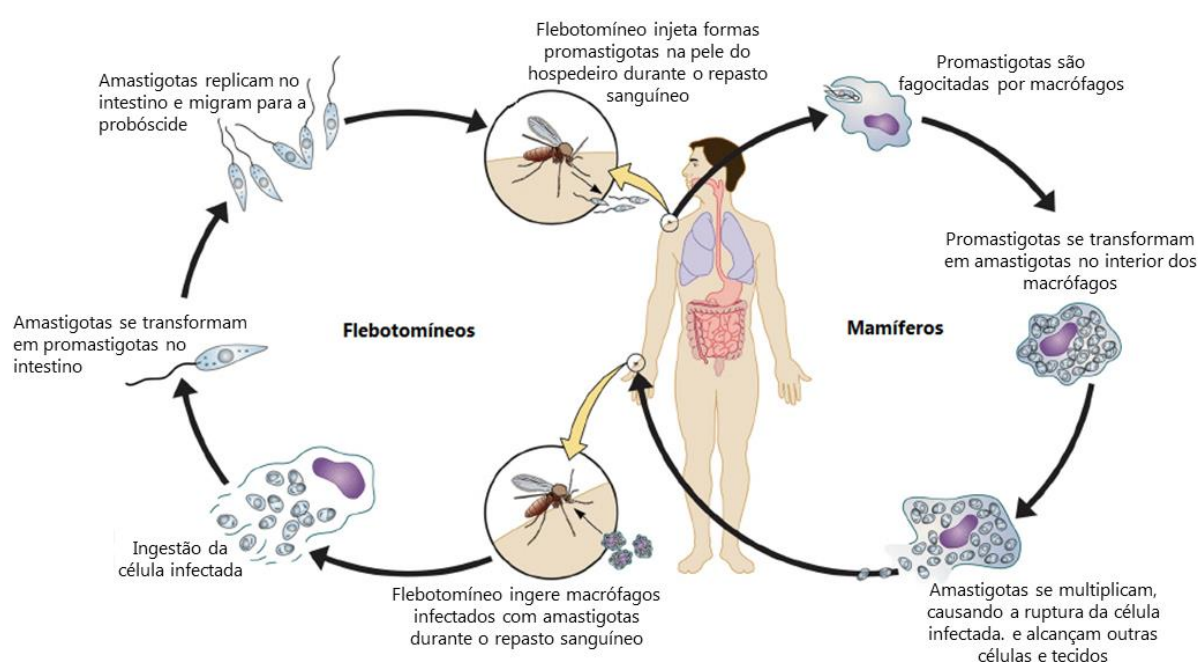
2.2 CICLO BIOLÓGICO

Durante o ciclo, que é demonstrado na figura 2, os protozoários do gênero *Leishmania* passam por dois estágios: uma fase extracelular no hospedeiro invertebrado e uma fase intracelular em um hospedeiro vertebrado (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007). Os hospedeiros invertebrados ou vetores são pequenos insetos da subfamília *Phlebotominae*, especialmente os dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (MAROLI et al., 2013).

As fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas, necessitando do sangue para o desenvolvimento dos ovos. Dentro do vetor, o protozoário assume a forma promastigota, que é extracelular, alongada e móvel, com um flagelo livre. As formas promastigotas se multiplicam no intestino da fêmea do flebotomíneo e migram para a porção anterior, onde se transformam em formas promastigotas metacíclicas (forma infecciosa não replicativa), que penetram a pele do hospedeiro vertebrado pela probóscide do inseto durante o repasto sanguíneo.

Nos hospedeiros vertebrados, que são mamíferos em geral, o protozoário é fagocitado por macrófagos, permanecendo em vacúolos parasitóforos em sua forma amastigota, que é ovalada e não possui flagelo (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007). As formas amastigotas replicam ativamente por fissão binária no interior dos macrófagos, levando à ruptura celular, infecção de novas células fagocíticas e expansão para outros tecidos (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007).

Figura 2 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Esch e Petersen (2013).

2.3 HOSPEDEIROS E RESERVATÓRIOS

As espécies do gênero *Leishmania* são parasitos muito eficazes e capazes de provocar infecções naturais em diferentes ordens de mamíferos. A capacidade que os hospedeiros mamíferos têm de manter esse protozoário depende de diversos fatores como a densidade e longevidade da população, a duração da infecção, localização dos protozoários dentro do hospedeiro e o seu estado imunológico. O termo reservatório deve ser restrito às espécies que conseguem fazer a manutenção, amplificação e disseminação do agente a partir do vetor (DANTAS-TORRES, 2007).

Os seres humanos costumam ser hospedeiros acidentais de *Leishmania* spp. Dentre os carnívoros, cães e gatos estão intimamente relacionados aos humanos. Os cães são importantes reservatórios urbanos de *L. infantum* na América do Sul, apesar de poderem ser infectados por outras espécies do gênero (DANTAS-TORRES, 2009). A importância dos felinos domésticos na epidemiologia da leishmaniose também vem sendo discutida (PENNISI et al., 2013).

No Brasil, o cão doméstico é considerado o principal reservatório urbano de *L. infantum* devido à alta suscetibilidade à infecção, ao parasitismo pelo vetor frequentemente observado e, principalmente, devido à sua proximidade com o homem, tanto em áreas rurais quanto urbanas. Assim, a presença de cães soropositivos em habitações humanas é vista como fator de risco para infecção por *L. infantum*, principalmente considerando que a enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos (DANTAS-TORRES, 2007; BRASIL, 2014). Em ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2014).

A importância do cão na epidemiologia da doença não se dá apenas pela alta prevalência de infecção, mas também pelo elevado número de animais assintomáticos, que pode chegar a 80% da população infectada (DANTAS-TORRES, 2007; MARCONDES; ROSSI, 2013). Esses animais assintomáticos são altamente competentes para estabelecer infecção em flebotomíneos e, muitas vezes, não são detectados pela ausência de sinais clínicos ou pelos falsos-negativos em exames sorológicos, demonstrando papel importante na manutenção do ciclo epidemiológico da doença (MARCONDES; ROSSI, 2013; LAURENTI et al., 2013).

Em gatos, ocorrem casos esporádicos da doença, normalmente em áreas onde há cães e humanos afetados, ou em gatos provenientes dessas áreas. A leishmaniose felina por *L. infantum* vem sendo registrada nos últimos 20 anos no Brasil e na Europa, sendo que as lesões de pele são a manifestação clínica mais frequente, e, por vezes, o único achado nos animais. Aumento dos linfonodos, perda de peso, comprometimento ocular, estomatites e letargia são as manifestações não cutâneas mais comuns (PENNISI et al., 2013). Contudo, a importância epidemiológica dos gatos no ciclo da leishmaniose ainda não foi totalmente elucidada, assim como a de outros animais nos quais o protozoário já foi detectado, como os equinos (DANTAS-TORRES; BRANDÃO FILHO, 2006).

Ainda, o papel de outras espécies domésticas, como aves e equinos, no ciclo urbano da leishmaniose visceral vem sendo discutido. Sabe-se que a galinha doméstica é uma espécie muito atrativa para os flebotomíneos e para alguns carnívoros silvestres, como *C. thous*, podendo favorecer a presença de vetores e reservatórios conhecidos de *L. infantum* nos ambientes domésticos (DANTAS TORRES; BRANDÃO FILHO, 2006). Assim como as galinhas e os cães, os equinos são parasitados pelos vetores da leishmaniose e estão em contato direto com os humanos em áreas urbanas, periurbanas e rurais, além de haverem registros de doença clínica nesses animais (LIMEIRA et al., 2019).

Quanto às espécies do gênero *Leishmania* causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA), os cães não atuam como principais reservatórios, exceto pela *Leishmania peruviana*. Para *L. braziliensis*, é mais provável que atuem como hospedeiros acidentais, exceto em foco domiciliares e peridomésticos, onde animais domésticos e sinantrópicos aumentam o risco de transmissão (DANTAS-TORRES, 2007).

Como o ciclo de transmissão da LTA é primariamente rural e normalmente associado ao acesso de pessoas em áreas florestadas, é provável que os mamíferos silvestres sejam os reservatórios naturais de *L. braziliensis* (DANTAS-TORRES, 2007). Já foram registrados como hospedeiros e potenciais reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados, quirópteros e canídeos silvestres. São numerosos os registros de infecção em animais domésticos, entretanto, não há evidências científicas que comprovem o papel destes animais como reservatórios (BRASIL, 2017).

2.4 INFECÇÃO EM EQUINOS

O primeiro registro de um equino infectado por *Leishmania* spp. ocorreu em 1927, na Argentina. O animal apresentava lesões cutâneas ulceradas e oculares. Outros casos similares foram relatados no Brasil e na Venezuela e diagnosticados como leishmaniose cutânea, com a identificação de *L. braziliensis* por caracterização bioquímica (RAMOS-VARA et al., 1996).

Outros casos de leishmaniose equina passaram a ser descritos, também em mulas e jumentos, principalmente em áreas endêmicas para leishmaniose canina e

humana na América do Sul. A partir da década de 90, o número de relatos aumentou tanto em áreas endêmicas quanto indenes, apesar de ainda representarem uma quantidade pequena de casos quando comparado à outras espécies como cães e gatos (GAZZONIS et al., 2020).

Várias espécies do gênero *Leishmania* podem atuar como agentes etiológicos da leishmaniose equina. Nos relatos em que foi possível realizar a identificação, as principais espécies envolvidas foram *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. siamensis* (LIMEIRA et al., 2019). Os casos clínicos em equinos, independentemente da espécie de *Leishmania* envolvida, estão associados com manifestações cutâneas caracterizadas por nódulos ou pápulas, solitários ou múltiplos, com tendência ulcerativa. Normalmente localizam-se na cabeça ou nos membros e, esporadicamente, no pescoço, órgãos genitais, abdômen e tórax (GAZZONIS et al., 2020).

A lesões dérmicas costumam ter severidade moderada, com característica autolimitante, regredindo em alguns meses, o que vai de acordo como a proposição de que a resposta imune dos equídeos contra o parasito é efetiva (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006). Contudo, estudos como os de Benassi et al. (2018) descreveram a identificação de animais positivos para *Leishmania* sp. sem nenhuma alteração clínica.

Quanto ao vetor, pesquisadores concluíram que espécies de *Lutzomyia* também se alimentam em equinos (XIMENES et al. 1999; AFONSO et al. 2012; BARATA et al. 2005; MISSAWA et al. 2008). É possível que a atração se deva à grande extensão corporal desses animais, que permite uma maior área de alimentação, e à presença frequente de cavalos nas proximidades das zonas domésticas. Embora os equinos ainda não sejam considerados reservatórios, sua presença em áreas peridomiciliares associada à de cães, aumenta o risco de transmissão do protozoário por serem atrativos ao vetor e contribuírem para sua manutenção como fonte de alimento. Outro ponto importante é que o vetor utiliza acúmulo de matéria orgânica, como fezes animais volumosas, para abrigarem-se (XIMENES et al. 1999; OLIVEIRA et al., 2012).

Desde o primeiro relato na Argentina, estudos vem levantando a possibilidade do que equídeos possam ser hospedeiros acidentais ou reservatórios de *Leishmania* spp., participando de alguma forma do ciclo da leishmaniose em ambientes

peridomiciliares, principalmente devido à presença de equinos infectados em áreas endêmicas para leishmaniose humana ou canina. Para confirmar se esses animais realmente podem atuar como reservatórios, é necessário realizar estudos de infectividade e xenodiagnóstico (TRUPPEL et al., 2014).

2.4.1 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose normalmente é realizado por meio do sangue periférico ou por biópsias de lesões de pele, linfonodos ou outro tecido infectado. Como os sinais clínicos em equinos são muito semelhantes aos de outras doenças, como sarcóide, carcinoma de células escamosas, pitiose e habronemose, é recomendada a confirmação diagnóstica através da detecção das formas amastigotas nas lesões pela observação microscópica, todavia ainda existem poucos casos em que foi possível o isolamento do protozoário de lesões de equinos infectados (LIMEIRA et al., 2019; MHADHBI; SASSI, 2020).

Segundo o Ministério da Saúde (2014), as provas sorológicas são alternativas de diagnóstico laboratorial da leishmaniose. Para inquéritos em saúde pública têm sido realizadas as técnicas de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), que detectam os níveis de anticorpos circulantes. Apesar da RIFI poder apresentar reação cruzada, principalmente entre *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp., a técnica tem sido amplamente utilizada. No caso da *Leishmania* spp., a amostra é considerada sororreagente quando for positiva em diluição de 1:40 ou superior.

Métodos moleculares, como a PCR, seguida ou não por análise de sequenciamento, são aplicados para confirmação diagnóstica e identificação da espécie de *Leishmania* infectante, ainda que a obtenção de um resultado de PCR negativo devido à baixa carga parasitária não possa descartar a presença de infecção. Discordâncias entre os resultados dos diferentes testes em casos clínicos e subclínicos podem ser observados em alguns estudos (VEDOVELLO FILHO et al., 2008; KENUBIH et al., 2015; MHADHBI; SASSI, 2020; MUKHTAR et al., 2000).

A presença de anticorpos indica contato prévio com o parasito, enquanto que a detecção do DNA confirma que o parasito está circulando no hospedeiro. A sorologia positiva associada ao PCR negativo acontece em casos em que o equídeo foi exposto

previamente à *Leishmania* spp., ou a infecção está em fase crônica e não há protozoário circulante. Entretanto, a PCR positiva e sorologia negativa, provavelmente são obtidas em infecções agudas, visto que a análise é de IgG, ou quando o animal tem alguma deficiência imunológica. (TRUPPEL et al., 2014).

Estudos realizados no Brasil e em outros países mostram resultados positivos na pesquisa direta e indireta por *Leishmania* spp. em espécies de equinos (BENASSI et al., 2018; VEDOVELLO FILHO et al., 2008; GAO et al., 2015; KENUBIH et al., 2015; KOEHLER et al., 2002; LOPES et al., 2013; MUKHTAR et al. 2000; ROHOUSOVA et al., 2015; TRUPPEL et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2017; EVERS et al., 2017; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2006; KOUAM et al., 2010; FEITOSA et al., 2012; SGORBINI et al., 2014). Os resultados do estudo de Fernández-Bellon *et al.* (2006) indicam que equinos podem sofrer exposição ao parasito e desenvolver resposta imune contra protozoários do gênero *Leishmania* sem apresentar manifestações clínicas, sendo que a dificuldade em detectar anticorpos nos testes sorológicos sugerem que a resposta humoral específica contra o protozoário é inconsistente.

Contudo, Solano-Gallego *et al.* (2003) e Rolão *et al.* (2005), detectaram IgG em cavalos com diagnóstico de leishmaniose e, ainda que os resultados da resposta humoral e celular obtidos variem, os níveis de atividade imunológica variados indicam que em áreas de transmissão os equinos também são expostos ao protozoário. Além disso, animais podem permanecer infectados por longos períodos antes de apresentarem sorologia positiva e a remissão espontânea pode ocorrer, dificultando a detecção de anticorpos específicos (LOPES et al., 2016).

Benassi *et al.* (2018) realizaram diagnóstico molecular e sorológico em quarenta equinos sem nenhuma manifestação clínica indicativa de leishmaniose e obtiveram 100% de amostras de sangue positivas para PCR, porém apenas 2,5% apresentaram sorologia positiva. Além disso, os estudos de soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. no Brasil e no mundo demonstram diferentes resultados, que variam entre 0,3% (KOUAM et al., 2010) e 40,43% (SOARES et al., 2013), sendo a maioria realizada em áreas endêmicas para a leishmaniose canina.

2.5 LEISHMANIOSE VISCERAL NO RIO GRANDE DO SUL

A detecção de espécies de alta patogenicidade para humanos, como *L. infantum*, em equinos é preocupante, visto que os vetores de leishmaniose os utilizam como fonte de repasto sanguíneo, ainda que não haja comprovação da infecção de flebotomíneos a partir desses animais (LIMEIRA et al., 2019). No continente americano, a leishmaniose visceral compreende a forma mais severa da doença e é potencialmente fatal se não tratada. A espécie causadora, *L. infantum*, é transmitida, principalmente, por *L. longipalpis*.

No Brasil, até 1980, era restrita às áreas rurais do Nordeste, e então passou a se expandir para outras regiões, incluindo as periferias de centros urbanos (CRUZ et al., 2021; GONTIJO; MELO, 2004a). Entre 1980 e 1990, a doença tornou-se endêmica nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste (PASQUALI et al., 2019). A região Sul permaneceu livre até 2008, quando foi registrado o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina e identificado pela primeira vez o vetor *L. longipalpis* (DA SILVA et al. 2011; SOUZA et al., 2009). No ano seguinte, ocorreu o primeiro caso de leishmaniose visceral humana, registrado em São Borja, no interior do Rio Grande do Sul (DEBONI et al. 2011). A partir de então, casos importados e autóctones vem sendo registrados pelo estado.

Atualmente, as localidades do estado são classificadas pelo Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) quanto ao risco de ocorrência e transmissão da doença em cães e humanos. São consideradas áreas de transmissão (canina e/ou humana) onde já foram registrados casos autóctones, ou seja, onde a transmissão já foi comprovada. As áreas silenciosas são aquelas onde não há registro de casos autóctones. Ainda existem as áreas vulneráveis, em que não há casos autóctones, mas que são municípios contíguos aos municípios com casos de leishmaniose visceral, que possuem fluxo migratório intenso ou que fazem parte de um mesmo eixo viário dos municípios com casos da doença, e as áreas receptivas, onde, a partir de inquéritos epidemiológicos, verificou-se a presença de *L. longipalpis* ou *L. cruzi* (BRASIL, 2014).

Considerando o número de registros de detecção de *Leishmania* spp. em equinos pelo mundo e os estudos sugerindo a participação desses animais no ciclo epidemiológico da leishmaniose, torna-se necessário o levantamento de dados referentes à exposição dos equinos ao protozoário, principalmente em áreas onde a transmissão da doença está em expansão. Neste contexto, essa dissertação,

apresentada na forma de um artigo científico, teve como objetivo investigar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em amostras de soro de equinos de áreas classificadas como silenciosas e de áreas de transmissão de leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul.

3 CAPÍTULO 1

Anti-*Leishmania* spp. antibodies in horses from visceral leishmaniasis silent and transmission areas

Gabriela de Freitas Daudt¹, Gabriela Tormes Nunes², Isac Junior Roman³, Irina Lübeck⁴, Carlos Eduardo Wayne Nogueira³, Rafaela Pinto de Souza³, Juliana Felipetto Cargnelutti⁴, Luis Antonio Sangioni⁴, Fernanda Silveira Flôres Vogel⁴

Gabriela de Freitas Daudt¹, Gabriela Tormes Nunes¹, Isac Junior Roman¹, Irina Lübeck², Carlos Eduardo Wayne Nogueira³, Rafaela Pinto de Souza³, Juliana Felipetto Cargnelutti⁴, Luis Antonio Sangioni⁴, Fernanda Silveira Flôres Vogel⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. gdfdautd@gmail.com; gabrielatormesn@gmail.com; conceptosvet@gmail.com

²Universidade Federal do Pampa, BR 472, Km 585, Uruguaiana, RS, 97501-970, Brazil. ilubeck@gmail.com

³Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, 96001-970, Brazil. cewnogueira@gmail.com; rafa._souza@hotmail.com

⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. juliana.cargnelutti@ufsm.br; lasangioni@gmail.com; fernanda.vogel@ufsm.br

(Manuscrito submetido à revista *Acta Parasitologica* no formato de artigo científico em 07/2022)

Authors' contribution

Conceptualization: Gabriela de Freitas Daudt, Isac Junior Roman, Juliana Felipetto Cargnelutti, Luis Antonio Sangioni, Fernanda Silveira Flôres Vogel; Data curation: Gabriela de Freitas Daudt, Gabriela Tormes Nunes, Irina Lübeck, Carlos Eduardo Wayne Nogueira, Rafaela Pinto de Souza. Formal analysis and investigation: Gabriela de Freitas Daudt, Isac Junior Roman, Fernanda Silveira Flôres Vogel, Luis Antonio Sangioni, Juliana Felipetto Cargnelutti; Methodology: Gabriela de Freitas Daudt, Gabriela Tormes Nunes, Irina Lübeck, Rafaela Pinto de Souza; Writing - original draft preparation: Gabriela de Freitas Daudt, Isac Junior Roman, Fernanda Silveira Flôres Vogel; Writing - review and editing: Gabriela de Freitas Daudt, Gabriela Tormes Nunes, Irina Lübeck, Carlos Eduardo Wayne Nogueira, Rafaela Pinto de Souza, Isac Junior, Juliana Felipetto Cargnelutti, Luis Antonio Sangioni, Fernanda Silveira Flôres Vogel; Resources: Carlos Eduardo Wayne Nogueira, Fernanda Silveira Flôres Vogel; Supervision: Fernanda Silveira Flôres Vogel.

Acknowledgment

We thank the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) and to “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) for the research fellowships provided.

Abstract

Purpose

Considering that the data on *Leishmania* spp. detection in horses in the South Brazil region is limited, we aimed to investigate the presence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in serum samples of horses from areas with different occurrence of visceral leishmaniasis transmission.

Methods

Serum samples of 436 horses were tested by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) for antibodies against *Leishmania* spp. The horses originated from areas where visceral leishmaniasis transmission was proven (transmission areas) and from areas in that the transmission was not established (silent areas).

Results

Antibodies anti-*Leishmania* spp. were detected in 9,17% of the samples. The highest detection frequency was reported in animals from the visceral leishmaniasis transmission area (29.41%), followed by the silent areas (6.49%). In traction horses a higher frequency of antibodies was detected (9.46%) comparing to farming horses (8.8%).

Conclusion

The results of this study revealed that *Leishmania* spp. is circulating in both evaluated regions, areas where the visceral leishmaniasis transmission is established and areas where it is not. It also suggests that horses are reservoirs and may act as sentinels. Further studies are required to clarify the pathogenesis and epidemiology of *Leishmania* spp. infection in horses and their role in spreading leishmaniasis between humans and animals.

Key words: antibody detection, equine, leishmania, epidemiology

Introduction

Leishmaniasis is an important zoonotic and chronic disease widely distributed. It is caused by intracellular protozoans of the *Leishmania* genus transmitted to hosts through the bite of phlebotomine vectors. Three main forms of the disease affect humans and domestic mammals: visceral, cutaneous, and mucocutaneous [30]. In the Americas, visceral leishmaniasis is the most severe form that can be potentially fatal if left untreated. This form is caused by *Leishmania infantum* and is transmitted by *Lutzomyia longipalpis* [17, 8].

In Brazil, visceral leishmaniasis was restricted to Northeast rural areas until 1980, when it expanded to other regions, including the peripheries of urban centers [8]. Between the 1980s and 1990s, the disease became endemic in the North, Southeast, and Central-West [23]. It reached the Southern region in 2008 when the first autochthonous case of canine visceral leishmaniasis was reported [28] and the vector *L. longipalpis* was detected for the first time [27]. The following year, the first case of the disease in humans was recorded in São Borja, a city in Rio Grande do Sul state [9].

This protozoan is maintained in wild and urban reservoirs. Foxes and marsupials are well-known wild hosts, whereas dogs are the main urban reservoir of canine leishmaniasis, playing a vital role as domestic hosts and presenting clinical signs of the disease [17]. Nevertheless, Limeira *et al.* [18] suggested that horses can also be infected with *Leishmania* spp., develop the disease, and act as reservoirs, mainly for being in close contact with dogs and humans. That horses could be *Leishmania* spp. reservoirs has been supported by studies reporting the detection of *Leishmania* spp. DNA in horse blood and tissue samples using PCR [3, 11, 15, 24, 26, 29]. Furthermore, anti-*Leishmania* spp. antibodies were detected in horse serum samples using serological analysis [3, 4, 13 – 16, 19, 21, 22, 25, 26, 29].

Studies investigating the direct and indirect detection of *Leishmania* spp. in horses in Brazil are scarce. Previous studies have suggested that horses could play a role in *Leishmania* spp. epidemiology. To better understand horses as potential reservoirs, it is important to study horse exposure, especially in areas with increased leishmaniasis occurrence. Thus, the objective of this study was to investigate the presence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in serum samples of horses from areas with different occurrence of visceral leishmaniasis transmission in Southern region of Brazil.

Material and methods

Samples

Serum samples of horses coming from municipalities located in different regions of Rio Grande do Sul state were analyzed in a search for anti-*Leishmania* spp. antibodies. The studied regions are classified according to the occurrence of visceral leishmaniasis transmission by “Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul” (personal communication). Visceral leishmaniasis transmission areas are the those that transmission was proven and is established and in silent areas transmission was not proven. Among the 436 samples, 51 were from a visceral leishmaniasis transmission area and 385 from a silent area. The samples were obtained from the bank of serum of the Parasitic Diseases Laboratory (Universidade Federal de Santa Maria) and ClinEq (Universidade Federal de Pelotas).

The samples were grouped into two categories based in the housing type of horses and their purpose: “traction” refers to working or transport horses from urban

areas (n=243) and “farming” refers to breeding or working horses from rural areas (n=193).

Antibodies detection

Anti-*Leishmania* spp. antibodies were detected using an *Indirect Fluorescent Antibody Test* (IFAT). Immunofluorescence slides were sensitized with *L. infantum* [strain *IOC/L2906 (MHOM/BR/2002/LPC-RPV)*]. The sera samples were diluted at 1:40 in phosphate-buffered saline (PBS). Following dilution, samples were added to the slides and incubated in a humid chamber at 37 °C for 50 min. Commercial fluorescein-labeled anti-horse IgG diluted 1:100 in PBS was added to the slides as the secondary antibody, and the slides were incubated for the second time in humid chamber at 37 °C for 50 min. Fluorescence was evaluated using a dark-field microscope (Optiphase INV403F) at 400× magnification. Positively tested and non-reactive horse serum samples were added to each slide as positive and negative controls, respectively. Samples exhibiting fluorescence were considered positive.

Results

Among the 436 serum samples analyzed, 40 (9,17%) tested positive, indicating the presence of anti-*Leishmania* spp. antibodies. Animals from the visceral leishmaniasis transmission area had the highest frequency of antibodies comparing to the animals from the silent areas.

Screening the data regarding to the housing type and purposes of the horses suggested that antibodies frequency was higher in samples from traction than that from farming horses (Table 1). When we analyzed the results by housing type and purpose of the horses and their region, the detection frequency was highest in the visceral leishmaniasis transmission area, irrespective of the animal housing type and purpose. The detection frequency was highly similar between traction and farming horses in the silent area (Table 1).

Discussion

To investigate *Leishmania* spp. circulation in horses we used serology to test for anti-*Leishmania* spp. antibodies in serum samples of horses from two areas with different occurrence of visceral leishmaniasis transmission. The sera were tested at a

1:40 dilution, which is considered a suitable cut-off titer for serological diagnosis of *Leishmania* spp. by IFAT and suggested as resulting in specific responses in serum samples from horses [3, 16, 18, 26].

Since Feitosa et al. [12] reported a seroprevalence of 14.59% in horses from an endemic canine visceral leishmaniasis area in São Paulo state using ELISA, serological studies have been conducted in Brazilian regions assessing the exposure of horses to *Leishmania* spp. The antibody frequency detected in the present study (9.17%) was lower than that reported by Ferreira et al. [14] in Maranhão (13%), Truppel et al. [29] in Paraná (11%), Oliveira et al. [22] in Minas Gerais (22.7%), and Biral et al. [4] in Distrito Federal (47.93%). However, it was higher than that observed by Benassi et al. [3] for São Paulo (2.5%). Notably, these studies were performed using different inclusion criteria and varying sample sizes. Different horse populations vary in terms of risk factors that impact the risk of infection by *Leishmania* spp. Thus, comparing these data might not be appropriate.

The frequency of horses infected with *Leishmania* spp. in the studied populations may have been higher because the search for protozoan DNA in blood samples by PCR was not performed in this study. Truppel et al. [29] and Benassi et al. [3] detected a higher number of animals that tested positive for *Leishmania* spp. by PCR than by serological assays. According to these authors, this difference could be related to the infection phase, the presence of the protozoan in blood circulation, and the immune status of the animals. For example, Fernández-Bellon et al. [13] discussed the difficulty of detecting anti-*Leishmania* spp. antibodies in horses. They suggested that horses develop a weakly specific humoral response against the protozoan, prolonging their infection period without seroconversion or that antibodies concentrations remain below the detection threshold of the tests.

Concerning the housing type and purpose of the animals, a higher antibody detection frequency was observed in samples of traction (9,46%) than in farming horses (8,8%). Despite this variation, this data demonstrates the circulation of the protozoan in both urban and rural areas. Biral et al. [4] detected a seroprevalence of 47.93% in traction horses from Distrito Federal and suggested that animals living in urban areas have a higher probability of being exposed to an infected vector. Carvalho et al. [5] suggested that proximity to horses increases the risk of dogs getting infected with *Leishmania* spp. The opposite might also occur, as indicated by Biral et al. [4].

Despite not evaluating traction equines from urban areas, Gazzonis et al. [16] and Lopes et al. [19] observed a higher seroprevalence in equines used for recreational purposes than horses used for farming or sport. These authors did not directly relate the purpose and management of the animals to the spread of infection. They did, however, suggest that the places where horses are housed and the epidemiological conditions in those places may have influenced the number of infected animals. Notably, traction horses evaluated in the present study were animals living in peripheral neighborhoods, thus the environmental conditions, including the presence of open-air garbage dumps and stray dogs, may have favored the spread of infection.

The antibody detection frequency varied among the evaluated regions, being higher in the visceral leishmaniasis transmission area. It was classified like that by “Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul” (personal communication) because in this region, autochthonous cases have been reported in humans and dogs, proving and establishing the occurrence of visceral leishmaniasis transmission [6, 7, 10]. These cases may be related to a significant spread of the agent and may explain the higher detection rate in this area compared to that in the other. In Italy, Gazzonis et al. [16] tested horses from two areas for antibodies against anti-*Leishmania* spp. The total detection rate was 13.9%; however, in the region with the highest canine visceral leishmaniasis prevalence, the seroprevalence in horses was higher (15.3%) than in the region with the lowest occurrence (12.2%). However, this difference was not statistically significant. The authors suggest that variation in seroprevalence in horses between Italian regions is related to infection pressure and human and dog leishmaniasis occurrence in each area.

The antibody frequency obtained in samples of horses from the municipality of Santa Maria, included in the visceral leishmaniasis transmission area, was higher than the seroprevalence of dogs in the same municipality (unpublished work). Considering that visceral leishmaniasis cases in humans are preceded by canine cases [5], it is acceptable to suggest that horses, similar to dogs, may act as sentinels to indicate protozoan circulation. An aspect contrasting this possibility is that *Leishmania* spp. infection in horses is subclinical; therefore, serological or molecular techniques are required to identify the agent using antibodies or DNA detection. Furthermore, the results indicated the presence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in horses from regions not considered as transmission visceral leishmaniasis areas. We could provide

evidence of previous exposure to the agent and highlight the fact that we observed seropositive horses in these regions, with limited or no records of leishmaniasis cases in humans or dogs.

The results of the present study indicate that horses exposed to the vector can be infected by *Leishmania* spp. This is supported by studies that have reported that phlebotomines [1, 2, 20], *L. longipalpis* specifically [31] use horses as a blood source. The authors suggest that the attraction is due to the large size of horses and carbon dioxide exposure. Therefore, the presence of horses in residential neighborhoods may increase the risk of protozoan transmission by attracting the vector and contributing to vector maintenance as a food source.

Conclusion

In this study, we used serology to establish that horses living in areas with different occurrence of visceral leishmaniasis transmission in Southern region of Brazil, both transmission and silent areas, are exposed to *Leishmania* spp. Thus, the results of this study highlight the importance of horses as *Leishmania* spp. hosts (and potential reservoirs) owing to: (i) natural susceptibility of these animals to infection, (ii) vector feeding habits, and (iii) proximity of horses to dogs and humans. Furthermore, horses may act as sentinels to indicate protozoan circulation.

Declarations

Funding

No funding was received for conducting this study. “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) - Financial Code 001, which provided a fellowship to the first author, Gabriela de Freitas Daudt. Isac Junior Roman e Fernanda Silveira Flôres Vogel received fellowships from “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq).

Competing interests

The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Ethics approval

No approval of research ethics committees was required to accomplish the goals of this study because experimental work was conducted with laboratories stocked samples from diagnosis routine.

Consent

Not applicable

Data/Code Availability

Not applicable

References

1. Afonso MMDS, Duarte R, Miranda JC et al (2012) Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Journal of Tropical Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2012/858657>
2. Barata RA, França-Silva JC, Mayrink W et al (2005) Aspects of the ecology and behavior of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38(5):421-425. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822005000500012>
3. Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL et al (2018) Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 38:1058–1063. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5214>
4. Biral NV, Azevedo HS, Senne NA et al (2021) A cross-sectional study of *Leishmania* spp. in draft horses from the Distrito Federal, Brazil: Seroprevalence, spatial distribution, and associated factors. *Preventive Veterinary Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105467>
5. Carvalho AG, Luz JGG, Rodrigues LD et al (2019) Factors associated with *Leishmania* spp. infection in domestic dogs from an emerging area of high endemicity for visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil. *Research in Veterinary Science* 125:205–211. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.06.013>

6. CEVS-SES/RS (2022) Casos autóctones confirmados de leishmaniose visceral humana entre 2008 e 2021. <https://www.cevs.rs.gov.br/lvh-situacao-epidemiologica-dados>. Accessed 12 June 2022
7. da Silva AS, França RT, Richini-Pereira VB et al (2011) First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in the center of Rio Grande do Sul State, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae* 39(2):968.
8. Cruz CSS, Soeiro Barbosa D, Oliveira VC, et al (2021) Factors associated with human visceral leishmaniasis cases during urban epidemics in Brazil: A systematic review. *Parasitology* 148:639–647. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000019>
9. Deboni SC, Barbosa M, Ramos RR (2011) Vigilância epidemiológica de casos humanos. *Boletim epidemiológico: Leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul* 13(1):1-3. <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/27124724-n-1-marco.pdf>. Accessed 25 June 2022
10. Dias TP, Versteg N, Jardim GC et al (2022) Visceral leishmaniasis in southern Brazil: critical analysis of epidemiological evolution. *Research, Society and Development*. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28361>
11. Escobar TA, Dowich G, dos Santos TP et al (2019) Assessment of *Leishmania infantum* infection in equine populations in a canine visceral leishmaniosis transmission area. *BMC Veterinary Research*. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2108-1>
12. Feitosa FLF, Leal J, Mendes LCN et al (2012) A seroepidemiological study of leishmaniasis in horses in the region from Araçatuba-SP, Brazil, an endemic area for visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 49(6):500-502. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v49i6p500-502>
13. Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Bardagí M, et al (2006) Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Veterinary Parasitology* 135:181–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.007>
14. Ferreira FP, Caldart ET, Brito DRB et al (2018) “Baixadeiros” horses: Prevalence of anti-*Trypanosoma* spp. and anti-*Leishmania* spp. Antibodies. *Ciencia Animal Brasileira*. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v19e-51522>
15. Filho DV, Jorge FA, Lonardoni MVC et al (2008) American cutaneous leishmaniasis in horses from endemic areas in the north-central Mesoregion of Paraná state,

- Brazil. *Zoonoses and Public Health* 55:149–155. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01106.x>
16. Gazzonis AL, Bertero F, Moretta I et al (2020) Detecting antibodies to *Leishmania infantum* in horses from areas with different epizooticity levels of canine leishmaniasis and a retrospective revision of Italian data. *Parasites and Vectors*. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04385-8>
 17. Gontijo CMF, Melo MN (2004) Visceral leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7:338–349. <https://doi.org/10.1590/s1415-790x2004000300011>
 18. Limeira CH, Alves CJ, de Azevedo SS et al (2019) Clinical aspects and diagnosis of leishmaniasis in equids: A systematic review and meta-analysis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 28:574–581. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019074>
 19. Lopes AP, Sousa S, Dubey JP et al (2013) Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii* in horses from the north of Portugal. *Parasites and Vectors*. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-178>
 20. Missawa NA, Lorosa ES, Dias ES (2008) Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42(4):365-368. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000400008>
 21. Mukhtar MM, Sharief AH, El Saffi SH et al (2000) Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: A preliminary report. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94(1):33-36. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90429-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90429-2)
 22. Oliveira PM, Garcia F, Evers F et al (2017) Seroepidemiology of *Leishmania* spp. in equids from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Ciencia Rural* 47(5):e20160697. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160697>
 23. Pasquali AKS, Baggio RA, Boeger WA et al (2019) Dispersion of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(8): e0007639. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007639>
 24. Pradella GD, Escobar TA, Duarte CA et al (2020) Identification of *Leishmania* spp. In horses and a dog from rural areas of Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

- Semina: Ciências Agrárias 41:2687–2693. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6p2687>
25. Sgorbini M, Bonelli F, Pizzolli I et al (2014) Seroprevalence of leishmania sp. infection in healthy horses housed in endemic areas in Tuscany. *Journal of Equine Veterinary Science* 34:572–574. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.09.009>
 26. Soares IR, Silva SO, Moreira FM et al (2013) 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* 197:665–669. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.014>
 27. Souza GD, Santos E, Filho JDA (2009) The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(8):1181-1182. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800017>
 28. Tartarotti AL, Donini MA, Anjos C, Ramos RR (2011) Vigilância em reservatórios caninos. *Boletim epidemiológico: Leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul* 13(1):3-6. <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/27124724-n-1-marco.pdf>. Accessed 25 June 2022
 29. Truppel JH, Otomura F, Teodoro U, et al (2014) Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? *PLoS ONE* 9(4): e93731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093731>
 30. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW (1998) *Parasitologia Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
 31. Ximenes MFFM, Souza MF, Castellón EG (1999) Density of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Domestic and Wild Animal Shelters in an Area of Visceral Leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94(4):427-432. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000400001>

Table 1 Detection frequency of antibodies anti-*Leishmania* spp. by indirect fluorescent antibodies test (IFAT) in serum samples of horses from two regions, with different occurrence of visceral leishmaniasis transmission, classified as traction and farming horses according to their housing type and purpose.

	Traction horses		Farming horses		Total	
	Positives	Negatives	Positives	Negatives	Positives	Negatives
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Visceral leishmaniasis	9/22	13/22	6/29	23/29	15/51	36/51
transmission area	(40,91)	(59,09)	(20,69)	(79,31)	(29,41%)	(70,59)
Silent area	14/221	207/221	11/164	153/164	25/385	360/385
	(6,33)	(93,66)	(6,71)	(93,29)	(6,49)	(93,50)
Total	23/243	220/243	17/193	176/193	40/436	396/436
	(9,46)	(90,53)	(8,80)	(91,19)	(9,17)	(90,82)

Abbreviation: n, number of samples

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo indicam que equinos expostos ao vetor *L. longipalpis* podem ser infetados por *Leishmania* spp. e demonstram a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. tanto em cavalos de áreas silenciosas quanto em cavalos de áreas de transmissão de leishmaniose visceral do Rio Grande do Sul. Ou seja, cavalos vivendo em áreas do Rio Grande do Sul com diferentes características epidemiológicas quanto à transmissão e ocorrência de leishmaniose visceral estão expostos a *Leishmania* spp. e apresentam anticorpos contra o agente. Esses dados fortalecem a ideia de que os equinos podem atuar como hospedeiros, e potenciais reservatórios, do protozoário devido à: i. sua susceptibilidade natural à infecção; ii. viverem em proximidade com cães e humanos e iii. atraírem e servirem de fonte alimentar para o vetor.

O estudo também indica a necessidade de investigações mais detalhadas envolvendo a patologia da doença nesses hospedeiros, principalmente quanto à ocorrência de lesões viscerais e impacto da resposta imune frente ao aparecimento de sinais clínicos, além de salientar a importância de estudos soropidemiológicos para monitorar e investigar a exposição dos equinos a *Leishmania* spp., especialmente em áreas endêmicas, visto que sua participação na transmissão ainda não é confirmada.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, Margarete Martins dos Santos *et al.* Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, jan. 2012.
- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**.v. 10, n. 3, mar. 2016.
- ALVAR, Jorge *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, mai. 2012.
- ANVERSA, Laís *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**. V. 64, n. 3, mar. 2018.
- BAÑULS, Anne-Laure; HIDE, Mallorie; PRUGNOLLE, Franck. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**. v. 64, p. 1-109. 2007.
- BARATA, Ricardo Andrade *et al.* Aspects of the ecology and behavior of phlebotomines in endemic area for visceral leishmaniasis in State of Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, n. 5, p. 421-425, out. 2005.
- BENASSI, Júlia *et al.* Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1058–1063, jun. 2018.
- BIRAL, Nádia Valesca *et al.* A cross-sectional study of *Leishmania* spp. in draft horses from the Distrito Federal, Brazil: Seroprevalence, spatial distribution, and associated factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 195, out. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. Ed., 5. Reimpr. Brasília: 2006. Ministério da Saúde. 2014. 120p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 2. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.189 p.
- CRUZ, Cleya da Silva Santana *et al.* Factors associated with human visceral leishmaniasis cases during urban epidemics in Brazil: A systematic review. **Parasitology**, v. 148, n. 6, mai. 2021.

DANTAS-TORRES, Filipe. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146. nov. 2007.

DANTAS-TORRES, Filipe. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. 1, mar. 2009.

DANTAS-TORRES, Filipe; BRANDÃO-FILHO, Sinval Pinto. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151-156, jun. 2006.

DA SILVA, Aleksandro Schafer *et al.* First Autochthonous Case of Canine Visceral Leishmaniasis in the Center of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 39, n. 2, case report 968. 2011.

DEBONI, Sandra Cristina; BARBOSA, Marília; RAMOS, Raquel Rocha. Leishmaniose visceral no Rio Grande do Sul. *Boletim Epidemiológico*, v. 13, n. 1, p. 1-3. mar. 2011. Disponível em: <<https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/27124724-n-1-marco.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2023.

DE OLIVEIRA, Patrícia Magalhães *et al.* Soroepidemiologia de leishmania spp. em equídeos de uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Ciencia Rural**, v. 47, n. 5, 2017.

ESCH, Kevin; PETERSEN, Christine. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n.1, p. 58–85, jan. 2013.

EVERS, Fernanda *et al.* Presence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in slaughter horses in Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 38, n. 6, p. 3921–3926, nov. 2017.

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

FERNÁNDEZ-BELLON, Hugo *et al.* Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 181–185, jan. 2006.

GAO, Chun-Hua *et al.* Survey of wild and domestic mammals for infection with *leishmania infantum* following an outbreak of desert zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, People's Republic of China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, jul. 2015.

GAZZONIS, Alessia Libera *et al.* Detecting antibodies to *Leishmania infantum* in horses from areas with different epizooticity levels of canine leishmaniosis and a retrospective revision of Italian data. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, dez. 2020.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, set. 2004a.

KENUBIH, Ambaye et al. Preliminary survey of domestic animal visceral leishmaniasis and risk factors in north-west Ethiopia. **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 2, p. 205–210, fev. 2015.

KLATT, Stephan et al. *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, jul. 2019.

KOEHLER, Kernt et al. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1-2, p. 9–17, 2002.

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

LAURENTI, Márcia Dalastra et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, set. 2013.

LIMEIRA, Célcio Henrique et al. Clinical aspects and diagnosis of leishmaniasis in equids: A systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 574–581, out. 2019.

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

LOPES, Eliane Gonçalves Paiva et al. Transmission of visceral leishmaniasis in dogs in a risk area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1403–1412, dez. 2016.

MARCONDES, Mary; ROSSI, Claudio Nazaretian. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341–352, 2013.

MAROLI, Michele et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, jun. 2013.

MHADHBI, Moez; SASSI, Atfa. Infection of the equine population by *Leishmania* parasites. **Equine Veterinary Journal**. v. 52, n. 1, p. 28–33, jan. 2020.

MISSAWA, Nanci Akemi; LOROSA, Elias Seixas; DIAS, Edelberto Santos. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of

visceral leishmaniasis in Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 365-368, ago. 2008.

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

OLIVEIRA, Everton Falcão de *et al.* Biotic factors and occurrence of *Lutzomyia longipalpis* in endemic area of visceral leishmaniasis, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 396-401, mai. 2012.

PASQUALI, Aline Kuhn Sbruzzi *et al.* Dispersion of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, 2019.

PENNISI, Maria Grazia *et al.* Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 638–642, jul. 2013.

RAMOS-VARA, Jose *et al.* Cutaneous leishmaniasis in two horses. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 6, p. 731–734, nov. 1996.

ROHOUSOVA, Iva *et al.* Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, jul. 2015.

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

ROQUE, André Luiz; JANSEN, Ana Maria. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, dez. 2014.

SGORBINI, Micaela *et al.* Seroprevalence of leishmania sp. infection in healthy horses housed in endemic areas in Tuscany. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 4, p. 572–574, 2014.

SOARES, Isabel *et al.* First evidence of autochthonous cases of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 665–669, out. 2013.

SOLANO-GALLEGO, Laia *et al.* Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 3, p. 320–323, mai. 2003.

SOUZA, Getúlio Dornelles *et al.* The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1181-1182. Dez. 2009.

TRUPPEL, Jessé Henrique *et al.* Can equids be a reservoir of *Leishmania braziliensis* in endemic areas? **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, abr. 2014.

VEDOVELLO FILHO, Dirceu *et al.* American cutaneous leishmaniasis in horses from endemic areas in the North-central mesoregion of Paraná State, Brazil. **Zoonoses and Public Health**. v. 55, n. 3. P. 149-155, abr. 2008.

XIMENES, Maria de Fátima Freire de Melo; SOUZA, Maria de Fátima; CASTELLÓN, Eloy Guillermo Density of sand flies (Diptera:Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, n. 4, p. 427–432, jul. 1999.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniases** – Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, Switzerland: WHO Press; (2010). Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf> Acesso em: 22 jan 2023.