

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

MAYARA BERTO MASSUDA

**Identificação e caracterização de tripanossomatídeos em ruminantes provenientes de
área endêmica para leishmanioses no estado de São Paulo**

São Paulo

2023

MAYARA BERTO MASSUDA

**Identificação e caracterização de tripanossomatídeos em ruminantes provenientes de
área endêmica para leishmanioses no estado de São Paulo**

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

Departamento: Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

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

De acordo:



Orientador

São Paulo

2023

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

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Massuda, Mayara
Identificação e caracterização de tripanossomatídeos em ruminantes
provenientes de área endêmica para leishmanioses no estado de São
Paulo / Mayara Massuda ; orientador Trícia Maria Ferreira de Sousa
Oliveira - versão corrigida.-- São Paulo, 2023.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia
Experimental e Aplicada às Zoonoses - Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde Animal) - Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Diagnóstico. 2. Tripanossomose. 3. Leishmaniose. 4.
Trypanosoma spp. 5. Ruminantes. I. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Identificação e caracterização de tripanossomatídeos em ruminantes provenientes de área endêmica para leishmanioses no estado de São Paulo", protocolada sob o CEUA nº 4516190320 (ID 008194), sob a responsabilidade de **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e equipe; Mayara Berto Massuda; João Augusto Franco Leonel** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 12/07/2020.

We certify that the proposal "Identification and characterization of trypanosomatids in ruminants f.r.o.m endemic area for leishmaniasis in the state of São Paulo", utilizing 185 Bovines (males and females), 62 Caprines (males and females), 100 Ovines (males and females), protocol number CEUA 4516190320 (ID 008194), under the responsibility of **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira and team; Mayara Berto Massuda; João Augusto Franco Leonel** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 07/12/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2020 a 12/2021** Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: Animais de proprietários				
Espécie: Bovinos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 0 a 120 meses	Quantidade: 185	
Linhagem: Mista		Peso: 25 a 1000 kg		
Origem: Animais de proprietários				
Espécie: Caprinos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 0 a 120 meses	Quantidade: 62	
Linhagem: Mista		Peso: 5 a 150 kg		
Origem: Animais de proprietários				
Espécie: Ovinos	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 0 a 120 meses	Quantidade: 100	
Linhagem: Mista		Peso: 5 a 150 kg		

São Paulo, 05 de junho de 2023

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo





CERTIFICADO : EMENDA v05/06/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 05/06/2023) da proposta intitulada "Identificação e caracterização de tripanossomatídeos em ruminantes provenientes de área endêmica para leishmanioses no estado de São Paulo", CEUA nº 4516190320 (ID 022402), sob a responsabilidade de *Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e equipe; João Augusto Franco Leonel; Mayara Berto Massuda* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) em 13/06/2023.

Término previsto: 06/2023

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Bovinos sexo: Machos e Fêmeas idade: 0 a 120 meses Quantidade solicitada: 74
Linagem: Mista Peso: 25 a 1000 kg

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Caprinos sexo: Machos e Fêmeas idade: 0 a 120 meses Quantidade solicitada: 26
Linagem: Mista Peso: 5 a 150 kg

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Ovinos sexo: Machos e Fêmeas idade: 0 a 120 meses Quantidade reduzida: 200
Linagem: Mista Peso: 5 a 150 kg

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Bovinos	Machos e Fêmeas	111	0
Caprinos	Machos e Fêmeas	36	0
Ovinos	Machos e Fêmeas	144	0

São Paulo, 13 de junho de 2023

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
da Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes Coordenador
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de
Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor (a): MASSUDA, Mayara Berto

Título: Identificação e caracterização de tripanossomatídeos em ruminantes provenientes de área endêmica para leishmanioses no estado de São Paulo

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu “companheirinho” inseparável de jornada desde o início do mestrado, Martin.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o apoio e torcida para que tudo desse certo nessa caminhada, em especial à minha mãe (Rosana) e minha tia (Rosângela) por cuidarem do meu bem mais precioso quando eu precisava me ausentar.

À minha irmã (Mayra) por ser inspiração e conselho.

Ao meu esposo (Kauê) pelo apoio e compreensão.

À minha amiga Bianca pelo apoio, escuta e conselho.

Aos meus queridos amigos Wellington Bessi e Gustavo Morandini pela ajuda nas coletas.

À minha orientadora Trícia por me nortear na execução de todo o projeto, pela paciência e confiança.

Aos queridos amigos que fiz no LMVPA por tornarem o dia a dia leve e divertido.

Aos queridos amigos Júlia, João, Nathalia, Maria Luana, Júlio e Diogo pela ajuda nas coletas e análises, jamais conseguirei expressar o tamanho da minha gratidão.

Aos queridos amigos Pedro, Jéssica, Artur e Gabriele pela ajuda nas coletas e análises e por proporcionarem momentos de boas risadas.

À amiga que fiz nos últimos meses de trabalho, Andreina, pela disposição, ajuda e incentivo.

À secretária do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Danival e Vanessa, por toda ajuda e pronto esclarecimento de dúvidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado.

Ao Professor Rafael Silvio Bonilha Pinheiro por disponibilizar pequenos ruminantes da UNESP de Ilha Solteira para fazerem parte deste projeto.

A DEUS, pela dádiva da vida todos os dias.

“É preciso uma aldeia inteira para educar uma criança.”

Provérbio Africano

RESUMO

MASSUDA, M. B. Identificação e caracterização de tripanossomatídeos em ruminantes provenientes de área endêmica para leishmanioses no estado de São Paulo. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

Os tripanossomatídeos são protozoários de grande importância para saúde pública, por causarem enfermidades como as leishmanioses e tripanossomoses no ser humano e em diferentes espécies animais. Com o objetivo de identificar a ocorrência de tripanossomatídeos em ruminantes de áreas endêmicas para leishmanioses do estado de São Paulo foram avaliados 111 bovinos, 122 ovinos e 36 caprinos nas cidades de Ilha Solteira, Andradina e Pirassununga. Os animais passaram por exames clínicos e amostras de sangue, suabe conjuntival e suabe oral foram coletadas e avaliadas por testes sorológicos, moleculares e parasitológicos. Pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), foram detectados anticorpos anti-*Leishmania* em 57,6% (64/111) dos bovinos, 24,6% (30/122) dos ovinos e 66,7% (24/36) dos caprinos, com títulos variando de 1:40 a 1:160 para bovinos e caprinos e de 1:40 a 1:640 em ovinos. No teste rápido de imunocromatografia para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma vivax*, dos 38 bovinos testados 58% (22/38) foram positivos, comprovando a exposição desses animais a esses tripanossomatídeos. Nas análises moleculares, pela Nested-PCR de ITS1, foi detectada a presença de DNA de tripanossomatídeos em 23,4% (26/111) das amostras de sangue e 19,8% (22/111) das amostras de suabe conjuntival de bovinos, 29,5% (36/122) das amostras de sangue, 14,7% (18/122) das amostras de suabe conjuntival e 12,3% (8/65) das amostras de suabe oral de ovinos e 27,8% (10/36) amostras de sangue e 5,5% (2/36) amostras de suabe conjuntival de caprinos. As amostras de sangue e suabe conjuntival de bovinos positivas na Nested-PCR de ITS1 foram testadas com a PCR tendo o kDNA de *Leishmania* spp. como alvo e foram negativas. Todas as 111 amostras de sangue bovino também foram testadas para *T. vivax* com primers específicos e foram negativas. O sequenciamento de amostras positivas pelo ITS1 das 3 espécies de ruminantes estudadas mostrou similaridade com DNA de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp., mas não foi possível avaliar a proximidade filogenética das amostras similares a *Leishmania* spp. devido à baixa qualidade do sequenciamento genético, de tal forma que outros alvos moleculares são necessários para elucidar corretamente a espécie infectante. Os ovinos e caprinos não apresentavam alterações clínicas no momento da coleta e foram

negativos na hemocultura e pesquisa de hemoparasitos. Para os bovinos nenhuma das amostras de sangue foi positiva por exames parasitológicos, mas em 9 amostras houve o crescimento de parasitos na hemocultura. Um total de 11 bovinos da cidade de Ilha Solteira-SP foram positivos na PCR com *primers* específicos para *Trypanosoma theileri* realizada em amostras de hemocultura e sangue (6 animais), apenas de hemocultura (3 animais) e apenas em amostras de sangue (2 animais), nenhum desses animais apresentava alterações clínicas ou hematológicas sugestivas da ocorrência de doença. Submetidos ao sequenciamento, a análise filogenética de 2 isolados demonstrou que estes pertencem à mesma linhagem de *T. theileri* – Tth1 já identificada em bovinos no Brasil, Equador, Estados Unidos, Sri-Lanka, Filipinas e Vietnã.

Palavras-chave: Diagnóstico. Tripanossomose. Leishmaniose. *Trypanosoma* spp. Ruminantes.

ABSTRACT

MASSUDA, M. B. Identification and characterization of tripanosomatides in ruminants from an endemic area of leishmaniasis in the state of São Paulo. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

Trypanosomatids are protozoa of great importance for public health, due to its role as causative agents of diseases such as leishmaniasis and trypanosomosis in humans and different animal species. With the purpose of identifying the occurrence of trypanosomatids in ruminants from endemic areas for leishmaniasis in the state of São Paulo, 111 cattle, 122 sheep and 36 goats were evaluated in the cities of Ilha Solteira, Andradina and Pirassununga. The animals have passed through clinical examinations and blood samples, conjunctival and oral swabs were collected and evaluated by serological, molecular and parasitological tests. Using the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), anti-*Leishmania* antibodies were detected in 57.6% (64/111) of cattle, 24.6% (30/122) of sheep and 66.7% (24/36) of goats, with titre varying from 1:40 to 1:160 for cattle and goats and from 1:40 to 1:640 in sheep. In the rapid immunochromatography test for detection of anti-*Trypanosoma vivax* antibodies, of the 38 cattle tested, 58% (22/38) were positive, proving the exposure of these animals to these trypanosomatids. In molecular analyses, using ITS1 Nested-PCR, the presence of trypanosomatid DNA was detected in 23.4% (26/111) of blood samples and 19.8% (22/111) of conjunctival swab samples from cattle, 29.5% (36/122) of blood samples, 14.7% (18/122) of conjunctival swab samples and 12.3% (8/65) of oral swab samples from sheep and 27.8% (10/36) blood samples and 5.5% (2/36) conjunctival swab samples from goats. Blood and conjunctival swab samples from bovines positive in ITS1 Nested-PCR were tested with PCR containing *Leishmania* spp. kDNA as a target and were negative. All 111 bovine blood samples were also tested for *T. vivax* with specific primers and were negative. Sequencing of ITS1 positive samples from the 3 ruminant species studied showed similarity with DNA from *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp., but it was not possible to evaluate the phylogenetic proximity of the samples that showed similarity with *Leishmania* spp. because of the low quality of genetic sequencing, thus other molecular targets are necessary to correctly elucidate the infectious species. The sheep and goats showed no clinical changes at the time of collection and were negative in blood culture and parasitological test. For cattle, no blood sample was positive by parasitological tests, but in 9 samples there was parasite growth in the blood culture.

A total of 11 cattle from the city of Ilha Solteira-SP were positive in PCR with specific primers for *Trypanosoma theileri* carried out on blood and blood culture samples (6 animals), only on blood cultures (3 animals) and only on blood samples (2 animals) these animals did not present clinical or hematological changes suggestive of disease occurrence. Submitted to sequencing, phylogenetic analysis of 2 isolates showed to belong to the same lineage of *T. theileri* – Tth1 already identified in cattle in Brazil, Ecuador, United States, Sri-Lanka, Philippines and Vietnam.

Key Words: Diagnosis. Trypanosomosis. Leishmaniasis. *Trypanosoma* spp. Ruminants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação dos tripanossomatídeos de acordo com seu estágio de desenvolvimento.....	26
Figura 2 – Representação do ciclo de transmissão da <i>Leishmania</i> spp.....	41
Figura 3 – Mapa com a localização das cidades de Ilha Solteira, Andradina e Pirassununga (Estado de São Paulo), onde o estudo foi realizado	46
Figura 4 – Microscopia óptica de lâminas de hemocultura positivas para a presença de formas flageladas sugestivas de tripanossomatídeos.....	56
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose para a Nested-PCR de ITS1 e PCR para pesquisa por DNA de <i>T. theileri</i> em amostras de isolado de cultivo celular.....	59
Figura 6 - Filograma com base no critério da Máxima Verossimilhança (MV) de sequências parciais do gene ITS1 de espécies <i>T. theileri</i> , incluindo os isolados detectados neste estudo (B33 e B38 grafados em vermelho).....	61
Figura 7 - Filograma com base no critério <i>Neighbor Joining</i> (NJ) de sequências parciais do gene cdCatL de espécies <i>T. theileri</i> , incluindo os isolados detectados neste estudo (B33 e B38 grafados em vermelho).....	62
Figura 8 – Diagrama com animais positivos em teste rápido de imunocromatografia para <i>T. vivax</i> e em Nested-PCR de ITS1.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Interpretação dos valores de coeficiente <i>kappa</i> (<i>k</i>) para testes diagnósticos.....	55
Tabela 2 – Descrição dos resultados de Sequenciamento de Sanger de amostras de DNA positivas na Nested-PCR de ITS1 e na PCR para <i>T. theileri</i>	60
Tabela 3 – Testes diagnósticos realizados para os 38 bovinos que tiveram seus soros testados pelo teste rápido de imunocromatografia para <i>T. vivax</i>	64
Tabela 4 – Comparação entre valores de hemograma dos grupos de bovinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1	66
Tabela 5 – Comparação entre valores de bioquímico dos grupos de bovinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1	67
Tabela 6 – Comparação entre valores de hemograma dos grupos de bovinos positivos e negativos na PCR para pesquisa de DNA de <i>T. theileri</i>	68
Tabela 7 – Comparação entre valores de bioquímico dos grupos de bovinos positivos e negativos na PCR para pesquisa de DNA de <i>T. theileri</i>	69
Tabela 8 – Comparação entre valores de hemograma dos grupos de ovinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1	71
Tabela 9 – Comparação entre valores de bioquímico dos grupos de ovinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1	72
Tabela 10 – Comparação entre valores de hemograma dos grupos de caprinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1	73
Tabela 11 – Comparação entre valores de bioquímico dos grupos de caprinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1.....	74
Tabela 12 – Resultados dos valores de coeficiente <i>kappa</i> (<i>k</i>) obtidos na comparação de diferentes testes diagnósticos em amostras de bovinos.....	75
Tabela 13 – Resultados dos valores de coeficiente <i>kappa</i> (<i>k</i>) obtidos na comparação de diferentes testes diagnósticos em amostras de ovinos.....	76
Tabela 14 – Resultados dos valores de coeficiente <i>kappa</i> (<i>k</i>) obtidos na comparação de diferentes testes diagnósticos em amostras de caprinos.....	76

LISTA DE QUADROSquadro

Quadro 1 – Divisão de tripanossomas por mecanismo de transmissão e doenças ocasionadas em animais e no homem.....	27
Quadro 2 – Principais vetores envolvidos na transmissão de tripanossomas em animais domésticos na América Latina.....	28
Quando 3 – Descrição de testes disponíveis para o diagnóstico de tripanossomoses em animais.....	33
Quadro 4 – Descrição de sinais característicos das diversas apresentações de leishmanioses tegumentar (cutânea, muco-cutânea ou mucosa) em humanos e principais espécies de <i>Leishmania</i> envolvidas.....	39
Quadro 5 – Descrição de alvos, sequência de <i>primers</i> , composição de mix, condições de termociclagem e referências utilizados na PCR de amostras clínicas de sangue e/ou isolado de bovinos.....	50

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- AST:** Aspartato Amino Transferase
- BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool
- BIC:** Critério de Informação Bayesian
- CATT:** Teste de Aglutinação em Cartão
- cdCATL1:** Domínio catalítico da enzima Cathepsina L-like
- CHCM:** Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
- CVE:** Centro de Vigilância Epidemiológica
- DNDi:** Drugs for Neglected Diseases Initiative
- EDTA:** Ácido Etilenodiaminotetracético
- ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- GAPDH:** Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- gGAPDH:** Glycosomal Glyceraldehyde Phospate Dehydrogenase
- GGT:** Gama Glutamil Transferase
- HAT:** Human African Trypanosomiasis
- HCM:** Hemoglobina Corpuscular Média
- HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana
- IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ISO:** Isolado
- ITS:** Internal Transcribed Spacer
- k:** Coeficiente kappa
- kDNA:** DNA do Kinetoplasto
- LC:** Leishmaniose Cutânea
- LCPC:** Leishmaniose cutânea pós calazar
- LMC:** Leishmaniose muco-cutânea
- LV:** Leishmaniose Visceral
- MAPA:** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MV:** Máxima Verossimilhança
- NJ:** Neighbor Joining
- OPAS:** Organização Pan-Americana da Saúde
- PCR:** Reação em Cadeia pela Polimerase

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

rK39: Antígeno Recombinante K39

SC: Suabe conjuntival

SG: Sangue

SNC: Sistema Nervoso Central

SO: Suabe Oral

VCM: Volume Corpuscular Médio

VSG: Glicoproteína Variante de Superfície

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO – TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	25
2.2 GÊNERO TRYPANOSOMA.....	26
2.2.1 <i>Trypanosoma vivax</i>	29
2.2.2 <i>Trypanosoma evansi</i>	30
2.2.3 <i>Trypanosoma equiperdum</i>	31
2.2.4 <i>Trypanosoma theileri</i>	31
2.2.5 <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
2.2.7 Tratamento e controle das tripanossomoses	36
2.3 GÊNERO LEISHMANIA	37
2.3.1 <i>Leishmania</i> spp. em ruminantes	41
2.3.2 Tratamento e controle das leishmanioses	43
3. OBJETIVOS	45
4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	46
4.1 REGIÃO ESTUDADA.....	46
4.2 AMOSTRAS	47
4.3. ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR	47
4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	48
4.4.1 Amostras clínicas – bovinos, ovinos e caprinos.....	48
4.4.2 Amostras de sangue bovino – outras análises	49
4.4.3 Amostras de isolados em cultivo celular.....	50
4.4.4 Sequenciamento	52
4.4.5 Filogenia	52
4.6 TESTE DE IMUNOCROMATOLOGRAFIA – <i>T. vivax</i>	54
5. RESULTADOS	566
5.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	566
5.2.1 Controle de extração de DNA – GAPDH	566
5.2.2 Nested-PCR de região ITS1 – bovinos.....	57
5.2.3 Nested-PCR de região ITS1 – ovinos.....	577

5.2.4 Nested-PCR de região ITS1 – caprinos	588
5.2.5 PCR de kDNA de amostras positivas na Nested-PCR de ITS1	588
5.2.6 PCR de amostras de sangue bovino para <i>Trypanosoma</i> spp.	588
5.2.7 PCR de isolados de sangue bovino	588
5.2.8 Sequenciamento genético	599
5.2.9 Filogenia	611
5.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	633
5.4 TESTE DE IMUNOCROMATOGRÁFIA – <i>T. vivax</i>	633
5.5 PARASITOLÓGICO.....	655
5.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA E HEMATOLÓGICA.....	655
5.6.1 Bovinos – Nested-PCR de ITS1	655
5.6.2 Bovinos – Positivos na PCR para <i>T. theileri</i>	677
5.6.3 Ovinos	70
5.6.4 Caprinos	722
5.7 COMPARAÇÃO ENTRE TESTES DIAGNÓSTICOS	744
6. DISCUSSÕES	77
6.1 IDENTIFICAÇÃO DE <i>T. theileri</i> EM AMOSTRAS DE BOVINOS	777
6.2 IDENTIFICAÇÃO DE TRIPANOSSOMATÍDEOS PELA NESTED-PCR DE ITS1 ..	799
6.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	811
6.4 TESTE DE IMUNOCROMATOGRÁFIA – <i>T. vivax</i>	83
6.5 HEMATOLOGIA.....	833
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	855
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	866

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A família Tripanossomatidae compreende diversos protozoários flagelados parasitos do ser humano, animais e de plantas, dentre os quais podem ser citados os do gênero *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. (BOUCINHA et al., 2022; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013).

Esses protozoários pertencem ao grupo dos cinetoplastídeos, pois possuem o cinetoplasto, uma região que contém DNA mitocondrial e cuja disposição dentro do parasita permite a distinção entre gênero e/ou espécie (STUART, 2008).

Os gêneros *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. assumem grande importância em saúde pública por serem os agentes etiológicos das tripanossomíases, tripanossomoses e leishmanioses em humanos e animais (DESQUESNES et al., 2022; KAUFER et al., 2017). São caracterizadas como “doenças negligenciadas” que ocorrem predominantemente em populações em situação de pobreza, de países tropicais e subtropicais, contribuindo para a manutenção de situações de desigualdade social e econômica (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2020).

No ser humano as espécies *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b.gambiense*) e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b. rhodesiense*) são, respectivamente, os agentes etiológicos da doença de Chagas nas Américas e da “Doença do Sono” ou Tripanosomose Humana Africana (Human African Trypanosomiasis – HAT). De acordo com dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2022), a doença de Chagas acomete aproximadamente 6 milhões de pessoas no continente americano, com uma incidência de 30 mil novos casos ao ano e uma média anual 14 mil mortes. De acordo com a Drugs for Neglected Diseases Initiative – DNDi (2020), para a HAT, estima-se que 8,5 milhões de pessoas vivam em áreas de risco, tendo sido reportados 796 casos em 2021 no continente africano (WHO, 2022).

Em animais de produção, especialmente os ruminantes, a tripanosomose ocasiona prejuízos econômicos, principalmente devido à redução na produção de carne e leite e na eficiência reprodutiva dos animais (BATISTA et al., 2017; CADIOLI et al., 2012; DESQUESNES, 2004).

Os ruminantes podem ser hospedeiros para diversas espécies de tripanossomatídeos, dentre os que pertencem ao gênero *Trypanosoma* spp. têm-se *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*), de distribuição em países africanos e da América do Sul, *Trypanosoma theileri* (*T. theileri*) com distribuição mundial, *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) na América do Sul, África, Ásia, Oriente

Médio e Europa e *Trypanosoma brucei brucei* (*T. b. brucei*) e *Trypanosoma congolense* (*T. congolense*) na África (BALDACCHINO et al., 2018; RODRÍGUEZ et al., 2012; SPICKLER, 2018)

São escassos os estudos que determinem taxas globais ou por países de animais acometidos pelas diferentes espécies de tripanossomas. Uma meta-análise realizada por Fetene et al. (2021) referenciou que no Brasil já foram detectados 4.079 animais positivos para *T. vivax*, que é mais patogênico para ruminantes, dentre 11.468 animais testados em estudos que incluíram bovinos, caprinos, ovinos, equinos e cervos.

Os surtos de infecção por *T. vivax* em bovinos são caracterizados por animais apresentando sinais clínicos e hematológicos de anemia, perda de peso, queda na produção leiteira, alterações neurológicas, podendo evoluir para óbito. Os prejuízos econômicos são grandes e causados pela perda produtiva e de animais e gastos com medicamentos e atendimento veterinário (CADIOLI et al., 2012; COSTA et al., 2020; DESQUESNES, 2004; SILVA et al., 2002).

A infecção por *T. theileri* é considerada inofensiva aos bovinos, sendo que os animais acometidos apresentam sinais clínicos em situações específicas, como em outras doenças concomitantes, situações de estresse e no puerpério e, apesar de já ser conhecida a ocorrência desse tripanossoma nos bovinos o diagnóstico nesses hospedeiros é um achado ocasional havendo poucos estudos epidemiológicos sobre sua ocorrência nesses ruminantes e com prevalências variando entre 8% e 30% no Brasil (DELL'PORTO et al., 1996; PACHECO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2003.)

Em relação as leishmanioses, o Brasil é o país com mais casos de leishmaniose visceral (LV), causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (*L. infantum*), dentre os países das Américas Central, do Sul e México, com 1.492 casos reportados em 2021, o que representou 93,5% dos casos dessa região (Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS, 2022). Além da forma visceral, a leishmaniose pode apresentar-se nas formas cutânea e/ou mucosa com lesões únicas e de cicatrização espontânea até lesões ulcerativas progressivas e desfigurantes (WHO, 2012).

Apesar do principal reservatório no ambiente urbano ser o cão (BRASIL, 2014), várias outras espécies de mamíferos domésticos, como felinos (ALVES-MARTIN et al., 2023; LEONEL et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2015), bovinos (PAIXÃO-MARQUES et al.; VIOTI et al., 2019) e equinos (SPADA, 2019) e animais silvestres como gambás (LEONEL, 2020;

SANTIAGO, et al., 2007), raposas e lobos (BRASIL, 2014; MILLÁN; FERROGLIO; SOLANO-GALLEGO, 2014), coelhos e lebres (BOURDEAU; ROWTON; PETERSEN, 2020) podem hospedar diferentes espécies de *Leishmania* (SOUZA et al., 2014).

Nos cães, a LV apresenta-se como uma doença sistêmica, sendo os sinais mais frequentes as lesões de pele, caracterizadas pelas dermatites, onicogribose e lesões mucocutâneas ulcerativas ou nodulares em mucosas, lesões oculares e sinais inespecíficos como linfadenomegalia e esplenomegalia, perda de peso e apetite, palidez de mucosas, febre, vômito e diarreia, letargia, poliúria e polidipsia, sendo a insuficiência renal devido a doença renal crônica a principal causa de óbito em cães (SOLLANO-GALLEGO et al., 2011).

Em gatos, a apresentação mais comum da LV, compreende as lesões de pele ulcerativas, crostosas, nodulares ou escamosas e, assim como nos cães, também estão presentes sinais inespecíficos (PENNISI et al., 2013).

Nos equinos, os sinais de infecção por *L. infantum*, quando presentes, estão relacionados a lesões de pele com padrões nodulares, papulares e ulcerativos (KOEHLER et al., 2002); SOLANO-GALLEGO et al., 2003; SOARES et al., 2013).

Em ruminantes, Lobsiger et al. (2010) descreveram, em um bovino na Suíça, lesões ulcerativas dispersas em face, membros e úbere, nas quais foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* spp. em exame histopatológico e imuno-histoquímico. Gao et al. (2015) identificaram bovinos, ovinos e caprinos positivos para *L. infantum* na região de um surto de LV em humanos ocorrida na China, sem relato de animais com sinais sugestivos da infecção e, no Brasil, Paixão Marques et al. (2019) detectaram a presença de DNA de *L. infantum* em amostras de cultura de sangue em um bovino na região de Bauru, São Paulo.

Embora a tripanossomose seja uma importante enfermidade que acomete ruminantes, existe pouca informação sobre o seu perfil epidemiológico nestas espécies no Brasil, além da escassez de métodos diagnósticos rápidos e sensíveis (FIDELIS JUNIOR, et al. 2019). O mesmo ocorre para a leishmaniose, que apesar de amplamente estudada no ser humano e no cão devido a sua importância em saúde pública, não possui sua dinâmica caracterizada nos ruminantes.

Desta forma, este trabalho permitiu a detecção e identificação de tripanossomatídeos dos gêneros *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. em bovinos, ovinos e caprinos de três regiões endêmicas para leishmanioses no Estado de São Paulo através de técnicas diagnósticas moleculares, parasitológicas e sorológicas realizadas nos laboratórios de Imunoparasitologia

(LIPAIS) da Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Ilha Solteira, e no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada (LMVPA), da Faculdade de Zootecnia de Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO – TRIPANOSSOMATÍDEOS

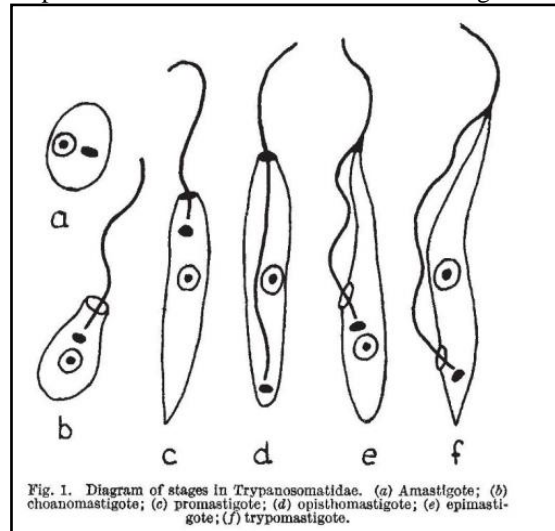
Os protozoários causadores das leishmanioses, tripanossomíases e tripanossomoses são parasitos flagelados de ciclo dixeno, com transmissão zoonótica ou antroponótica através de insetos hematófagos (KAUFER et al., 2017). Esses parasitos pertencem ao Reino Protista, Filo Sarcomastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae (SILVA et al., 2002; KAUFER et al., 2017; OLIVEIRA, 2020)

A principal característica da ordem dos cinetoplastídeos é a presença do cinetoplasto, uma estrutura na base do flagelo, que carrega DNA mitocondrial. A família dos tripanossomatídeos divide-se ainda em oito gêneros: *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Phytomonas* e *Endotrypanum* (SILVA et al., 2002).

Os tripanossomatídeos podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas nas diferentes fases de seu ciclo biológico e essa classificação é importante para compreender a dinâmica da infecção nos hospedeiros e identificação das espécies relacionadas (HORE e WALLACE, 1966; WHELEER, GLUENZ e GULL, 2013). Essa divisão é baseada nas características de posicionamento do flagelo no corpo do parasita (Figura 1): seu local de inserção/ início (indicado pela posição do cinetoplasto), seu percurso e ponto de emergência (HOARE e WALLACE, 1966). Sendo: a) amastigotas, formas arredondadas, desprovidas de flagelo livre e característica dos tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*; b) coanomastigota: corpo arredondado semelhante a um funil, o cinetoplasto posiciona-se anterior ao núcleo, o flagelo se origina próximo ao cinetoplasto e emerge pela porção anterior do corpo afunilado, característica do gênero *Crithidia*; c) promastigotas, com cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo se originando próximo ao cinetoplasto e emergindo próximo a extremidade anterior do seu corpo (extremidade pela qual se dá o sentido de locomoção do protozoário), forma característica do gênero *Leptomonas*; d) opistomastigota, com cinetoplasto posicionado posterior ao núcleo, flagelo com origem próxima ao cinetoplasto que percorre todo o corpo do parasita e emerge na sua porção anterior final característica do gênero *Herpetomonas*; e) epimastigota, com cinetoplasto e núcleo justos posicionados, flagelo originado próximo ao cinetoplasto, emergindo pelo lateral do corpo e percorrendo a membrana ondulante do parasita, com uma porção de flagelo livre de maior comprimento, característica dos gêneros *Blastocrithidia* e alguns estágios do *Trypanosoma*; f) tripomastigota, com cinetoplasto

posterior ao núcleo, flagelo originado próximo ao cinetoplasto, emergindo pela lateral do corpo e percorrendo a membrana ondulante do parasita, com um pequeno comprimento de flagelo livre, característica do gênero *Trypanosoma* e f) (HORE e WALLACE, 1966; SILVA et al., 2002).

Figura 1 – Classificação dos tripanossomatídeos de acordo com seu estágio de desenvolvimento



Fonte: Hore e Wallace (1966)

2.2 GÊNERO TRYPANOSOMA

Os protozoários do gênero *Trypanosoma* spp. são parasitos do sangue, tecidos, linfa e fluido cérebro espinhal de seus hospedeiros e, a depender de seu estágio evolutivo podem ser encontrados no interior das células (DESQUESNES, M., GONZATTI, M., SAZMAND, A. et al., 2022).

Dentre as espécies de interesse em medicina humana e veterinária na América Latina (Quadro 1) tem-se: *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas no homem e que pode ter como hospedeiros diversos mamíferos e animais selvagens, sendo patogênico para o ser humano e o cão e, apesar de não patogênico para os animais de produção, podem interferir no diagnóstico de outros tripanossomas em bovinos e equinos; *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), causador do “Mal das Cadeiras” em animais de produção, especialmente patogênico nos equinos; *Trypanosoma equiperdum* (*T. equiperdum*) causador da Durina ou “mal do coito” em equinos; *T. vivax*, descrito em diversos animais silvestres e de produção, porém importante principalmente em bovinos, ovinos, caprinos e búfalos devido a elevada patogenicidade e *Trypanosoma theileri* (*T. theileri*), que apesar de não patogênico para os animais domésticos,

devido a sua elevada prevalência, interfere no diagnóstico de outras espécies de tripanossomas patogênicos (DESQUESNES, 2004; DESQUESNES, GONZATTI, SAZMAND et al., 2022; OSÓRIO et al., 2008; ROVID, 2015a, 2015b; SILVA et al., 2002).

Quadro 1 – Divisão de tripanossomas por mecanismo de transmissão e doenças ocasionadas em animais e no homem

Classificação	Espécie	Patogênico para	Doença
Seção <i>Salivaria</i> Transmissão por inoculação (saliva do vetor)	<i>T. vivax</i>	Bovinos ^{1,2} , Ovinos ¹ , Caprinos ¹ , Equídeos ¹ , Camelídeos ¹ , Bubalinos ² , Capivaras ² , Veado-de-cauda-branda ²	Nagana ¹ (tripanossomose animal africana) Tripanossomose ² (América Latina)
	<i>T. congolense</i> <i>T. brucei brucei</i> <i>T. simiae</i>	Bovinos, Ovinos, Caprinos, Bufálos	Nagana (tripanossomose animal africana)
	<i>T. brucei gambiense</i> <i>T. brucei rhodesiense</i>	Ser humano	Doença do sono (tripanossomíase humana africana)
	<i>T. evansi</i>	Camelídeos, equídeos	Surra/ Murina/ “Mal das cadeiras”
	<i>T. equiperdum</i>	Cavalos	Durina/ “Mal do coito”
Seção <i>Stercoraria</i> Transmissão por contaminação (fezes do vetor)	<i>T. cruzi</i>	Ser humano, cão	doença de Chagas (tripanossomíase americana)
	<i>T. theileri</i>	-	Bovinos (interferência no diagnóstico de outras tripanossomoses)

Fonte: Elaborado pela autora

Existem diversos vetores hematófagos que atuam na transmissão de tripanossomas, desde morcegos a insetos, muitos com sua dinâmica e papel de atuação pouco compreendidos. Os principais insetos hematófagos vetores de tripanossomas em animais domésticos (Quadro 2) são os da subfamília Stomoxyinae (gêneros *Stomoxys* e *Haematobia*) e das famílias Hippoboscidae, Tabanidae, Culicidae, Phlebotomidae, Ceratopogonidae e Simuliidae (BALDACCHINO et al., 2014; BROTKÁNKOVÁ et al., 2022; DESQUESNES, 2004).

Quadro 2 – Principais vetores envolvidos na transmissão de tripanossomas em animais domésticos na América Latina

Vetor	Tripanossoma associado	Características de transmissão
<i>Stomoxys</i> spp.	<i>T. vivax</i> <i>T. evansi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • “Mosca dos estábulos” • Transmissão mecânica: machos e fêmeas hematófagos transitam entre hospedeiros durante a alimentação • Picos de atividade tanto em períodos secos quanto úmidos • Elevada afinidade por bovinos e cavalos • Preferência por picar partes baixas do animal (membros)
<i>Haematobia irritans</i>	<i>T. vivax</i> <i>T. evansi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • “Mosca do chifre” • Distribuição cosmopolita • Transmissão mecânica: machos e fêmeas hematófagos, se alimentam de 20-30 vezes/ dia • Elevada afinidade por animais de produção (preferência pela base do chifre de bovinos)
<i>Tabanus</i> spp.	<i>T. vivax</i> (transmissão mecânica) <i>T. evansi</i> (transmissão mecânica) <i>T. theileri</i> (transmissão mecânica e biológica)	<ul style="list-style-type: none"> • “Mutucas” • Apenas a fêmea é hematófaga • Parasita de mamíferos, aves e répteis • Elevada capacidade de quiescência larval • Sua atração pelo hospedeiro se dá por estímulo visual e olfatório • Preferência por animais grandes de sangue quente (principalmente cavalos) • No Brasil a espécie de maior importância veterinária é a <i>Tabanus importunus</i> • No caso do <i>T. theileri</i> a transmissão se dá por via oral pela ingestão do vetor contaminado
Culicidae <i>Aedes</i> spp. <i>Anopheles</i> spp. <i>Culex</i> spp. <i>Mansonia</i> spp.	<i>T. vivax</i> (mecânica) <i>T. evansi</i> (mecânica) <i>T. theileri</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mosquitos • Fêmea hematófaga • Poucos estudos sobre o papel desses mosquitos na epidemiologia das tripanossomoses em animais domésticos

Fonte: Elaborado pela autora

Para as doenças de Chagas e na Tripanossomíase Humana Africana (doença do sono), os vetores envolvidos são, respectivamente os da subfamília Triatominae (gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*) e os da família Glossinidae, conhecidas como “moscas tsé-tsé” (*Glossina morsitans* spp., *G. fuscipes* spp., *G. palpalis* spp.) (WHO, 2012).

2.2.1 *Trypanosoma vivax*

O *T. vivax* foi descrito pela primeira vez na África, no ano de 1905, por Ziemann (DESQUESNES, 2004), sua distribuição geográfica abrange quase todo o continente africano e América Latina (FETENE et al., 2021).

Quando encontrado na corrente sanguínea, a forma tripomastigota é morfologicamente caracterizada por ser um tripanossoma de tamanho mediano, medindo de 18 a 31µm de comprimento e 1,5 a 3µm de largura, a forma do seu corpo lembra uma “lanceta” (alongada e achatada), possui um flagelo livre que mede 7µm, uma membrana ondulante atrofiada e discreta e um cinetoplasto considerado grande, de aproximadamente 1µm, frequentemente posicionado na porção terminal do protozoário e o núcleo disposto em sua região central (DESQUESNES, 2004; GIORDANI et al., 2016; SILVA et al., 2002).

As formas de transmissão de *T. vivax* relatadas são: via mecânica, a mais importante na América Latina, por insetos hematófagos, principalmente os dos gêneros *Stomoxys* e *Tabanus*, iatrogênica em vacinações e aplicações de medicamento e congênita cuja dinâmica é pouco elucidada (DESQUESNES, 2004). Na África a transmissão de *T. vivax* ocorre através de insetos tabanídeos, pela via mecânica, e através das moscas tsé-tsé pertencentes ao gênero *Glossinia* spp., através da via biológica (BALDACCHINO et al., 2014), sendo esse inseto o único no qual o *T. vivax* é capaz de se reproduzir e permanecer em sua forma infectante (OSÓRIO et al., 2008). Desquesnes (2004) cita ainda, a presença de *T. vivax* em carrapatos *Boophilus microplus*, fato que levanta a suspeita de uma outra possível via de transmissão mecânica, porém não comprovada.

A tripanossomose causada por *T. vivax* em ruminantes, particularmente bovinos, tem como sinais clínicos na sua forma aguda: febre intermitente, anemia, perda de peso e de condição corporal, queda na produção de leite, letargia, fraqueza, descarga nasal e ocular, diarreia, aumento de linfonodos, edema de barbela, aborto, paresia de membros posteriores e alterações neurológicas, podendo culminar com a morte do animal (BASTOS et al., 2020; CADIOLI et al., 2012; DESQUESNES, 2004; GARCIA PÉREZ et al., 2020; SILVA et al., 2002).

O curso da infecção por *T. vivax* é caracterizada por picos intermitentes de parasitemia seguidos por períodos de queda abrupta na quantidade de parasitos circulantes no sangue (OSÓRIO et al., 2008).

2.2.2 *Trypanosoma evansi*

Reportado pela primeira vez por Griffith Evans em 1880, é considerado um tripanossoma de tamanho mediano (15 a 34µm de comprimento), porém, na corrente sanguínea é monomórfico e caracterizado por formas delgadas e membrana ondulante bem desenvolvida. Quando comparado a outros tripanossomas é pequeno em relação ao *T. theileri* e grande em relação ao *T. congolense*, seu cinetoplasto é pequeno (0,6 µm) e posicionado bem distante da porção terminal (DESQUESNES, 2004; DESQUESNES et al., 2013).

Possui como hospedeiros animais domésticos como equinos, bovinos, caprinos, ovinos, suínos, búfalos (SILVA et al., 2002), cães e gatos (DESQUESNES et al., 2013) e animais silvestres como camelos, elefantes, capivaras, veados, antas, quatis e pequenos roedores (SILVA et al., 2002), sendo patogênico principalmente para os equinos e camelídeos (DESQUESNES et al., 2013)

A principal forma de transmissão do *T. evansi* é mecânica pela picada de insetos hematófagos (Quadro 2) e pelo morcego *Desmodus rotundus* que desempenha um papel importante na epidemiologia da tripanossomose ocasionada pelo *T. evansi* na América do Sul e Central (BRUN; HECKER; LUN, 1998). O morcego *D. rotundus*, é um importante reservatório e hospedeiro de *T. evansi* chegando a desenvolver a doença, ele se contamina ao se alimentar (rota oral-digestiva ou transcutânea) do sangue de um hospedeiro infectado ou ainda quando picado por vetores tabanídeos (AUSTEN; BARBOSA, 2021; RAMÍREZ, et al., 2014). A transmissão oro-digestiva também pode ocorrer com animais carnívoros, como cães, leões e hienas ao se alimentarem de carne crua de suas presas contaminada com o parasita, que é capaz de penetrar a mucosa oral íntegra da boca e intestino. Outras vias ainda possíveis são: iatrogênica e congênita (DESQUESNES, 2004).

Sua apresentação clínica pode ser aguda, subaguda ou crônica. Nos equídeos e camelídeos, para os quais é mais patogênico, os sinais clínicos são febre, perda de peso, edema subcutâneo, paresia de membros, atrofia e fadiga muscular, membranas mucosas ictéricas ou pálidas, incoordenação motora, letargia, anemia, linfadenomegalia, diminuição da produção, hemorragia petequeal em mucosas, urticária, aborto, natimortos e pode evoluir para óbito (ROVID, 2015b; SILVA et al., 2016). Em outras espécies animais a infecção por *T. evansi* é caracterizada pela ocorrência de emaciação, conjuntivite, opacidade de córnea, edema em face, febre, perda de peso e apatia em cães (ECHEVERRIA et al., 2019; HERRERA et al., 2004),

perda de condição corporal, fraqueza, febre, emaciação, edema e opacidade de córnea, diminuição na produção de leite e aborto em bovinos (BAL et al., 2014; MORE et al., 2017), sendo para esta espécie, uma doença crônica e com sinais moderados em países da África e da América Latina e aguda e intensa em países da África (JAISWAL et al., 2015) e, em cabras e ovelhas a infecção por *T. evansi* é, em sua maioria sem sinais clínicos, e quando os animais desenvolvem sinais, estes tendem a ser moderados (JAISWAL et al., 2015).

2.2.3 *Trypanosoma equiperdum*

O *T. equiperdum* é muito semelhante ao *T. evansi*, não sendo possível diferenciá-los em esfregaço sanguíneo. É ligeiramente menor do que o *T. evansi* (comprimento médio de 20µm), possui morfologia intermediária entre delgado e robusto, flagelo livre e pode apresentar-se desprovido de cinetoplasto (DESQUESNES, 2004).

A transmissão do *T. equiperdum* é direta pela mucosa genital de equinos durante o coito e a via de transmissão congênita, ainda que possível, não é documentada (WOAH, 2021).

A distribuição geográfica desse tripanosoma abrange África, Ásia, Oriente Médio, Sudeste da Europa e América do Sul, sendo que no Brasil não há relatos da ocorrência da doença em equinos (GIORDANI et al., 2016; ROVID, 2015a).

A doença é conhecida como durina e seu curso pode ser crônico ou agudo com períodos de recidiva e exacerbação dos sinais clínicos, sendo relatados: anemia, febre, edema em genitália e glândula mamária, perda de condição corpórea, erupção cutânea e lesões oculares de conjuntivite e queratite, sinais neurológicos como incoordenação motora e paralisia facial (CLAES et al., 2005).

As fêmeas equinas apresentam secreção vaginal mucopurulenta, edema de vulva e períneo, vulvovaginite, poliúria, sinais de desconforto local, manchas espessadas na mucosa genital, aborto e secreção de glândula mamária de coloração turva, esbranquiçada ou semelhante a soro e os machos apresentam edema de prepúcio e glande, parafimose, secreção uretral mucopurulenta (ROVID, 2015a).

Um sinal patognomônico da durina é a presença de placas edematosas de 5 a 8 cm de diâmetro e 1 cm de espessura na pele dos animais (CLAES et al., 2008).

2.2.4 *Trypanosoma theileri*

O *T. theileri* é bem maior do que os outros tripanossomas anteriormente descritos (69 a 109µm de comprimento e 1,4 a 5µm de largura), possui flagelo livre que pode medir de 4 a

26µm e uma membrana ondulante bem desenvolvida e extremidade posterior bem fina e rígida. Se movimenta mais devagar do que os outros tripanossomas, porém seu movimento de convolução é bem mais notável. Devido ao seu tamanho grande e formato bem demarcado é mais fácil de ser observado pela técnica de Woo. Seu cinetoplasto é considerado grande (1,1µm) e localizado bem distante da porção terminal do parasita (DESQUESNES, 2004).

A transmissão de *T. theileri* em bovinos ocorre através da penetração de formas metacíclicas do tripanossoma na mucosa oral intacta do animal, essas formas estão presentes no intestino ou fezes dos vetores tabanídeos ingeridos pelo bovino ao se protegerem do incomodo causado pelo inseto (BÖSE et al., 1987).

Devido à baixa patogenicidade do *T. theileri* em bovinos, sendo a ocorrência de sinais clínicos mais associada a outras doenças concomitantes, há pouca informação existe sobre a relação entre este tripanossoma e seus vetores para essa espécie de ruminante. Para além da transmissão oro-digestiva Brotánková et al. (2022), encontraram outros dípteros sugadores de sangue como os *Aedes* spp. e o *Phlebotomus perniciosus* como potenciais vetores de *T. theileri* em mamíferos.

O *T. theileri* é considerado não patogênico (DESQUESNES, 2004) e um parasita ocasional nos bovinos (SEIFI, 1995), sendo que nos casos relatados de ocorrência de *T. theileri* em bovinos as alterações clínicas não são específicas (AMATO et al, 2019), sendo multifatoriais e incluem: perda de condição corpórea (AMATO et al, 2019 e BITTNER et al, 2021), anorexia e desorientação, edema de membros posteriores, edema de esclera e incapacidade de se levantar (nos casos mais graves), pelagem áspera e desorientação mental (BITTNER et al, 2021).

2.2.5 *Trypanosoma cruzi*

Pode se apresentar, na corrente sanguínea, de aspecto robusto, com núcleo ovalado, cinetoplasto posicionado perto a sua porção terminal e com flagelo livre longo (8-10µm) ou de aspecto delgado, com núcleo alongado, cinetoplasto subterminal e um flagelo livre pequeno (2-4 µm). No geral, seu comprimento varia de 12 a 30µm, seu cinetoplasto é grande, medindo 1,2µm e sua membrana ondulante é discreta e o núcleo posicionado centralmente ou na porção anterior (DESQUESNES, 2004).

A transmissão nos mamíferos ocorre quando o inseto vetor triatomíneo infectado pica um hospedeiro e libera em suas excretas formas tripomastigotas metacíclicas infectantes, o hospedeiro ao coçar o local acaba permitindo a penetração do parasito na pele ferida (BARRET

et al., 2003). Os principais triatomíneos envolvidos são os dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (MARTINS et al., 2022). Outras vias de transmissão, menos comuns, são através da ingestão de alimentos contaminados com excretas do inseto vetor infectado (BENCHIMOL BARBOSA, 2006), congênita e via transfusão de sangue (YASUDA, 2022), sendo esta última a via de transmissão responsável por aproximadamente 20% das infecções (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION – PAHO, 2019a).

2.2.6 Diagnóstico das tripanossomoses em animais

Existe uma variedade de técnicas diagnósticas e de detecção disponíveis com diversas características e contextos apropriados a serem utilizados no diagnóstico das tripanossomoses em animais. Esses métodos podem ser parasitológicos, através da observação em microscópio óptico do parasito em amostras de sangue (ou aspirado de linfonodo) obtidas de maneira fácil e prática, através do cultivo celular onde as amostras coletadas do animal são inoculadas em um meio de cultivo adequado para serem mantidas e replicadas, diagnóstico sorológico onde são detectados antígenos do parasito ou anticorpos produzidos pelo hospedeiro e através do diagnóstico molecular que detecta a presença do DNA do parasito em amostras obtidas do animal (DESQUESNES, 2004; DESQUESNES et al, 2022; OIE, 2017; SILVA, 2002) No quadro 3 são apresentadas as diferentes técnicas existentes com um breve resumo de suas características e indicações de uso.

Quadro 3 – Descrição de testes disponíveis para o diagnóstico de tripanossomoses em animais

Técnica		Descrição
Método de Woo (1970)	DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	<p>Avaliação microscópica de plasma e capa leucocitária obtidos após centrifugação de sangue fresco em capilar microhematócrito</p> <p>Observação da movimentação dos tripanossomas</p> <p>Para o <i>T. vivax</i> o limiar mínimo de detecção é de 200 tripanossomas/ml</p> <p>Grau de identificação: gênero</p>

Continua

Técnica		Descrição continuação
Avaliação direta do sangue		<p>Avaliação microscópica de sangue fresco em lâmina coberta apenas com lamínula</p> <p>Observação de movimentação dos tripanossomas e avaliação de sua movimentação, morfologia e grau de parasitemia</p> <p>Grau de identificação: gênero</p>
Esfregaço de gota espessa		<p>Avaliação microscópica de esfregaço sanguíneo corado</p> <p>Observação da morfologia dos tripanossomas</p> <p>Grau de identificação: gênero</p>
Distensão fina		<p>Avaliação microscópica de esfregaço fino corado obtidos de amostras de sangue e aspirado de linfonodo</p> <p>Avaliação morfológica e morfométrica</p> <p>Grau de identificação: espécie</p>
Método de Murray		<p>Semelhante à Técnica de Woo, com observação microscópica utilizando contraste de fase</p> <p>Grau de identificação: espécie</p>
Cromatografia de íons		<p>Baseada na separação de tripanossoma e células vermelhas do sangue através da diferença de carga entre estes e posterior observação microscópica</p> <p>Amplamente utilizada para diagnóstico da Doença do Sono em humanos</p> <p style="text-align: right;">continua</p>

Técnica		Descrição continuação
Cultivo <i>in vitro</i>	CULTIVO CELULAR	Técnica mais dispendiosa financeiramente e com resultados mais demorados que podem ainda ser variados de acordo com a categoria de tripanossoma, exceção feita ao <i>T. theileri</i> , cultivado com maior facilidade
Cultivo <i>in vivo</i>		Baseada na inoculação em animais de laboratório, é uma técnica de difícil execução e de alto custo, tendo particularidades em relação a infectividade das espécies de tripanossomas roedores (infecções por <i>T. vivax</i> em roedores é rara) Sua utilidade prática é para a produção de antígenos a serem utilizados nos testes sorológicos
Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	Detecção de anticorpos contra tripanossoma no soro dos animais Pode gerar reações de fluorescência moderadas ou inespecíficas, tornando o resultado pouco confiável
Ensaio Imunoenzimático (ELISA)		Pode detectar a presença de antígenos ou anticorpos (IgG) no soro do animal testado Método de escolha para avaliação de uma população Avaliações de campo geram resultados dúbios devido a possibilidade de reação cruzada com outros parasitas, além da baixa especificidade (em torno de 15% para <i>T. vivax</i> , no caso do ensaio para pesquisa de antígenos)
Teste de aglutinação em cartão (CATT)		Detecção de IgM em infecções recentes causadas por <i>T. evansi</i> (útil para casos de surtos por esse parasita) Pode ter reação cruzada com outras espécies e detectar anticorpos contra <i>T. vivax</i> e <i>T. congolense</i> Alta sensibilidade para cavalos e camelos e baixa sensibilidade para bovinos e búfalos continua

Técnica		Descrição conclusão
Teste imune de tripanólise		<p>Detecção de anticorpos específicos contra antígenos variáveis de superfície presente nos tripanossomas vivos</p> <p>Difícil preparo, caro e demorado</p> <p>Disponível para infecções causadas por <i>T. brucei gambiense</i> em humanos e por <i>T. evansi</i> em cavalos</p>
Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e suas derivações	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	<p>Detecção de DNA de tripanossoma baseada na amplificação de sequências altamente repetitivas de DNA nuclear</p> <p>A detecção de DNA indica infecção ativa, visto que após a morte do parasita, o DNA livre permanece circulante por até 48 horas no hospedeiro</p> <p>Método espécie-específico que permite identificar diferentes espécies de tripanossoma tanto no hospedeiro como no vetor</p> <p>Menor limiar de detecção de parasitas: 1 a 10 tripanossomas/ml de sangue quando comparada às técnicas parasitológicas (100 a 1000 tripanossomas/m) e, portanto, mais sensível</p> <p>Quando realizado em amostras clínicas, como as de sangue, sua sensibilidade é afetada por períodos de baixa parasitemia ou por fases do ciclo do tripanossoma no hospedeiro onde não há circulação sanguínea do parasita</p>

Fonte: Elaborado pela autora de acordo com Desquesnes (2004), Desquesnes et al. (2022), OIE (2017) e Silva (2002).

2.2.7 Tratamento e controle das tripanossomoses

O controle e prevenção das tripanossomoses em animais é baseado no uso de medicamentos para tratamento e profilaxia, os princípios ativos utilizados são aceturato de diminazeno, indicado para infecções por *T. vivax* e *T. evansi* em bovinos, ovinos, caprinos e cães, cloridrato de isometamidium, para infecções por *T. vivax* e *T. evansi* em bovinos, ovinos, caprinos, cavalos e camelos, cloreto ou brometo de homidium, para *T. vivax* em bovinos, ovinos, caprinos e porcos, sulfato de quinapiramina para *T. vivax*, *T. evansi*, *T. equiperdum* em bovinos, cavalos, cães, porcos e camelos e suramim para *T. evansi* e *T. equiperdum* em cavalos e camelos e dicloridrato de melarsomina, para *T. evansi* e *T. equiperdum* em bovinos, caprinos, búfalos, cavalos, suínos e camelos (GIORDANI et al., 2016).

Existem contrapontos em relação eficácia dessas medicações, o seu benefício *versus* efeitos adversos, elevada resistência que vêm apresentando com o uso indiscriminado e estreita margem terapêutica (GIORDANI et al., 2016).

Um estudo realizado no estado de Goiás (Brasil) por Bastos et al. (2020) com bovinos experimentalmente infectados por *T. vivax*, recomenda a utilização de aceturato de diminazeno na dose de 7mg/kg e/ ou cloridrato de isometamidium na dose de 0,5 a 1,0mg/kg para o tratamento da infecção. Em contrapartida Castilho Neto et al. (2021) observaram a persistência de *T. vivax*, mesmo após o tratamento com cloridrato de isometamidium, em bovinos naturalmente infectados no estado de São Paulo (Brasil).

Os benefícios e efeitos adversos do uso das drogas tripanocidas é amplamente discutido e estudado, as recomendações de uso e eficácia variam de acordo com a idade e estado imunológico do paciente, fase da doença, acometimento de outros órgãos e sistemas e presença de outras doenças concomitantes (PÉREZ-MOLINA e MOLINA, 2018).

No continente africano, o tratamento da HAT é feito com os princípios fexinidazol, pentamidina ou nifurtimox, de acordo com os critérios de gravidade da doença, idade do paciente e avaliação do fluído cérebro espinhal, estabelecidos pelas diretrizes de tratamento para HAT (WHO, 2019).

Para controle e prevenção das infecções por tripanossomas em animais de produção, o controle ao vetor é feito através da aplicação de inseticidas e repelentes nos animais hospedeiros, armadilhas de inseticidas próximo aos locais onde os animais habitam, na limitação de trânsito dos animais e tratamento dos animais diagnosticados com a doença, sendo que a adoção de uma ou mais medidas deve-se levar em conta as características de cada propriedade (GIMONNEAU; RAYAISSE; BOUYER, 2018).

2.3 GÊNERO *LEISHMANIA*

As espécies do gênero *Leishmania* spp. parasitam células fagocitárias do sistema retículo-endotelial de mamíferos, apresentando-se na forma amastigota e no seu vetor, flebotomíneos, estão presentes no trato intestinal na forma promastigota, podendo ser encontrada mais raramente na glândula salivar (WHO, 2012; AKHOUNDI et al., 2016). Possuem distribuição mundial em regiões de clima tropical e subtropical (AKHOUNDI et al., 2016).

São descritas cerca de 53 espécies de *Leishmania*, que podem ser classificadas nos subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, *Paraleishmania* e complexo *L. enriettii*,

dentre essas espécies já descritas, 31 são comprovadamente parasitas de mamíferos e, destas, 20 podem ocasionar doença no homem (AKHOUNDI et al., 2016).

As leishmanioses são transmitidas aos diversos hospedeiros via picada do inseto vetor, que são fêmeas hematófagas adultas pertencentes a ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, dentro da qual tem-se representantes dos gêneros *Lutzomyia*, nas Américas Central e do Sul e do gênero *Phlebotomus*, nos países mediterrâneos (WHO, 2012; AKHOUNDI et al., 2016; OLIVEIRA, 2020).

No Brasil já foram relatadas as seguintes espécies causadoras de doenças: *Leishmania amazonensis*, causadora da leishmaniose em sua forma cutânea, cutânea difusa e muco-cutânea, *L. infantum*, causadora da forma visceral (LV) e cutânea (LC), *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*), *Leishmania guyanensis* (*L. guyanensis*) e *Leishmania panamensis* (*L. panamensis*), causadoras das formas cutânea e muco-cutânea (LMC) e *Leishmania lainsoni* (*L. lainsoni*), *Leishmania lindenbergi* (*L. lindenbergi*), *Leishmania naiffi* (*L. naiffi*) e *Leishmania shawi* (*L. shawi*), causadoras da forma cutânea. Todas estas espécies de leishmanias citadas têm como reservatórios seres humanos e animais como o cão, gato e equinos, e animais silvestres, sendo que para as formas cutâneas os reservatórios silvestres como algumas espécies de roedores, preguiça, tamanduá, gambá, quati e macaco assumem grande importância na epidemiologia da doença (AKHOUNDI et al., 2016; BRASIL, 2017;; OLIVEIRA, 2020).

De acordo com o Informe Epidemiológico das Américas de dezembro de 2022 (OPAS, 2022), no período de 2001 a 2021, no Brasil aconteceram 37,6% dos casos de LC e LMC ocorridos nas Américas Central e do Sul e México. Em relação a LV, nesse mesmo período foram reportados 69.665 novos casos nessas regiões, com uma média de 2.488 novos casos ao ano (OPAS, 2022). No Brasil, em 2021 foram reportados 1.492 casos de LV, o que representa 93,5% dos casos reportados nas Américas Central e do Sul e México com uma taxa de letalidade de 9,7% (OPAS, 2022).

No homem, a LV é considerada a forma mais grave e fatal quando não tratada, se desenvolve mais em crianças do que adultos e apresenta como sintomas: febre, palidez de mucosas, esplenomegalia, perda de peso, vômito, tosse, astenia e anorexia e, nos exames laboratoriais são evidenciadas anemia, leucopenia e trombocitopenia (WHO, 2012). Em pacientes com LV tratados pode ocorrer a leishmaniose cutânea pós calazar (LCPC) onde são observados exantemas ou “rash” avermelhado nodular, papular ou nódulo-papular que se

iniciam no rosto e se disseminam para outras partes do corpo, é mais frequente na LV causada pela *L. danovani*, sendo relatada na LV por *L. infantum* em coinfeções com o vírus da imunodeficiência humana – HIV (WHO, 2012).

A leishmaniose tegumentar pode se apresentar de diversas formas, desde lesões ulceradas limitadas até lesões graves e desfigurantes, a depender da espécie de *Leishmania* envolvida conforme descrito no quadro 4 (BRASIL, 2017; PAHO, 2022).

Quadro 4 – Descrição de sinais característicos das diversas apresentações de leishmanioses tegumentar (cutânea, muco-cutânea ou mucosa) em humanos e principais espécies de *Leishmania* envolvidas

Classificação da leishmaniose (em humanos)	<i>Leishmania</i> associada	Sinais clínicos
LC localizada	<i>L. guyanensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Lesão ulcerada, única ou múltipla (em uma mesma região corpórea), que pode se apresentar diversas características: bordas elevadas, fundo granuloso, em placa, com descamação e hiperchromia, esporotricóide, ectimoide e hiperemia • Pode haver linfadenopatia e linfangite nodular regionais
LC disseminada (ou LMC)	<i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Lesões múltiplas que podem ser papulares, acneiformes, verrucóides, impetigóides, nodulares e crostosas em várias regiões do corpo que se iniciam com um padrão de úlcera de bordas elevadas e com fundo granuloso • Adenomegalia incomum e discreta quando ocorre • A disseminação ocorre em alguns dias após o aparecimento das lesões primárias • Em 30% dos casos também ocorre o acometimento de mucosa • Sinais sistêmicos observados são: febre, dor muscular, mal-estar, emagrecimento, anorexia • Maioria dos casos relacionada a <i>L. braziliensis</i> • Rara

continua

Classificação da leishmaniose (em humanos)	<i>Leishmania</i> associada	Sinais clínicos conclusão
LC difusa	<i>L. amazonensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Forma rara e grave • Ocorre em indivíduos com resposta imune deficiente à <i>Leishmania</i> • Lesão única e não responsiva ao tratamento que evolui lentamente para placas e nódulos múltiplos não ulcerativos que recobrem uma grande parte da pele que podem ter como características: descamação e polimorfismo (placas, tubérculos, nódulos, lesões do tipo vegetativas)
Recidiva cútis		Observada para as LC, quando após cicatrizada, há uma reativação da lesão apenas em sua borda
LM tardia	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mais frequente • Lesões desfigurantes/ destrutivas em mucosa nasofaríngea caracterizadas por edema, ulceração, infiltrado inflamatório, hiperemia, crostas, exsudato, • Ocorre a partir de lesões de LC múltiplas e/ou de longa duração e/ou que evoluíram para cura espontânea e/ou cujo tratamento foi inadequado/ insuficiente
LM indeterminada	<i>L. braziliensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Em casos de lesão mucosa não precedida por lesões da forma cutânea • Lesões ulceradas, infiltrativas, hiperêmicas,
LM concomitante	<i>L. braziliensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Lesão ulcerativa em mucosa distante (e não contígua) da lesão cutânea ativa • Incomum, porém frequentemente associada à infecção com vírus da imunodeficiência humana (HIV)
LM contígua	Todas as espécies envolvidas na LC	<ul style="list-style-type: none"> • Propagação da lesão cutânea para a mucosa por contiguidade
LM primária	Todas as espécies envolvidas na LC	<ul style="list-style-type: none"> • Lesão devido a picada do vetor diretamente na mucosa afetada

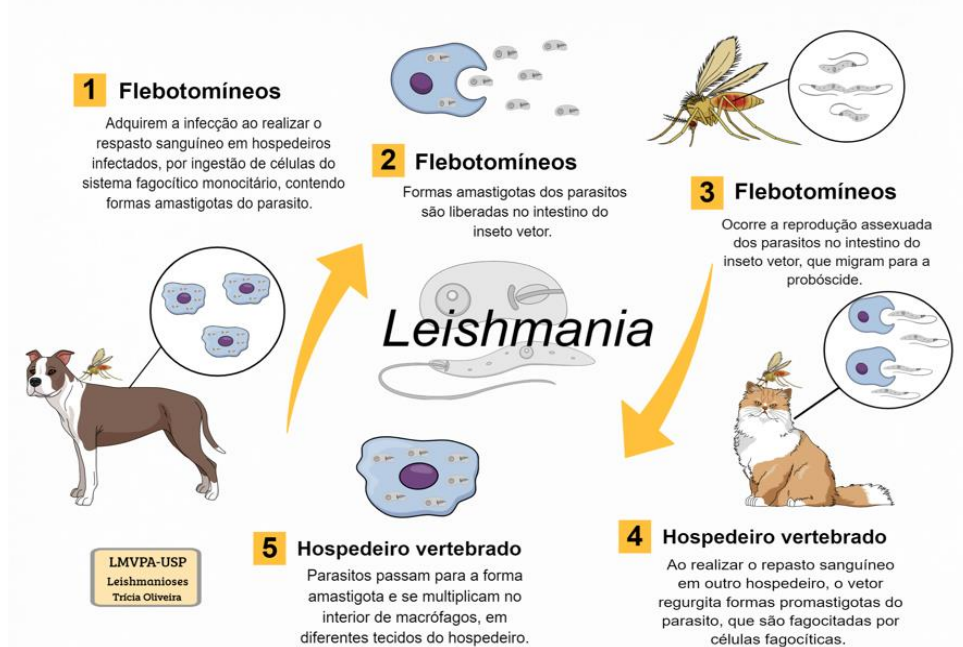
Fonte: Elaborado pela autora, de acordo com Brasil (2017) e PAHO (2022).

Legenda: LC (leishmaniose cutânea), LM (leishmaniose mucosa), LMC (leishmaniose muco-cutânea).

O ciclo de transmissão geral das leishmanioses (Figura 2) acontece quando a fêmea do flebotomíneo se alimenta de um mamífero infectado ingerindo macrófagos com formas amastigotas da *Leishmania*, no trato digestivo do inseto os macrófagos se rompem liberando essas formas que se reproduzem por fissão binária e se desenvolvem nas formas flageladas

promastigotas. As promastigotas se multiplicam também por fissão binária no intestino do inseto e migram para faringe e esôfago do vetor onde sofrem diferenciação para a forma infectante (promastigotas metacíclicas), todo esse processo dura cerca de 72 horas. Ao se alimentar novamente do sangue de um outro potencial hospedeiro as fêmeas flebotomíneas liberam junto com sua saliva, as formas promastigotas infectantes da *Leishmania*. Os macrófagos do sistema mononuclear fagocitário presente na epiderme do hospedeiro fazem a fagocitose dessas promastigotas e, dentro de uma nova estrutura formada nesses macrófagos, o vacúolo parasitóforo, ocorre a diferenciação de promastigotas para as formas amastigotas e intensa multiplicação destas até o rompimento dos macrófagos e disseminação via sangue dessas formas para outros tecidos ricos em macrófagos (STUART et al, 2008; BRASIL, 2014).

Figura 2 – Representação do ciclo de transmissão da *Leishmania* spp.



Fonte: Cedido por Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

2.3.1 *Leishmania* spp. em ruminantes

A ocorrência de *Leishmania* spp. em ruminantes já é documentada e os estudos buscam compreender o papel desses animais na epidemiologia das leishmanioses que acometem o ser humano.

Bhattarai et al. (2010), em estudo conduzido em região endêmica para LV humana no Nepal, observaram uma positividade de 16% e 5%, respectivamente, em 144 amostras de sangue de caprinos e 20 amostras de sangue de bovinos na PCR para o gene codificador da

subunidade 18S do DNA ribossomal de *Leishmania* spp. e avaliaram ainda que a proximidade com esses caprinos infectados representa um possível fator de risco para a infecção humana.

Lobsiger et al. (2010), descrevem um caso de um bovino na Suíça com lesões cutâneas ulceradas em várias partes do corpo diagnosticado com leishmaniose cutânea causada pela espécie *Leishmania sp. siamensis*. No trabalho de Lobsiger et al. (2010), foram realizados testes de imuno-histoquímica e histopatológico a partir de biópsia da lesão que demonstraram formas compatíveis com o estágio amastigota de *Leishmania* spp., e Nested-PCR de marcador ITS1 cujo sequenciamento demonstrou identidade com *L. siamensis*.

Ruiz et al. (2023) detectaram, através do teste de ELISA, a presença de anticorpos anti-*Leishmania* em uma cabra proveniente de uma área endêmica para LV canina que apresentava lesões de pele que foram responsivas ao protocolo de tratamento leishmaniostático instituído.

Em uma região endêmica para LV humana em Bihar (Índia) Singh et al. (2013) descreveram detecção de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de sangue de 31 cabras e 1 bovino submetidas a PCR da região completa do ITS (Internal Transcribed Spacer) sendo que das amostras de caprinos positivas 9 foram submetidas a sequenciamento, sendo compatíveis com DNA de *L. donovani*, agente causador da LV na Ásia e África.

Na Etiópia, Rohousova et al. (2015), encontraram positivities nos valores de 2,9%, 6,7% e 6% em, respectivamente, 104 amostras de sangue bovino, 239 amostras de sangue caprino e 149 amostras de sangue ovino submetidas a PCR para pesquisa de DNA circular de cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp. e, positivities de 1%, 1,3% e 2,7%, na Nested-PCR de ITS1, sendo o sequenciamento de 1 amplificado de amostra ovina positivo em ITS1 demonstrou identidade e cobertura de 100% com sequências de *L. infantum* e *L. donovani*.

Gao et al. (2015), identificaram ruminantes como possíveis reservatórios para um surto de LV humana na China. Os pesquisadores detectaram a presença de DNA de *L. infantum* em 30,36%, 21,57% e 17,78% amostras de sangue de, respectivamente, 56 ovinos, 51 caprinos e 45 bovinos submetidas a PCR de kDNA de *Leishmania* spp.

Semelhante ao achado de Gao et al. (2015), Han et al. (2018) encontraram uma positividade de 54,4% (62/114) em amostras de sangue de ovinos submetidas à Nested-PCR de ITS1 em uma região da China com surtos sazonais de LV humana, tais amostras mostraram se tratar de *L. infantum*, que apresentaram proximidade filogenética com a cepa isolada em humanos da região.

No Brasil existem dois relatos da detecção de *Leishmania* spp. em bovinos. Paixão-Marques et al. (2019) identificaram, por meio da Nested-PCR de ITS1 e sequenciamento genético, a presença de *L. infantum* no sangue de 1 bovino no município de Bauru (São Paulo), uma área endêmica para LV humana. Vioti et al. (2019) também detectaram a presença de DNA de *L. infantum* através da Nested-PCR de ITS1 e sequenciamento genético em Pirassununga (São Paulo) um município não endêmico para LV humana.

Em estudo realizado por Rezaei et al. (2022) em uma região endêmica para LV e LC humana no sul do Irã, demonstrou a presença de DNA de *Leishmania* spp. em 75% (12/16), 55% (27/49) e 46,5% (53/114) amostras de sangue de, respectivamente bovinos, ovinos e caprinos, submetidas a PCR quantitativa (qPCR) para o kDNA de *Leishmania* spp. Sendo 4 dessas amostras submetidas a Nested-PCR de ITS1 e posterior sequenciamento demonstraram identidade com as espécies *L. infantum* e *L. major*.

Todos esses relatos e inquéritos realizados têm em comum, com exceção do descrito por Lobsiger et al. (2010) e por Ruiz et al. (2023) o fato dos animais não apresentarem nenhum sinal sugestivo da infecção por *Leishmania* spp.

2.3.2. Tratamento e controle das leishmanioses

A decisão pelo protocolo adequado de tratamento da LV e leishmaniose tegumentar no ser humano é baseada em uma série de fatores como: tipo de manifestação da doença, idade do paciente, status imunológico, infecções concomitantes, região onde o paciente habita e avaliação de riscos e benefícios (PAHO, 2022).

As medicações recomendadas ou sugeridas, a depender do caso, são: antimoniais pentavalentes, alopurinol, anfotericina B, pentamidina, miltefosina, paramoxina. Essas medicações podem ser associadas a novas estratégias de tratamento como por exemplo a termoterapia e crioterapia, laser de gás carbônico e uso de imunomoduladores (PAHO, 2022; ROATT et al., 2020).

Os medicamentos como antimoniais, alopurinol e anfotericina B, apesar de licenciados para tratamento de cães com LV na Europa (SOLANO-GALLEGO et al. 2009) não são utilizados nesta espécie no Brasil, pois vão contra a Portaria Interministerial N° 1.426/2008 do Ministério da Saúde que proíbe o uso de medicamentos de uso humano ou que não tenham registro aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008) no tratamento da LV canina.

O tratamento da LV canina no Brasil como forma de prevenção e controle da LV humana não é recomendado, visto que atua no prolongamento da vida do animal através da redução da carga parasitária sem, no entanto, promover a cura parasitológica, o que possibilitaria a manutenção de uma fonte de infecção para o ser humano e a ocorrência da resistência às drogas utilizadas, visto às frequentes recidivas na doença clínica que a espécie canina apresenta quando tratada e a necessidade de tratamentos prologados e sucessivos (PAHO, 2019b).

Apesar desta recomendação, o tratamento de cães com LV pode ser utilizado como uma medida individual ao animal que respeite critérios como: de utilização de princípios ativos que tenham evidência científica comprovada e que não sejam utilizados para o tratamento da LV humana, que sejam utilizados colares impregnados com inseticidas ou repelentes tópicos nesses animais como forma de minimizar o risco de transmissão para o ser humano e constante informações para órgãos competentes responsáveis pela saúde pública acerca do tratamento desses animais (PAHO, 2019b).

Assim, em 2016, o MAPA autorizou, através da Nota Técnica Conjunta Nº 001/2016 (BRASIL, 2016) o registro de um medicamento para o tratamento da LV canina que tem como princípio ativo a miltefosina, que só é utilizada em humanos no Brasil para alguns casos de leishmaniose tegumentar.

As principais formas de prevenção e controle adotadas para as leishmanioses são a redução e monitoramento da transmissão da doença através do diagnóstico e tratamento rápidos, do controle dos insetos vetores pelo uso de inseticidas no ambiente, uso de coleiras impregnadas com deltametrina nos cães, telas “mosquiteiras” e manejo ambiental e vigilância e monitoramento constante da ocorrência da doença e controle da doença no ser humano e nas espécies animais hospedeiras (SILVA et al., 2018; WHO, 2023).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi identificar e caracterizar a ocorrência de protozoários tripanossomatídeos em ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos) em áreas endêmicas para leishmanioses no estado de São Paulo.

Os objetivos específicos alcançados foram:

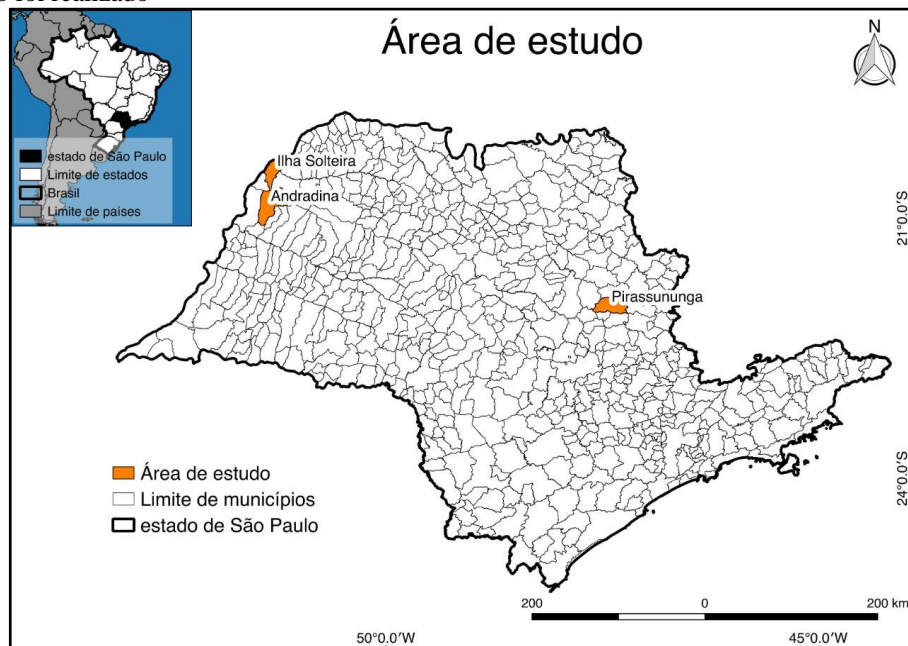
- a) o diagnóstico molecular e/ou parasitológico e/ou por isolamento de formas flagelares compatíveis com protozoários tripanossomatídeos em bovinos, ovinos e caprinos nas regiões estudadas;
- b) avaliação de condição física, sanidade e parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais positivos;
- c) caracterização, por sequenciamento genético, de amostras positivas para tripanossomatídeos em diagnóstico molecular;
- d) comparar o grau de concordância dos diferentes testes diagnósticos através do coeficiente *kappa* (*k*).

4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

4.1 REGIÃO ESTUDADA

O estudo foi realizado na mesorregião de Araçatuba, no Estado de São Paulo, nas cidades de Ilha Solteira e Andradina (Figura 3). A cidade de Ilha Solteira encontra-se a 650 km da capital (S 20° 38' 44" e O 51° 06' 35"), em uma altitude de 335 metros acima do nível do mar, com uma população estimada em 24.176 habitantes distribuídas em uma área de 652,641 km² de acordo com o Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística (IBGE, 2011). O município de Andradina está localizada a 620 km da cidade de São Paulo (S 20° 53' 46" e O 51° 22' 46"), com uma população estimada de 55.334 habitantes numa área total de 964,190 km² (IBGE, 2011). Ambos os municípios são considerados, segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) “Prof. Alexandre Vranjac” (2023), endêmicos para leishmaniose visceral com transmissão canina e humana. Também foram avaliados animais da cidade Pirassununga (Figura 3), Estado de São Paulo, localizada a 190 km da capital (S 21° 59' 46" e O 47° 25' 33"), em uma altitude de 627 metros, população de 75.930 habitantes e 727 km² de área (IBGE, 2018) que é classificado como um município silencioso não receptivo vulnerável para leishmaniose visceral e com casos autóctones confirmados de leishmaniose tegumentar e transmissão da doença (CVE, 2023; RANGEL E SAMPAIO, 2021).

Figura 3 – Mapa com a localização das cidades de Ilha Solteira, Andradina e Pirassununga (Estado de São Paulo), onde o estudo foi realizado



Fonte: Elaborado e cedido por João Augusto Franco Leonel, utilizando o *software* QSIG 3.3 “Las Palmas”

4.2 AMOSTRAS

O número de animais estudados foi calculado a partir da estimativa de prevalência (EP), com base nos valores de positividade para leishmanioses em diagnósticos moleculares e sorológicos disponíveis na literatura de 6% em bovinos e 12% em pequenos ruminantes (MUKHTAR et al., 2000; PAIXÃO, 2017), com 95% de grau de confiança (Z) e erro máximo (E) de 5%, sendo utilizado para a população total (p total) o censo agropecuário de 2017 realizado pelo IBGE, com rebanhos de 42.260 bovinos, 764 ovinos e 263 caprinos na cidade de Andradina, 21.038 bovinos, 467 ovinos e 322 caprinos na cidade de Ilha Solteira e 7.249 bovinos, 2.114 ovinos e 541 caprinos na cidade de Pirassununga. Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula:

$$n = \frac{Z * Z[P(1 - P)]}{E^2}$$

Onde, n= número amostral por espécie, Z= grau de confiança de 95% (1,96), P= prevalência esperada e E= erro máximo aceitável de 5%.

Desta forma obteve-se um n mínimo de 87 bovinos e um n mínimo de 157 pequenos ruminantes.

O sangue foi coletado por punção de veia jugular com sistema a vácuo, sendo coletados 2 tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) direcionados às análises moleculares, hemograma e cultivo e 1 tubo sem anticoagulante para a realização de teste sorológico e análise bioquímica.

Os suabes foram realizados com material estéril na conjuntiva ocular em sua porção que recobre as pálpebras inferiores direita e esquerda e na mucosa lateral da boca.

4.3. ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR

Para a técnica de hemocultura foi utilizado meio Schneider acrescido de soro fetal bovino e antibiótico (a base de penicilina e estreptomicina) nas proporções de 10% e 1%, respectivamente, do volume final do meio a ser obtido (NASCIMENTO, 2020). O meio era preparado momentos antes da inoculação e era inoculado 1ml de sangue total em 7ml de meio dentro de capela de fluxo laminar. Os cultivos foram mantidos em estufa em temperatura dentro da faixa de 28 a 30°C e, após 7 dias da inoculação foi realizada a primeira leitura. Foram realizadas quatro leituras em microscópio óptico, nos aumentos de 400x e 1000x, com intervalos de 1 semana entre cada leitura, o acompanhamento do cultivo foi feito por apenas 4 semanas visto que após esse período observa-se intensa contaminação bacteriana e/ ou por

fungos. As amostras de cultivo que apresentassem formas flagelares compatíveis com tripanossomatídeos foram consideradas positivas e armazenadas em temperatura de -80°C para análises futuras. Foi realizado um esfregaço das lâminas com cultivo positivo, fixadas com metanol e coradas com panóptico rápido para avaliação das formas encontradas.

4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

4.4.1 Amostras clínicas – bovinos, ovinos e caprinos

As amostras de sangue e suabes conjuntival e oral foram submetidas a extração de seu material genético para posterior realização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). O DNA foi extraído com equipamento KingFisher® Flex, com kit comercial MagMax™ CORE Nucleic Acid Purification Kit, através da metodologia de *beads* magnéticas e seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído ao final do processo era armazenado em temperatura de -20°C até processamento molecular.

Para confirmar a presença de DNA extraído, o produto da extração foi submetido a PCR para o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) conforme descrito por Birkenheuer et al. (2003) com modificações, as sequências de *primers forward* e *reverse* usadas foram, respectivamente: (5'CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e (5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'). Para a mistura de reagentes utilizou-se: tampão de PCR (50 mM de Tris-HCl; 10 mM de KCl), 1.5 mM de MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP's, 1 U de Taq-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 320 mM de cada *primer* e 2,5 μl do produto da extração. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti® (Applied Biosystems®) com as condições de termociclagem: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 45 ciclos de: desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 50 segundos e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por luz ultravioleta (UV) após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo corante SYBER®safe (Invitrogen®) em tampão Tris-borato (pH 8.0). O marcador de DNA de 100 pares de bases (pb) (DNA Molecular Weight Marker - Amresco®) foi utilizado para aferição do tamanho dos amplicons, sendo 400pb para amostras positivas para o gene GAPDH. Como controle positivo foi utilizada amostra de DNA de cão positivo para *L. infantum* e como controle negativo água ultrapura estéril.

Para a detecção molecular de tripanossomatídeos nos DNA extraído as amostras de sangue e suabes oral e conjuntival foi realizada a amplificação da região *Internal Transcribed Spacer*

I (ITS1) conforme descrito por El Tai et al. (2000), gerando bandas com comprimentos esperados de 50 a 350 pb para *Leishmania* spp. (SCHÖNIAN et al., 2003, AKHOUNDI et al., 2016) e na faixa de 300 a 800pb para *Trypanosoma* spp. (DAGNACHEW, BEZIE e GODDEERIS, 2015). A mistura foi preparada da seguinte forma: tampão de PCR (50 mM de Tris-HCl; 10 mM de KCl), 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP's, 2 U de Taq-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®) e 400 mM de cada iniciador de sequências LITSR (5' - CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5' -TGATACCACTTAATCGCACTT-3') e 2,5µL da amostra de DNA. As condições de termociclagem foram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Como se trata de um protocolo de Nested-PCR, a reamplificação foi realizada com 2,5µL do produto inicial, em condições de mix e termociclagem idênticas à primeira reação. O produto da amplificação foi submetido a mesma análise em luz UV por eletroforese como citado anteriormente. Como controle positivo foram utilizadas amostras de DNA de *L. infantum*, *T. vivax* e/ou *T. evansi* e/ou *T. cruzi* e como controle negativo água ultrapura estéril.

Dentre as amostras positivas na Nested-PCR de ITS1 foram selecionadas 23, de acordo com a intensidade da banda na eletroforese para envio ao Sequenciamento de Sanger.

Todas as amostras sequenciadas foram submetidas a PCR para pesquisa de kDNA de *Leishmania* spp. de acordo com por Rodgers, Stephen e Wirth (1990) (Quadro 5), como controle positivo foram utilizadas amostras de cães positivos para *L. infantum* e como controle negativo água ultrapura estéril.

As etapas do diagnóstico molecular para amostras de sangue e suabes oral e conjuntival de bovinos, ovinos e caprinos são descritas resumidamente no Apêndice B.

4.4.2 Amostras de sangue bovino – outras análises

Para as 111 amostras de sangue de bovinos foram realizadas, além da Nested-PCR de ITS1, a PCR com os marcadores moleculares para o domínio catalítico da enzima cathepsina L-like (cdCatL) para a pesquisa por DNA de *Trypanosoma* spp. e com os *primers* TthCatL1 e TviCatL1 para pesquisa por DNA de *T. theileri* e *T. vivax*, respectivamente. As reações seguiram as condições de termociclagem e composição de mix de acordo com Cortez et al. (2009) e Rodrigues et al. (2009) com modificações conforme descrito no quadro 5. Após a amplificação os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% ou 2%.

Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA de *T. vivax* obtidos de isolados e de *T. theileri* obtidos de amostras de sangue e como controle negativo água ultrapura estéril.

Todas as amostras de bovinos positivas na Nested-PCR de ITS1 foram submetidas à PCR com alvo para kDNA de *Leishmania* spp. com os *primers* 13a e 13b de acordo com por Rodgers, Stephen e Wirth (1990) conforme descrito no Quadro 5.

As etapas do diagnóstico molecular para amostras de sangue de bovinos são descritas resumidamente no Apêndice B.

4.4.3 Amostras de isolados em cultivo celular

As amostras positivas em cultivo celular foram alíquotadas e submetidas à extração de material genético, conforme metodologia de *beads* magnéticas previamente descrita e realizadas as análises moleculares de PCR para ITS1, cdCatL, TthCatL1, TviCatL1, conforme descrito anteriormente e para o marcador molecular *glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase* (gGAPDH) e para os alvos glicoproteína variante de superfície (VSG) e *primers* S35 e S36 para kDNA de *T. cruzi* conforme descrito no Quadro 5.

Após a amplificação os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% ou 2%. Como controles positivos foram utilizadas amostra de DNA de *L. infantum*, *T. theileri*, *T. vivax*, *T. evansi* e *T. cruzi* e como controle negativo água ultrapura estéril.

Quadro 5 – Descrição de alvos, sequência de *primers*, composição de mix, condições de termociclagem e referências utilizados na PCR de amostras clínicas de sangue e/ou isolado de bovinos

Alvo/tamanho da banda e Referência	Primer (5'-3')	Mix de PCR	Condições de termociclagem
cdCatL <i>Trypanosoma</i> spp. ~500pb Cortez et al. (2009) Rodrigues et al. (2009)	DTO154 (F) ACAGAATTCCAGGGC CAATGCGGCTCGTGCT GG DTO155 (R) TTAAAGCTTCCACGAG TTCTTGATGATCCAGT A	10mM Tris-HCl 1,5mM MgCl ₂ 100pmol <i>primer</i> F 100pmol <i>primer</i> R 200µM de cada dNTP 2,5U Taq-polimerase ¹ 20-100ng DNA da amostra testada	Desnaturação inicial (1 ciclo): 94 °C/10min. 35 ciclos: Desnaturação: 94 °C/1min. Anelamento: 56°C/1min. Extensão: 72°C/1min.
TthCatL1 <i>T. theileri</i> ~273pb Cortez et al. (2009) Rodrigues et al. (2009)	TthCatL1 (F) CGTCTCTGGCTCCGGT CAAAC DTO155 (R) TTAAAGCTTCCACGAG TTCTTGATGATCCAGT A		Extensão final (1 ciclo): 72°C/10min.
			continua

Alvo/tamanho da banda e Referência	Primer (5'-3')	Mix de PCR	Condições de termociclagem conclusão
TviCatL1 <i>T. vivax</i> ~177pb Cortez et al. (2009) Rodrigues et al. (2009)	TviCatL1 (F) GCCATCGCCAAGTACC TCGCCGA DT0155 (R) TTAAAGCTTCCACGAG TTCTTGATGATCCAGT A		
gGAPDH Tripanossomatídeo ~800pb Borghesan et al. (2013)	gGAPDH (F) GGBCGCATGGTSTTCC AG gGAPDH (R) CCCCACTCGTTRTCRT ACC	50mM Tris-HCl 1,5mM MgCl ₂ 100ng <i>primer F</i> 100ng <i>primer R</i> 200µM de cada dNTP 2,5U Taq-polimerase ¹ 100ng DNA da amostra testada	Desnaturação inicial (1 ciclo): 94 °C/3min. 30 ciclos: Desnaturação: 94 °C/1min. Anelamento: 55°C/2min. Extensão: 72°C/2min. Extensão final (1 ciclo): 72°C/10min.
VSG <i>T. evansi</i> ~227pb Palavesam et al. (2018)	<i>Primer F</i> TGCAGACGACCTGAC GCTACT <i>Primer R</i> CTCCTAGAAGCTTCGG TGTCCT	10mM Tris-HCl 1,5mM MgCl ₂ 100pmol <i>primer F</i> 100pmol <i>primer R</i> 200µM de cada dNTP 2,5U Taq-polimerase ¹ 20-100ng DNA da amostra testada	Desnaturação inicial (1 ciclo): 95 °C/4min. 30 ciclos: Desnaturação: 95 °C/1min. Anelamento: 55°C/40seg. Extensão: 72°C/30seg. Extensão final (1 ciclo): 72°C/4min.
S35/S36 <i>T. cruzi</i> ~330pb Vallejo et al. (1999)	S35 (F) AAATAATGTACGGGK GAGATGCATGA S36 (R) GGTTCGATTGGGGTTG GTGTAATATA	1U de tampão para PCR 3,5mM MgCl ₂ 2,25mM KCl 200µM de cada dNTP 25µM <i>primer F</i> 25µM <i>primer R</i> 0,5U Taq-polimerase ² 20-100ng DNA da amostra testada	Desnaturação inicial (1 ciclo): 95 °C/5min. 30 ciclos: Desnaturação: 95 °C/1min. Anelamento: 60°C/1min. Extensão: 72°C/1min. Extensão final (1 ciclo): 72°C/5min.

continua

Alvo/tamanho da banda e Referência	Primer (5'-3')	Mix de PCR	Condições de termociclagem conclusão
13a/13b <i>Leishmania</i> spp. ~120pb Rodgers, Stephen e Wirth (1990)	13a (F) GTGGGGGAGGGGCGT TCT 13b (R) ATTTTACACCAACCCC CAGTT	200mM Tris-HCl 500mM KCl 1,5mM MgCl ₂ 0,31mM de cada dNTP 0,26µM primer F 0,26µM primer R 1U Taq-polimerase ² 2,5µ DNA da amostra testada	Desnaturação inicial (1 ciclo): 94 °C/3min. 35 ciclos: Desnaturação: 94 °C/40seg. Anelamento: 56°C/30seg. Extensão: 72°C/30seg. Extensão final (1 ciclo): 72°C/5min.

Fonte: Elaborado pela autora

As etapas do diagnóstico molecular para amostras de isolado em cultivo celular de bovinos são descritas resumidamente no Apêndice B.

4.4.4 Sequenciamento

Dentre as amostras positivas na Nested-PCR de ITS1 e na PCR de *T. theileri* foram selecionadas 23 para envio ao Sequenciamento de *Sanger* em laboratório particular. A escolha das amostras se deu por aquelas que apresentavam bandas intensas na eletroforese.

A reação de sequenciamento foi realizada através de eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) com o kit Sequenciamento BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied), sendo a reação de precipitação realizada de acordo com as indicações do fabricante com Etanol/EDTA/Acetato de Sódio.

Os cromatogramas gerados foram avaliados através dos programas Chromas 2.6.6 (TECHNELYSIUM PTY LTD.) e PHPH – Eletctropherogram quality analysis (TOGAWA; BRIGIDO, 2003) para acessar a qualidade das sequências obtidas. O programa BioEdit Sequence Alignment Editor[®] (HALL, 1999) foi utilizado para alinhamento das sequências obtidas por cada *primer* e gerar as sequências contíguas (*contig*) que foram comparadas com sequências depositadas no GenBank[®] (CLARK et al., 2016) através da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool – BLAST[®] (ALTSCHUL et al., 1990).

4.4.5 Filogenia

Sequências parciais de *T. theileri* obtidas pela Nested-PCR de ITS1 e previamente depositadas no Genbank[®] foram alinhadas com as sequências obtidas neste estudo a partir de duas amostras de isolado positivas na Nested-PCR de ITS1 (B33 e B38). O alinhamento das

sequências deste estudo com sequências depositadas no Genbank[®] serviu como base para a construção da árvore filogenética, utilizando o software MEGA versão 11 (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021), sendo que a estimativa da distância utilizada foi o modelo Tamura 3 parâmetros, modelo que considera transições e transversões ocorrendo em taxas diferentes e o conteúdo de G+C (NEI; KUMAR, 2000). As árvores filogenéticas foram construídas empregando o algoritmo de máxima verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981) a veracidade dos ramos foi conferida por análise de “*bootstrap*” (1000 repetições). Como grupo externo foi utilizado uma sequência de *Trypanosoma rangeli*.

Para verificar a história evolutiva das sequências nucleotídicas dos isolados de *T. theileri* encontrados neste estudo pela PCR utilizando os *primers* TthCatL1 e DTO155, as sequências contíguas foram então alinhadas por correspondência nucleotídica no programa Bioedit (HALL, 1999) e as regiões complementares aos iniciadores foram excluídas. A sequência gerada foi alinhada com sequências selecionadas do GenBank[®] após uma análise filogenética prévia e que permitisse uma comparação com as demais sequências parciais de cepas e isolados de *T. theileri* de estudos que utilizaram o marcador molecular cdCatL no Brasil e em diversas regiões, usando o algoritmo L-INS-i do programa MAFFT (KATO et al., 2005). Lacunas nas extremidades das sequências, devido a dados não amplificados ou por variação natural do comprimento, foram substituídas por ‘n’. A reconstrução filogenética foi estimada usando o critério de *Neighbor Joining* (NJ) com base no modelo evolutivo Tamura 3 parâmetros com variação gamma (NEI; KUMAR, 2000), utilizando o Critério de Informação Bayesian (BIC). A melhor topologia da análise foi gerada pelo programa MEGA 11 e veracidade dos ramos foi conferida por análise de “*bootstrap*” (10.000 repetições). Sequências de *T. vivax* foram utilizadas como grupo externo.

4.5 SOROLOGIA – REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

A técnica de RIFI foi realizada de acordo com o descrito por Oliveira et al. (2008), sendo utilizadas lâminas previamente sensibilizadas com promastigotas de *L. infatum* (Imunodot[®]) mantidas a - 20°C até uso. Para a realização do teste, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos e então adicionados 10 µL de soro diluído a 1:40, ponto de corte do teste para triagem de positivos, em tampão fosfato-salino (Phosphate Buffered Saline – PBS) de pH 7,2, com os dois últimos poços reservados para os controles positivo (soro de animais reagentes na RIFI) e negativo (soro fetal bovino ou soro de ovino/ caprino neonato). As lâminas

foram incubadas a 37°C por 30 minutos e, após este período, lavadas três vezes por 5 minutos cada, em solução de PBS com pH de 7,2. Após a primeira sequência de lavagem foi adicionado sobre cada poço, 10 µL de conjugado composto por anti-IgG de cada espécie, marcado com isotiocianato de fluoresceína, nas diluições 1:600 para bovinos e 1:50 para ovinos e caprinos. A lâmina foi novamente incubada (37°C por 30 minutos) e lavada conforme descrito anteriormente. Para a leitura em microscópio equipado com imunofluorescência foi adicionado glicerol tamponado e lamínula. Foram consideradas positivas as amostras onde observou-se fluorescência dos parasitas quando comparado às amostras controle. Para a determinação do título de anticorpos o mesmo procedimento acima descrito foi utilizado, porém o soro de cada animal positivo na triagem foi diluído nas proporções 1:40; 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640.

4.6 TESTE DE IMUNOCROMATOGRAFIA – *T. vivax*

Foi realizado o teste rápido de imunocromatografia (IMUNOTESTE®, Imunodot® Diagnósticos) para detecção de anticorpos específicos contra proteína recombinante de *T. vivax* em 38 amostras de soro de bovinos, conforme recomendações do fabricante.

4.7 PARASITOLÓGICO

Foi realizado esfregaço sanguíneo obtido por punção de veia jugular. As lâminas foram fixadas em laboratório com metanol por 5 minutos e coradas com Giemsa por 30 minutos e então lavadas com água corrente. A leitura foi feita em microscópio óptico no aumento 1000x para a pesquisa de formas sugestivas de tripanossomatídeos.

4.7 AVALIAÇÃO CLÍNICA E HEMATOLÓGICA

Os animais foram avaliados em relação a coloração de mucosas, presença de lesões na pele e presença de algum sinal de enfermidade. Foi realizada uma anamnese junto ao proprietário em relação a histórico de doenças e medicações recentes, vacinação, alimentação e demais informações sobre a sanidade do animal e/ou rebanho.

O hemograma foi realizado no analisador hematológico Mindray, BC- 2800 Vet (China), sendo utilizada metodologia automatizada para hemácias, hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos, plaquetas e leucócitos totais e manual para contagem diferencial de leucócitos e avaliação da morfologia celular.

Para as análises de bioquímica sérica foi utilizado o equipamento Mindray, BS 120, (China), sendo utilizadas metodologias enzimática, colorimétrica ou cinética a depender do parâmetro avaliado.

4.8 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Para avaliar a concordância entre os diferentes testes diagnósticos utilizados no presente trabalho foi calculado o coeficiente *kappa* (*k*), baseado no número de vezes em que um mesmo resultado se repete quando submetido a diferentes testes, a interpretação deste coeficiente é feita de acordo com o proposto por Landis e Koch (1977) como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Interpretação dos valores de coeficiente *kappa* (*k*) para testes diagnósticos

Coeficiente <i>kappa</i> (<i>k</i>)	Intensidade da concordância
< 0,0	Pobre
0,0 – 0,2	Ruim
0,21 – 0,4	Razoável
0,41 – 0,6	Moderada
0,61 – 0,8	Substancial
0,81 – 1,0	Quase perfeita

Fonte: Elaborado pela autora de acordo com Landis e Koch (1977)

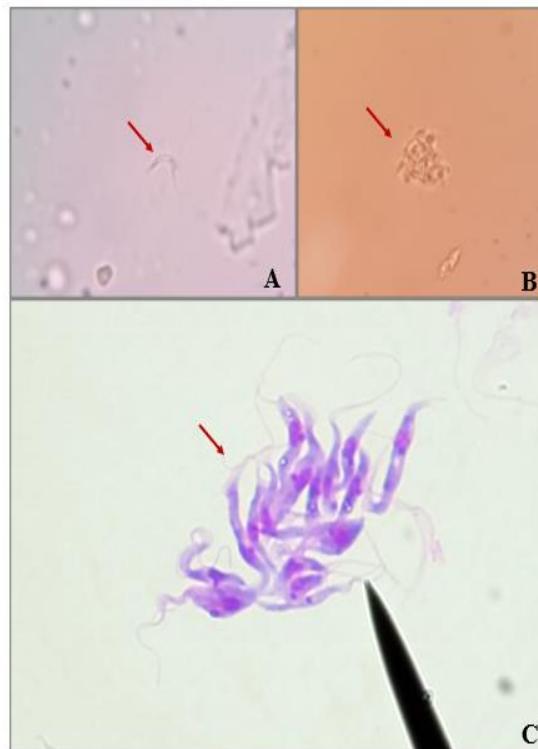
5. RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR

Foram coletadas 269, amostras de sangue sendo 111 de bovinos, 122 de ovinos e de 36 caprinos.

Dos 111 bovinos avaliados 8% (9/111) apresentaram formas flageladas sugestivas de tripanossomátídeos na hemocultura (Figura 4). Dos 122 ovinos e 36 caprinos avaliados, não foram encontradas estruturas compatíveis com tripanossomátídeos em nenhuma das 4 leituras realizadas.

Figura 4 – Fotos de microscopia óptica de lâminas de hemocultura positivas para a presença de formas flageladas sugestivas de tripanossomátídeos



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: setas vermelhas: formas flageladas sugestivas de tripanossomátídeos. A e B: lâminas observadas durante a leitura do cultivo e C: lâmina de cultivo corada com panóptico rápido

5.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

5.2.1 Controle de extração de DNA – GAPDH

Todas as amostras extraídas foram submetidas a PCR de gene endógeno GAPDH para verificação da ocorrência ou não de extração do DNA.

Foram testadas: 111 amostras de sangue, 111 amostras de suabe conjuntival e 111 amostras de suabe oral de bovinos. Para sangue e suabe conjuntival a PCR de GAPDH foi positiva para todas as amostras e para suabe oral apenas para 12 amostras.

Para os ovinos foram testadas 122 amostras de sangue, 122 amostras de suabe conjuntival e 122 amostras de suabe oral. Para sangue e suabe conjuntival a PCR de GAPDH foi positiva para todas as amostras e para suabe oral apenas para 65 amostras.

Dos caprinos foram testadas 36 amostras de sangue, 36 amostras de suabe conjuntival e 36 amostras de suabe oral, todas as amostras de sangue e suabe conjuntival foram positivas para a PCR de GAPDH e para as amostras de suabe oral apenas 20.

5.2.2 Nested-PCR de região ITS1 – bovinos

Foram testadas 111 amostras de sangue, 111 amostras de suabe conjuntival e 12 amostras de suabe oral de bovinos.

Para as amostras de sangue, dos 111 bovinos testados 23,4% (26/111) animais foram positivos, com amplificação de fragmentos de DNA nas faixas de 100-200pb, 200pb, 200-300pb, 300pb e 300-400pb.

Para as amostras de suabe conjuntival, das 111 amostras de DNA avaliadas 19,8% (22/111) foram positivas, amplificando fragmentos de DNA nas faixas de 200pb e 200-300pb.

Para as 12 amostras extraídas de suabe oral de bovinos todas foram negativas na Nested-PCR de ITS1.

De todos os bovinos positivos na Nested-PCR de ITS1, 6 animais foram positivos tanto para amostras de sangue quanto para amostras de suabe conjuntival.

5.2.3 Nested-PCR de região ITS1 – ovinos

Foram testadas 122 amostras de sangue, 122 amostras de suabe conjuntival e 65 amostras de suabe oral de ovinos.

Para as amostras de sangue, dos 122 ovinos testados 29,5% (36/122) foram positivos, com amplificação de fragmentos de DNA nas faixas de 100-200pb, 200pb e 200-300pb.

Para as amostras de suabe conjuntival, dos 122 animais testados, 14,7% (18/122) animais foram positivos, com amplificação de fragmentos de DNA nas faixas de 200 pb e 200-300pb.

Das 65 amostras extraídas de suabe oral de ovinos, 12,3% (8/65) ovinos foram positivos na Nested-PCR de ITS1, amplificando fragmento de DNA com banda no tamanho de 200pb.

De todos os ovinos positivos na Nested-PCR de ITS1, apenas 1 foi positivo para as três amostras (sangue e suabes conjuntival e oral) com a formação de bandas no tamanho de 200pb e 6 foram positivas para 2 das amostras testadas, sendo 4 deles positivos em sangue e suabe conjuntival, 1 deles positivo para sangue e suabe oral e 1 ovino positivo para suabe conjuntival e oral, todos com formação de banda de 200pb.

5.2.4 Nested-PCR de região ITS1 – caprinos

Para as amostras de sangue, dos 36 caprinos testados, 27,8% (10/36) animais foram positivos, amplificando fragmentos de DNA nas faixas de 100-200pb, 200pb 200-300pb.

Para as amostras de suabe conjuntival, apenas 5,5% (2/36) animais foram positivos formando bandas com fragmento de 200pb e, para suabe oral, de 20 animais testados, todas as amostras foram negativas.

Nenhum caprino foi positivo para mais de um tipo de amostras (sangue e suabe).

5.2.5 PCR de kDNA de amostras positivas na Nested-PCR de ITS1

Foram positivas na Nested-PCR de ITS1 de sangue e suabe conjuntival um total de 48 amostras, de bovinos. Todas essas amostras ao serem testadas para kDNA de *Leishmania* spp. com os *primers* 13a e 13b foram negativas.

5.2.6 PCR de amostras de sangue bovino para *Trypanosoma* spp.

Das 111 amostras de sangue bovino submetidas a PCR para *Trypanosoma* spp., 3,6% (4/111) foram positivas, amplificando fragmentos de DNA na faixa de 500pb, com bandas de intensidade fraca e 7,2% (8/111) foram positivas para *T. theileri*, amplificando fragmentos de DNA na faixa de 300pb, sendo que dessas 8 amostras positivas 4 se referem as mesmas amostras positivas para *Trypanosoma* spp.

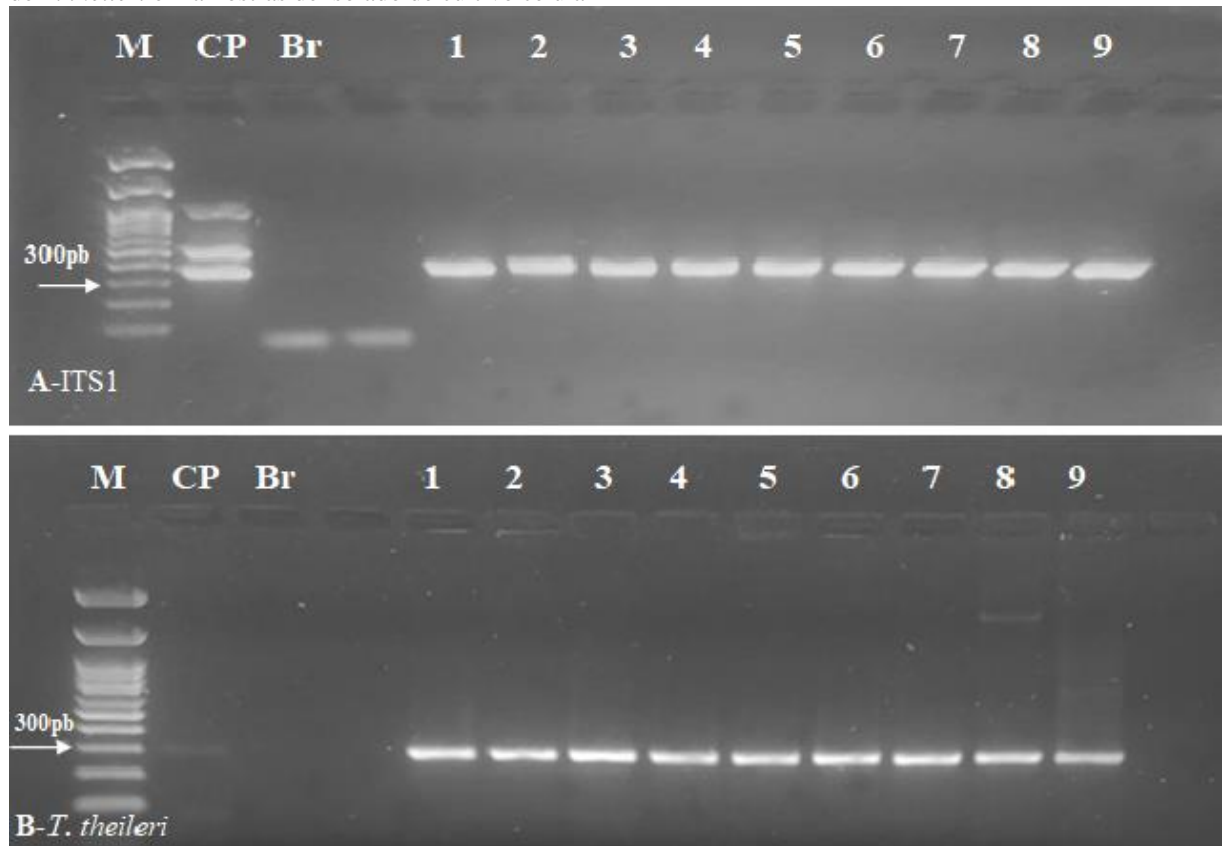
Das 111 amostras de sangue bovino testadas nenhuma foi positiva na PCR para *T. vivax*.

5.2.7 PCR de isolados de sangue bovino

Das 9 amostras de DNA obtidos a partir dos isolados em cultivo celular 100% delas (9/9) foram positivas na Neste-PCR de ITS1, amplificando bandas na faixa entre 300 e 400pb (Figura 5-A), 100% (9/9) foram positivas na PCR para *Trypanosoma* spp., amplificando bandas na faixa de 500pb e 100% (9/9) positivas para *T. theileri*, amplificando bandas de aproximadamente 300pb (Figura 5-B).

Na PCR de gGAPDH 88,9% (8/9) foram positivas e nenhuma amostras foi positiva na PCR para *T. vivax*, *T. evansi* e *T. cruzi*.

Figura 5 – Resultado de eletroforese em gel de agarose para a Nested-PCR de ITS1 e PCR para pesquisa por DNA de *T. theileri* em amostras de isolado de cultivo celular



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: M: marcador de peso molecular de 100pb, CP: controle positivo, sendo na figura A – *L. infantum* e figura B – *T. theileri*, Br: controle negativo/ branco: água ultrapura estéril, 1-9: amostras de isolado em cultivo celular de sangue bovino

5.2.8 Sequenciamento genético

23 amostras foram selecionadas para envio ao sequenciamento: 9 positivas na Nested-PCR de ITS1 de sangue bovino, 5 positivas na Nested-PCR de ITS1 de sangue ovino, 3 positivas na Nested-PCR de sangue caprino, 1 positiva na Nested-PCR de suabe conjuntival de bovino, 1 positiva na Nested-PCR de suabe conjuntival de caprino, 2 positivas na Nested-PCR de ITS1 de isolado em hemocultura de bovino e 2 positivas na PCR para pesquisa de *T. theileri* de isolado em hemocultura de bovino.

Das 23 amostras sequenciadas, foi possível obter um alinhamento adequado e gerar *contigs* para 13 delas.

Para 6, das 23 amostras, não foi possível obter alinhamento adequado devido a um resultado de baixa qualidade na sequência gerada pelo *primer* L5.8S utilizado na reação de Neste-PCR

de ITS1, no entanto foi possível comparar a sequência gerada pelo *primer* LITSR com sequências depositadas na base de dados do GenBank®.

Por fim, para 4 das 23 amostras não foi possível utilizar nenhuma das sequências por ambos os *primers* LITSR e L5.8S.

O resultado do alinhamento e sequenciamento está descrito na Tabela 2 e as sequências geradas descritas no Apêndice A.

Tabela 2 – Descrição dos resultados de Sequenciamento de Sanger de amostras de DNA positivas para na Nested-PCR de ITS1 e na PCR para *T. theileri*

Amostra	Tamanho de banda/ alvo	E-value	Query Cover	Identidade	Descrição/ Acesso no GenBank®	Sequência
B8 SG	200-300pb ITS1	1e-35	97%	98,9%	<i>L. major</i> / MH347926.1	Contig
B9 SG	300pb ITS1	4e-65	99%	88,5%	<i>L. major</i> / MH347926.1	Contig
B11 SG	200-300pb ITS1	1e-34	100%	98,9%	<i>L. major</i> / MH347926.1	Contig
B16 SG	200-300pb ITS1	7e-33	40%	96,7%	<i>L. major</i> / MH347926.1	Contig
B17 SG	100-200pb ITS1	1e-34	100%	98,9%	<i>L. major</i> / MH347926.1	Contig
B33 ISO	300-400pb ITS1	2e-141	100%	99,3%	<i>T. theileri</i> / LC440408.1	Fita LITSR
B33 ISO	300pb TthCatL1	3e-145	100%	99,3%	<i>T. theileri</i> / LC438508.1	Contig
B35 SC	200pb ITS1	1e-32	60%	93%	<i>T. simiae</i> / MW364087.1 <i>T. congolense</i> / U22318.1	Fita LITSR
B38 SG	300-400pb ITS1	2e-159	88%	96,8%	<i>T. theileri</i> / JX178187.1	Contig
B38 ISO	300-400pb ITS1	2e-161	47%	97,3%	<i>T. theileri</i> / JX178187.1	Contig
B38 ISO	300pb TthCatL1	5e-143	98%	100%	<i>T. theileri</i> / LC438508.1	Contig
B75 SG	200pb ITS1	1e-34	41%	96,7%	<i>L. major</i> / MH347926.1	Contig
B86 SG	200-300pb ITS1	3e-67	40%	98%	<i>L. major</i> / MH347926.1	Contig
C21 SG	200-300pb ITS1	4e-35	20%	96,7	<i>L. major</i> / MH347926.1	Contig
C34 SG	100-200pb ITS1	1e-29	60%	93%	<i>T. simiae</i> / MW364087.1 <i>T. congolense</i> / U22318.1	Fita LITSR
O03 SG	200-300pb ITS1	3e-65	18%	97,3%	<i>L. major</i> / MH347926.1	Contig

continua

Amostra	Tamanho de banda/ alvo	E-value	Query Cover	Identidade	Descrição/ Acesso no GenBank®	Sequência conclusão
O05 SG	200-300pb ITS1	2e-29	60%	91%	<i>T. simiae</i> / MW364087.1 <i>T. congolense</i> / U22318.1	Fita LITSR
O13 SG	200-300pb ITS1	2e-30	59%	92%	<i>T. simiae</i> / MW364087.1	Fita LITSR
O30 SG	200-300pb ITS1	3e-64	77%	97,2%	<i>L. major</i> / MH347926.1	Fita LITSR

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: as letras B, C e O, se referem, respectivamente às espécies bovina, caprina e ovina; SG: sangue; SC: suabe conjuntival e ISO: isolado

5.2.9 Filogenia

As análises filogenéticas entre os isolados de *T. theileri* identificados no presente trabalho e aqueles encontrados parasitando outros hospedeiros como bovinos, búfalos, cervídeos, antílopes e tabanídeos são apresentadas nas Figura 6 e 7.

Figura 6 – Filograma com base no critério da Máxima Verossimilhança (MV) de sequências parciais do gene ITS1 de espécies *T. theileri*, incluindo os isolados detectados neste estudo (B33 e B38 grafados em vermelho)

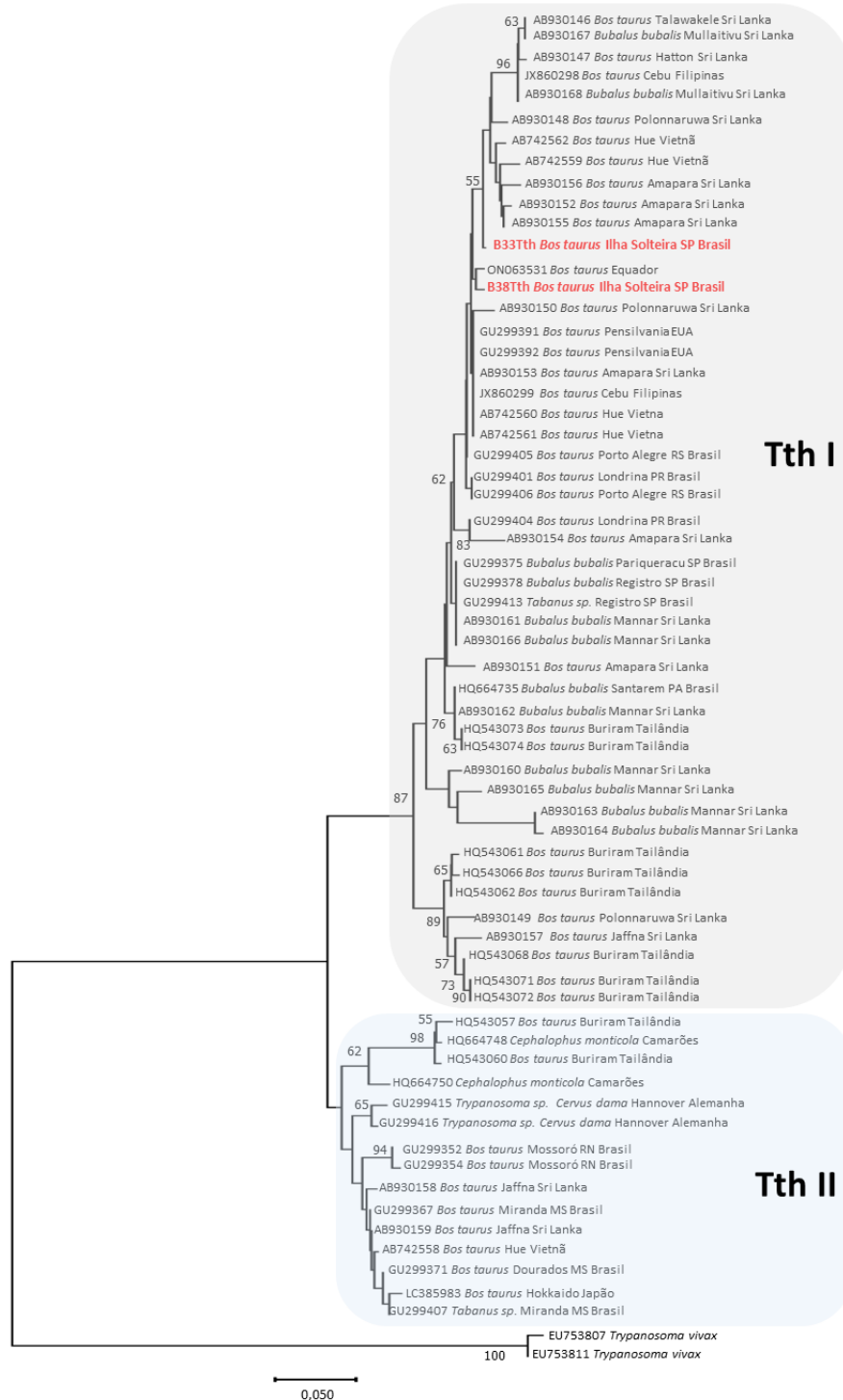


Nota: O suporte nodal *bootstrap* estão indicados acima dos nós. Valores de *bootstrap* < 60 não são mostrados. A barra de escala indica o número de substituições nucleotídicas por local

A comparação de sequências obtidas a partir da região ITS1 e do marcador para o domínio da enzima catepsina *L-like* demonstraram que os isolados B33 e B38 pertencem à mesma linhagem Tth1 do clado de *T. theileri* identificados em bovinos nos estados de São Paulo e

Mato Grosso do Sul, no Brasil, no Equador, nos Estados Unidos, no Sri Lanka, nas Filipinas e no Vietnã, em búfalos do Sri Lanka.

Figura 7 – Filograma com base no critério *Neighbor Joining* (NJ) de sequências parciais do gene *cdCatL* de espécies *T. theileri*, incluindo os isolados detectados neste estudo (B33 e B38 grafados em vermelho)



Nota: O suporte nodal *bootstrap* estão indicados acima dos nós. Valores de *bootstrap* < 55 não são mostrados. A barra de escala indica o número de substituições nucleotídicas por local

5.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Das 111 amostras de soro bovino testadas na RIFI, 57,6% (64/111) foram reagentes, sendo 71,9% (46/64) reagentes no título de 1:40, 20,3% (13/64) reagentes no título de 1:80 e 7,8% (5/64) reagentes no título de 1:160.

Das 122 amostras de soro ovino testadas, 24,6% (30/122) foram reagentes, sendo 46,7% (14/30) reagentes no título de 1:40, 40% (12/30) reagentes no título 1:80, 10% (3/30) reagentes no título de 1:160 e 3,3% (1/30) reagentes no título de 1:640.

Para as amostras de soro de caprinos, 66,7% (24/36) foram reagentes, sendo 58,4% (14/24) reagentes no título de 1:40, 33,3% (8/24) reagentes no título de 1:80 e 8,3% (2/24) reagentes no título de 1:160.

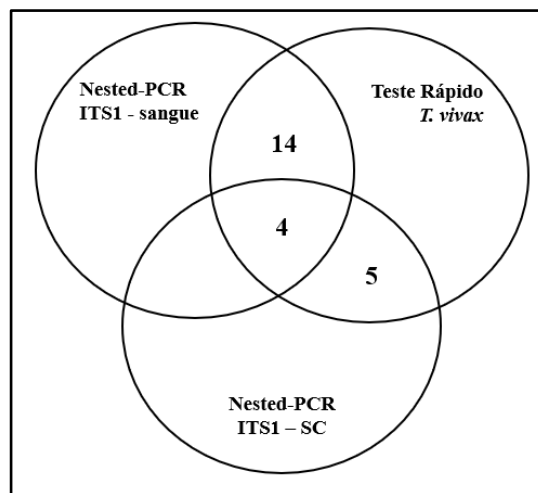
5.4 TESTE DE IMUNOCROMATOLOGRAFIA – *T. vivax*

Das 38 amostras de soro testadas, 58% (22/38) obtiveram resultados positivos, 37% (14/38) resultados negativos e 5% (2/38) resultados inconclusivos.

Nenhum dos bovinos positivos no teste rápido foi positivo na PCR de sangue para *T. vivax*.

Dos 22 bovinos positivos no teste rápido, 14 foram positivos na Nested-PCR de ITS1 somente para as amostras de sangue, 5 foram positivos na Nested-PCR de ITS1 somente para amostras de suabe conjuntival e 4 foram positivos na Nested-PCR de ITS1 para amostras de sangue e suabe conjuntival (figura 8).

Figura 8 – Diagrama com animais positivos em teste rápido de imunocromatografia para *T. vivax* e em Nested-PCR de ITS1



Fonte: Elaborado pela autora
 Legenda: SC: suabe conjuntival

Dos 11 bovinos positivos para *T. theileri*, 9 tiveram seus soros submetidos ao teste rápido, sendo que destes, 7 apresentaram resultados positivos.

Dos 22 bovinos positivos no teste de imunocromatografia para *T. vivax*, 8 deles haviam tido seus amplificadores positivos na Nested-PCR de ITS1 ou na PCR para *T. theileri* submetidos a sequenciamento de Sanger, sendo que 5 tiveram suas sequências similares com as de *L. major*, 1 similar com *T. congolense* e *T. simiae*, 1 similar com *T. theileri* e para 1 animal não foi possível obter alinhamento adequado.

Ainda, dos 22 bovinos positivos para o teste rápido, 4 não foram reagentes na RIFI para *L. infantum*, 14 foram reagentes no título 1:40, 3 foram reagentes no título 1:80 e 1 foi reagente no título 1:160.

O compilado de todos os resultados dos diferentes testes diagnósticos aos quais os 38 animais que tiveram seus soros testados pela imunocromatografia é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Testes diagnósticos realizados para os 38 bovinos que tiveram seus soros testados pelo teste rápido de imunocromatografia para *T. vivax*

ID	Cultivo	Nested-PCR ITS1		PCR <i>T. vivax</i>	PCR <i>T. theileri</i>	Sequenciamento Sanger	RIFI	Teste Rápido
		SG	SC	SG	SG			<i>T. vivax</i>
B05	-	-	+	-	-	NA	40	+
B07	-	-	+	-	-	NA	NR	+
B08	-	+	-	-	-	<i>L. major</i> (SG)	40	+
B09	-	+	-	-	-	<i>L. major</i> (SG)	40	-
B11	-	+	+	-	-	<i>L. major</i> (SG)	40	+
B12	-	+	+	-	-	NA	40	-
B16	-	+	-	-	-	<i>L. major</i> (SG)	80	-
B17	-	+	-	-	-	<i>L. major</i> (SG)	160	+
B25	-	-	+	-	-	NA	NR	-
B28	-	+	-	-	-	NA	40	+
B30	-	+	-	-	-	NA	40	+
B33	+	+	-	-	+	<i>T. theileri</i> (ISO)	40	+
B35	-	+	+	-	+	<i>T. simiae</i> <i>T. congolense</i> (SG)	40	+
B36	+	+	-	-	-	NA	40	+
B38	+	+	-	-	+	<i>T. theileri</i> (ISO e SG)	40	+
B42	-	+	-	-	-	NA	40	+
B47	-	+	+	-	+	NA	40	+
B48	+	+	-	-	+	NA	40	+
B50	-	-	+	-	-	NA	NR	-
B51	-	+	+	-	-	NA	NR	+
B54	+	+	-	-	-	NA	40	+
B55	+	+	-	-	+	NA	NR	-
B56	+	+	-	-	-	NA	40	I continua

ID	Cultivo	Nested-PCR ITS1		PCR <i>T. vivax</i>	PCR <i>T. theileri</i>	Sequenciamento Sanger	RIFI	Teste Rápido
		SG	SC	SG	SG			<i>T. vivax</i> continuação
B57	+	+	-	-	+	NA	NR	-
B60	-	-	+	-	-	NA	80	-
B65	-	-	+	-	-	NA	40	+
B68	-	-	+	-	-	NA	80	+
B70	-	-	+	-	-	NA	80	+
B72	-	+	-	-	-	NA	NR	-
B75	-	+	-	-	-	<i>L. major</i> (SG)	80	+
B80	-	-	+	-	-	NA	NR	-
B86	-	+	-	-	-	<i>L. major</i> (SG)	NR	+
B87	-	+	-	-	-	NA	NR	+
B92	-	+	-	-	-	NA	NR	-
B93	-	-	+	-	-	NA	NR	-
B99	-	+	+	-	-	NA	40	-
B100	-	-	+	-	-	NA	NR	-

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: ID: identificação do animal, SC: suabe conjuntival, SO: suabe oral, SG: sangue, ISO: isolado, NA: não se aplica (animal não submetido ao teste em questão), NR: não reagente, sinal +: animal positivo (destacado em vermelho), sinal -: animal negativo, I: inconclusivo

5.5 PARASITOLÓGICO

Não foram encontradas formas flageladas sugestivas de tripanossomatídeos em lâminas de esfregaço sanguíneo de sangue total.

5.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA E HEMATOLÓGICA

5.6.1 Bovinos – Nested-PCR de ITS1

Para os bovinos positivos para a presença de tripanossomaídeo em cultivo e isolamento e/ou Nested-PCR de ITS1, foram descritas as seguintes ocorrências de doenças e/ou alterações clínicas: mucosa ocular hipocorada (1 animal), elevada carga de carrapato (5 animais), presença de ceratoconjuntivite (1 animal) e úlcera de córnea (1 animal), estefanofilariose (1 animal), Tristeza Parasitária Bovina (4 animais, nos últimos 12 meses e 6 animais nos últimos 60 dias) e pneumonia (2 animais, nos últimos 60 dias).

As alterações encontradas no hemograma dos 111 bovinos avaliados foram: valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas abaixo (ou no limite inferior) do intervalo de referência para a espécie e valores acima do intervalo de referência para leucócitos totais. No bioquímico, as alterações encontradas foram: valores abaixo do intervalo de referência para os parâmetros uréia e gama glutamil transferase (GGT) e valores acima do intervalo de referência para os parâmetros creatinina e aspartato amino transferase (AST).

A comparação estatística entre os valores de média e mediana entre os grupos de bovinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1 é descrito nas Tabelas 4 e 5, foram considerados positivos os animais que apresentaram bandas na eletroforese para qualquer amostra avaliada (sangue ou suabe conjuntival), em um total de 44 animais.

Tabela 4 – Comparação entre valores de hemograma dos grupos de bovinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1

Parâmetro	Intervalo de Referência¹	Bovinos positivos n=44	Bovinos Negativos n=67	<i>p-value</i>
Hemácias (x10⁶/μL)	5,0-10,0	6,6 ^a (4,4-10,27)	6,6 ^a (3,2-11,7)	0,6129
Hemoglobina (g/dL)	8-15	10,3 ± 1,7	10,0 ± 1,9	0,3604
Hematócrito (%)	24-46	30,3 ^a ± 4,4	29,4 ^a ± 5,5	0,3538
VCM (fL)	37-51	45,3 ^a ± 5,3	44,4 ^a ± 5,3	0,3648
HCM (pg)	13-18	15,4 ^a ± 1,8	15,1 ^a ± 1,8	0,3831
CHCM (%)	33-37	34 ^a ± 1,9	34 ^a ± 1,6	0,9965
Plaquetas (x10³/μL)	200-730	302,5 ^a (45-740)	334 ^a (14-1.358)	0,8164
Leucócitos Totais (/μL)	4.000-12.000	9.800 ^a (4.300-39.500)	11.300 ^a (5.200-57.900)	0,0818
Neutrófilos Segmentados (/μL)	600-4.000	3.203 ^a (516-7.900)	3.034 ^a (448-14.630)	0,8863
Linfócitos (/μL)	2.500-7.500	4.939 ^a (1.936-30.810)	6.048 ^a (300-52.689)	0,1035
Monócitos (/μL)	30-800	453 ^a (0-1.359)	560 ^b (0-3.474)	0,0386*
Eosinófilos (/μL)	0-2400	712,5 ^a (0-2.948)	558 ^a (0-7.425)	0,5494
Basófilos (/μL)	0-200	0 ^a (0-150)	0 ^a (0-506)	0,3778

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: ¹Intervalo de Referência proposto para a espécie bovina por Meyer e Harvey (2004). Estatística via GraphPad Prism 9,5: análise prévia de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, os parâmetros com distribuição normal foram submetidos ao test t com correção de Welch's para comparação entre os grupos (animais positivos vs negativos), sendo apresentados na forma de média e desvio padrão, os parâmetros que não seguiam distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre os grupos, sendo apresentados na forma de mediana e valores mínimo e máximo. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p<0,05) com nível de significância dia 95%. VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média e CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

Tabela 5 – Comparação entre valores de bioquímico dos grupos de bovinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1

Parâmetro	Intervalo de Referência	Bovinos Positivos n=44	Bovinos Negativos n=67	p-value
Uréia (mg/dL)	21,4-55,7 ¹	25 ^a (4,6-56,2)	22,2 ^a (2,8-142,4)	0,2331
Creatinina (mg/dL)	0,7-1,1 ¹	1 ^a (0,7-2,0)	1 ^a (0,5-2,2)	0,1770
AST (U/L)	48-100 ¹	86,5 ^a (46-165)	78,0 ^a (46-450)	0,7766
GGT (U/L)	20-48 ¹	18 ^a (5-100)	18 ^a (2-893)	0,4229
Proteínas Totais (g/dL)	5,9-7,7 ¹	7,0 ^a ± 0,5	6,7 ^a ± 0,7	0,1407
Albumina (mg/dL)	2,7-4,3 ¹	3,2 ^a (2,4-3,7)	3,1 ^a (1,6-3,9)	0,1668
Globulinas (mg/dL)	2,5-4,1 ¹	3,9 ^a (2,2-5,0)	3,6 ^a (2,4-7,1)	0,3027
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,01-0,50 ²	0,1 ^a (0,0-0,3)	0,1 ^a (0,0-0,8)	0,9704
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,04-0,44 ²	0,1 ^a (0,0-0,1)	0,1 ^a (0,0-0,5)	0,7368
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,03 ²	0,03 ^a (0,0-0,2)	0,02 ^a (0,0-0,4)	0,8355

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: ¹Intervalo de Referência proposto para a espécie bovina por Meyer e Harvey (2004). ²Intervalo de Referência por Kaneko, Harvey e Bruss (1997). Estatística via GraphPad Prism 9,5: análise prévia de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, os parâmetros com distribuição normal foram submetidos ao test t com correção de Welch's para comparação entre os grupos (animais positivos vs negativos), sendo apresentados na forma de média e desvio padrão, os parâmetros que não seguiam distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre os grupos, sendo apresentados na forma de mediana e valores mínimo e máximo. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p<0,05) com nível de significância dia 95%. AST: aspartato amino transferase e GGT: gama glutamil transferase

5.6.2 Bovinos – Positivos na PCR para *T. theileri*

Dos 11 bovinos positivos na PCR para *T. theileri*, nenhum apresentava no momento da coleta e avaliação clínica qualquer sinal de doença.

Em relação às alterações em hemograma dos animais positivos para *T. theileri*, 1 animal apresentou valor de VCM ligeiramente acima do intervalo de referência para a espécie, 1 animal valor de HCM ligeiramente abaixo do intervalo de referência, 3 animais apresentaram valores

de plaqueta abaixo do intervalo de referência e 6 animais apresentaram alteração em leucograma: 2 animais com neutrofilia relativa, 1 animal com monocitose relativa, 1 animal com eosinofilia relativa, 1 animal com leucocitose por neutrofilia e 1 animal com leucocitose por neutrofilia e eosinofilia.

No bioquímico dos animais positivos para *T. theileri*, 3 bovinos apresentaram valores de ureia abaixo do intervalo de referência para a espécie, 8 bovinos apresentaram valores de GGT abaixo do intervalo de referência, 1 bovino apresentou valor de AST ligeiramente acima do intervalo de referência, 1 bovino apresentou valor de proteína plasmática ligeiramente acima do intervalo de referência, 2 bovinos apresentaram valores de globulina ligeiramente acima do intervalo de referência e 6 bovinos apresentaram valores de creatinina ligeiramente acima do intervalo de referência.

Na comparação entre animais positivos (n=11) e negativos (n=100) para *T. theileri*, houve diferença estatística significativa para parâmetros de hemácia, com maior valor de mediana no grupo dos bovinos positivos e de hemoglobina, hematócrito e CHCM com valores de média maiores no grupo dos animais positivos e nos parâmetros de AST, proteína total e albumina com maiores valores de mediana ou média para o grupo dos bovinos positivos (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 – Comparação entre valores de hemograma dos grupos de bovinos positivos e negativos na PCR para pesquisa de DNA de *T. theileri*

Parâmetro	Intervalo de Referência¹	Bovinos positivos n=11	Bovinos Negativos n=100	p-value
Hemácias (x10⁶/μL)	5,0-10,0	7,6 ^a (6,3-9,2)	6,5 ^b (3,2-11,7)	0,0063*
Hemoglobina (g/dL)	8-15	12,0 ^a ±0,7	9,9 ^b ±1,8	<0,0001*
Hematócrito (%)	24-46	34,5 ^a ±2	29,3 ^b ±5	<0,0001*
VCM (fL)	37-51	45,5 ^a ±4,2	44,7 ^a ±5,4	0,5732
HCM (pg)	13-18	15,8 ^a ±1,6	15,1 ^a ±1,8	0,1666
CHCM (%)	33-37	34,8 ^a ±0,8	33,9 ^b ±1,7	0,0064*
Plaquetas (x10³/μL)	200-730	292 ^a (134-433)	332 ^a (14-1.358)	0,2100
Leucócitos Totais (/μL)	4.000-12.000	10.600 ^a (7.300-13.400)	10.750 ^a (6.979-12.232)	0,8954
Neutrófilos Segmentados (/μL)	600-4.000	3.450 ^a (1.752-6.030)	3.010 ^a (448-14.630)	0,2364

continua

Parâmetro	Intervalo de Referência¹	Bovinos positivos n=11	Bovinos Negativos n=100	p-value conclusão
Linfócitos (/µL)	2.500-7.500	4.288 ^a (3.276-8.844)	5.790 ^a (300-52.689)	0,2830
Monócitos (/µL)	30-800	424 ^a (84-848)	517 ^a (0-3.474)	0,1588
Eosinófilos (/µL)	0-2400	1.386 ^a (0-2.948)	559 ^a (0-7.425)	0,0767
Basófilos (/µL)	0-200			

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: ¹Intervalo de Referência proposto para a espécie bovina por Meyer e Harvey (2004). Estatística via GraphPad Prism 9,5: análise prévia de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, os parâmetros com distribuição normal foram submetidos ao teste t com correção de Welch's para comparação entre os grupos (animais positivos vs negativos), sendo apresentados na forma de média e desvio padrão, os parâmetros que não seguiam distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre os grupos, sendo apresentados na forma de mediana e valores mínimo e máximo. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p<0,05) com nível de significância dia 95%. VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média e CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

Tabela 7 – Comparação entre valores de bioquímico dos grupos de bovinos positivos e negativos na PCR para pesquisa de DNA de *T. theileri*

Parâmetro	Intervalo de Referência	Bovinos Positivos n=11	Bovinos Negativos n=100	p-value
Uréia (mg/dL)	21,4-55,7 ¹	31,4 ^a (16-40)	22,5 ^a (2,8-142)	0,0663
Creatinina (mg/dL)	0,7-1,1 ¹	1,2 ^a (0,9-2,0)	1,0 ^a (0,5-2,2)	0,0874
AST (U/L)	48-100 ¹	96,0 ^a (74-105)	77 ^b (46-450)	0,0134*
GGT (U/L)	20-48 ¹	17,0 ^a (9-32)	18 ^a (2-893)	0,2883
Proteínas Totais (g/dL)	5,9-7,7 ¹	7,2 ^a ±0,4	6,8 ^b ±0,6	0,0093*
Albumina (mg/dL)	2,7-4,3 ¹	3,3 ^a ±0,2	3,0 ^b ±0,4	0,0001*
Globulinas (mg/dL)	2,5-4,1 ¹	4,0 ^a (3,2-4,4)	3,7 ^a (2,2-7,1)	0,5246
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,01-0,50 ²	0,1 ^a (0,07-0,26)	0,1 ^a (0-0,8)	0,0945
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,04-0,44 ²	0,1 ^a (0,04-0,12)	0,1 ^a (0-0,45)	0,1189

continua

Parâmetro	Intervalo de Referência	Bovinos Positivos n=11	Bovinos Negativos n=100	p-value	conclusão
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,03 ²	0,1 ^a (0,02-0,15)	0 ^a (0-0,44)	0,0975	

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: ¹Intervalo de Referência proposto para a espécie bovina por Meyer e Harvey (2004). ²Intervalo de Referência por Kaneko, Harvey e Bruss (1997). Estatística via GraphPad Prism 9,5: análise prévia de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, os parâmetros com distribuição normal foram submetidos ao teste t com correção de Welch's para comparação entre os grupos (animais positivos vs negativos), sendo apresentados na forma de média e desvio padrão, os parâmetros que não seguiam distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre os grupos, sendo apresentados na forma de mediana e valores mínimo e máximo. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$) com nível de significância de 95%. AST: aspartato amino transferase e GGT: gama glutamil transferase

5.6.3 Ovinos

Para os ovinos positivos em Nested-PCR de ITS1 foram descritas as seguintes ocorrências de doenças e/ou alterações clínicas: presença de secreção respiratória (1 animal), respiração ruidosa (1 animal) e mucosas oculares hipercoradas (1 animal).

As alterações encontradas no hemograma dos 122 ovinos avaliados foram: valores acima do intervalo de referência para a espécie de hemácias, leucócitos totais, neutrófilos bastonetes e segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos e valores abaixo do intervalo de referência para os parâmetros hemoglobina, hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). No bioquímico dos ovinos positivos as alterações encontradas foram valores abaixo do intervalo de referência para os parâmetros uréia, creatinina, AST, proteína total, globulina e bilirrubina e valores acima do intervalo de referência para GGT.

A comparação estatística entre os valores de média e mediana entre os grupos de ovinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1 é descrito nas Tabelas 8 e 9, foram considerados positivos os animais que apresentaram bandas na eletroforese para qualquer amostra avaliada (sangue e suabe conjuntival ou oral), em um total de 54 animais.

Tabela 8 - Comparação entre valores de hemograma dos grupos de ovinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1

Parâmetro	Intervalo de Referência¹	Ovinos positivos n=54	Ovinos Negativos n=68	p-value
Hemácias (x10⁶/μL)	8-15	12,5 ^a ± 2,2	11,9 ^a ± 1,6	0,1205
Hemoglobina (g/dL)	8-16	11,5 ^a ± 2,6	10,8 ^a ± 1,8	0,1240
Hematócrito (%)	24-49	36,2 ^a (20,6-69,4)	34,8 ^a (21,3-44,5)	0,1532
VCM (fL)	23-48	28,4 ^a (24,6-35,3)	28,7 ^a (23,5-39,1)	0,9059
HCM (pg)	8-12	9,3 ^a (6,5-11,8)	9,1 ^a (6,6-12,5)	0,8669
CHCM (%)	31-34	32 ^a (22,8-39,3)	29,7 ^a (25,1-41,3)	0,7820
Plaquetas (x10³/μL)	300-800	483,4 ^a ± 221,8	534,4 ^a ± 283	0,2692
Leucócitos Totais (/μL)	4.000-12.000	7.750 ^a (3.900-20.200)	7.700 ^a (3.700-17.200)	0,6843
Neutrófilos Bastonetes (/μL)	0	0 ^a (0-452)	0 ^a (0-400)	0,4485
Neutrófilos Segmentados (/μL)	1.000-5.000	3.381 ^a (1.196-9.696)	3.2333 ^a (1.369-10.744)	0,9286
Linfócitos (/μL)	2.000-9.000	3.153 ^a (1.222-10.292)	3.192 ^a (1.045-7.740)	0,9513
Monócitos (/μL)	0-750	186 ^a (0-858)	196 ^a (0-1.032)	0,7424
Eosinófilos (/μL)	0-750	731,5 ^a (0-4.030)	671 ^a (0-3.784)	0,4549
Basófilos (/μL)	Raros	0 ^a (0-340)	0 ^a (0-560)	0,1172

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: ¹Intervalo de Referência proposto para a espécie ovina por Meyer e Harvey (2004). Estatística via GraphPad Prism 9,5: análise prévia de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, os parâmetros com distribuição normal foram submetidos ao teste t com correção de Welch's para comparação entre os grupos (animais positivos vs negativos), sendo apresentados na forma de média e desvio padrão, os parâmetros que não seguiam distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre os grupos, sendo apresentados na forma de mediana e valores mínimo e máximo. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p<0,05) com nível de significância de 95%. VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média e CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

Tabela 9 – Comparação entre valores de bioquímico dos grupos de ovinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1

Parâmetro	Intervalo de Referência	Ovinos Positivos n=54	Ovinos Negativos n=68	p-value
Uréia (mg/dL)	38,6-66,4 ¹	26,2 ^a (9,4-50,4)	25,7 ^a (5,8-68,2)	0,4676
Creatinina (mg/dL)	1,2-1,9 ¹	1,1 ^a ± 0,2	1,1 ^a ± 0,2	0,3713
AST (U/L)	98-278 ¹	124 ^a (73-170)	116 ^a (69-186)	0,3173
GGT (U/L)	0-32 ²	46,8 ^a ± 23,5	45,1 ^a ± 19,1	0,6756
Proteínas Totais (g/dL)	6,0-7,9 ¹	6,3 ^a (4,7-8,0)	6,5 ^a (5,2-9,4)	0,6184
Albumina (mg/dL)	2,4-3,9 ¹	3,1 ^a (2,3-4)	3,0 ^a (2,5-3,6)	0,4073
Globulinas (mg/dL)	3,5-5,7 ¹	3,3 ^a (2-5,3)	3,5 ^a (2,2-6,3)	0,3193
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,1-0,5 ²	0,1 ^a (0-0,2)	0,1 ^a (0-0,2)	0,1842
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0-0,27 ²	0 ^a (0-0,1)	0 ^a (0-0,1)	0,8513
Bilirrubina Indireta (mg/dL)		0 ^a (0-0,1)	0 ^a (0-0,2)	0,1546

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: ¹Intervalo de Referência proposto para a espécie ovina por Meyer e Harvey (2004). ²Intervalo de Referência por Jain (1993). Estatística via GraphPad Prism 9,5: análise prévia de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, os parâmetros com distribuição normal foram submetidos ao test t com correção de Welch's para comparação entre os grupos (animais positivos vs negativos), sendo apresentados na forma de média e desvio padrão, os parâmetros que não seguiam distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre os grupos, sendo apresentados na forma de mediana e valores mínimo e máximo. Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p<0,05) com nível de significância de 95%. AST: aspartato amino transferase e GGT: gama glutamil transferase.

5.6.4 Caprinos

Para os caprinos positivos em Nested-PCR de ITS1 foram descritas as seguintes ocorrências de doenças e/ou alterações clínicas: mucosas oculares hipercoradas (1 animal) e pálidas (1 animal).

As alterações encontradas no hemograma dos 36 caprinos avaliados foram: valores de hemácia, hematócrito, CHCM, leucócitos totais, neutrófilos bastonetes e segmentados, linfócitos e monócitos acima do intervalo de referência para a espécie. Já para o bioquímico,

os parâmetros alterados foram uréia, creatinina, AST, proteína total e albumina abaixo do intervalo de referência e valores de globulina e ureia (1 caprino) acima do intervalo de referência.

A comparação estatística entre os valores de média e mediana entre os grupos de caprinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1 é descrito nas Tabelas 10 e 11, foram considerados positivos os animais que apresentaram bandas na eletroforese para qualquer amostra avaliada (sangue ou suabe conjuntival), em um total de 12 animais.

Tabela 10 – Comparação entre valores de hemograma dos grupos de caprinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1

Parâmetro	Intervalo de Referência¹	Caprinos positivos n=12	Caprinos Negativos n=24	p-value
Hemácias (x10⁶/μL)	8,0-18,0	16,3 ^a ± 2,3	16,9 ^a ± 3,3	0,5682
Hemoglobina (g/dL)	8,0-12,0	9,8 ^a ± 1,7	10,3 ^a ± 2,3	0,4732
Hematócrito (%)	22-38	28,5 ^a ± 6,2	28,8 ^a ± 6,4	0,8913
VCM (fL)	16-25	17,4 ^a ± 2,4	17,2 ^a ± 2,7	0,8282
HCM (pg)	5,2-8,0	5,9 ^a ± 0,5	6,1 ^a ± 0,8	0,4194
CHCM (%)	30-36	34,9 ^a ± 2,2	35,9 ^a ± 1,8	0,1466
Leucócitos Totais (/μL)	4.000-13.000	11.908 ^a ± 3.606,4	11.957 ^a ± 3.663	0,9706
Neutrófilos Bastonetes (/μL)	Raros	0 ^a (0-156)	0 ^a (0-596)	0,6399
Neutrófilos Segmentados (/μL)	1.000-7.200	4.236 ^a (242-11.455)	3.488 ^a (745-10.608)	0,4605
Linfócitos (/μL)	2.000-9.000	6.252 ^a ± 3.108,7	7.332 ^a ± 2.589,1	0,3153
Monócitos (/μL)	0-550	256,5 ^a (0-640)	222 ^a (0-894)	0,8983
Eosinófilos (/μL)	50-650	128,5 ^a (0-390)	274 ^a (0-1.062)	0,1771
Basófilos (/μL)	0-120	0 ^a (0-94)	0 ^b (0-216)	0,0293*

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: ¹Intervalo de Referência proposto para a espécie caprina por Weiss e Wardrop (2010). Estatística via GraphPad Prism 9,5: análise prévia de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, os parâmetros com distribuição normal foram submetidos ao teste t com correção de Welch's para comparação entre os grupos (animais positivos vs negativos), sendo apresentados na forma de média e desvio padrão, os parâmetros que não seguiam distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre os grupos, sendo apresentados na forma de mediana e valores mínimo e máximo. O símbolo * e letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p<0,05) com

nível de significância dia 95%. VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média e CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 11 – Comparação entre valores de bioquímico dos grupos de caprinos positivos e negativos na Nested-PCR de ITS1

Parâmetro	Intervalo de Referência	Caprinos Positivos n=12	Caprinos Negativos n=24	p-value
Uréia (mg/dL)	21,4-42,9	34,1 ^a (4,4-58,5)	35,3 ^a (4,8-61,5)	0,8100
Creatinina (mg/dL)	1,0-1,8	0,9 ^a ± 0,2	1 ^a ± 0,1	0,5430
AST (U/L)	167-513	88,5 ^a ± 16,5	92,8 ^a ± 18,4	0,4854
GGT (U/L)	20-56	35,2 ^a ± 12,4	46,5 ^b ± 12	0,0167*
Proteínas Totais (g/dL)	6,4-7,0	6,7 ^a ± 0,8	6,9 ^a ± 0,7	0,5413
Albumina (mg/dL)	2,7-3,9	2,7 ^a (2,3-3,1)	2,9 ^a (2,3-3,2)	0,1914
Globulinas (mg/dL)	2,7-4,1	3,9 ^a (2,9-5,5)	3,9 ^a (2,9-6,3)	>0,9999
Bilirrubina Total (mg/dL)	-	0,1 ^a (0,1-0,2)	0,2 ^b (0-0,4)	0,0403*
Bilirrubina Direta (mg/dL)	-	0 ^a (0-0,1)	0 ^a (0-0,1)	>0,9999
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	-	0,1 ^a (0-0,2)	0,1 ^b (0-0,4)	0,0457*

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: ¹Intervalo de Referência proposto para a espécie caprina por Weiss e Wardrop (2010). Estatística via GraphPad Prism 9,5: análise prévia de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, os parâmetros com distribuição normal foram submetidos ao test t com correção de Welch's para comparação entre os grupos (animais positivos vs negativos), sendo apresentados na forma de média e desvio padrão, os parâmetros que não seguiam distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico Mann-Whitney para comparação entre os grupos, sendo apresentados na forma de mediana e valores mínimo e máximo. O símbolo * e letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística significante entre os grupos (p<0,05) com nível de significância dia 95%. AST: aspartato amino transferase e GGT: gama glutamil transferase

5.7 COMPARAÇÃO ENTRE TESTES DIAGNÓSTICOS

Para os bovinos o coeficiente *kappa* de comparação entre testes diagnósticos é descrito na Tabela 12, na comparação entre hemocultura e PCR de sangue para *T. theileri* e para as PCR de sangue para *Trypanosoma* spp. e PCR de sangue para *T. theileri* foram encontrados valores de concordância substancial com $k=0,68$ e $k=0,65$, respectivamente.

Para a Nested-PCR de ITS1 e PCR para *T. theileri* em amostras de sangue bovino e na comparação entre hemocultura e PCR para *Trypanosoma* spp. em amostras de sangue bovino foram encontradas concordâncias razoáveis com $k=0,34$ e $k=0,3$, respectivamente

Comparando-se a Nested-PCR de ITS1 de amostras de sangue com as de suabe conjuntival e Nested-PCR de ITS1 em amostras de sangue com a RIFI em amostras de soro dos bovinos a concordância encontrada foi ruim com $k=0,04$ e $k=0,13$, respectivamente.

Para comparação entre Nested-PCR de suabe conjuntival com RIFI do soro de bovinos a concordância foi considerada pobre, com $k=-0,06$.

Tabela 12 – Resultados dos valores de coeficiente *kappa* (*k*) obtidos na comparação de diferentes testes diagnósticos em amostras de bovinos

Teste	Coeficiente kappa (<i>k</i>)	Intensidade da concordância
Hemocultura x PCR para <i>T. theileri</i> (SG)	0,68	Substancial
PCR <i>Trypanosoma</i> spp. (SG) x PCR <i>T. theileri</i> (SG)	0,65	Substancial
Nested-PCR ITS1 (SG) x PCR <i>T. theileri</i> (SG)	0,34	Razoável
Hemocultura x PCR <i>Trypanosoma</i> spp. (SG)	0,3	Razoável
Nested-PCR ITS1 (SG) x RIFI (soro)	0,13	Ruim
Nested-PCR ITS1 (SG) x Nested-PCR ITS1 (SC)	0,04	Ruim
Nested-PCR ITS1 (SC) x RIFI	-0,06	Pobre

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: SG: sangue, SC: suabe conjuntival

Para os ovinos, foram obtidas concordâncias pobres ($k=-0,1$) para Nested-PCR de ITS1 em amostras de sangue em amostras de suabe oral, concordância ruim com $k=0$ e $k=0,2$, respectivamente para Nested-PCR de ITS1 em amostras de sangue e em amostras de suabe conjuntival e para Nested-PCR de amostras de suabe conjuntival e de suabe oral e concordância razoável ($k=0,4$) para Nested-PCR de ITS1 em amostras de sangue e RIFI em amostras de soro (Tabela 13).

Tabela 13 – Resultados dos valores de coeficiente *kappa* (*k*) obtidos na comparação de diferentes testes diagnósticos em amostras de ovinos

Teste	Coeficiente kappa (<i>k</i>)	Intensidade da concordância
Nested-PCR ITS1 (SG) x Nested-PCR ITS1 (SO)	-0,1	Pobre
Nested-PCR ITS1 (SG) x Nested-PCR ITS1 (SC)	0,0	Ruim
Nested-PCR ITS1 (SC) x Nested-PCR ITS1 (SO)	0,2	Ruim
Nested-PCR ITS1 (SG) x RIFI	0,4	Razoável

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: SG: sangue, SC: suabe conjuntival

Para os caprinos, obteve-se concordâncias pobres com $k=-0,1$ para Nested-PCR de ITS1 em amostras de sangue e amostras de suabe conjuntival e para a Nested-PCR de ITS1 em amostras de sangue e na RIFI e concordâncias ruins com $k=0$ para Nested-PCR de ITS1 em amostras de sangue e de suabe oral e para Nested-PCR de ITS1 em amostras de suabe oral e suabe conjuntival (Tabela 14).

Tabela 14 – Resultados dos valores de coeficiente *kappa* (*k*) obtidos na comparação de diferentes testes diagnósticos em amostras de caprinos

Teste	Coeficiente kappa (<i>k</i>)	Intensidade da concordância
Nested-PCR ITS1 (SG) x Nested-PCR ITS1 (SC)	-0,1	Pobre
Nested-PCR ITS1 (SG) x RIFI	-0,1	Pobre
Nested-PCR ITS1 (SG) x Nested-PCR ITS1 (SO)	0	Ruim
Nested-PCR ITS1 (SO) x Nested-PCR ITS1 (SC)	0	Ruim

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: SG: sangue, SC: suabe conjuntival

6 DISCUSSÕES

6.1 IDENTIFICAÇÃO DE *T. THEILERI* EM AMOSTRAS DE BOVINOS

O *T. theileri*, uma espécie de tripanossoma pertencente ao subgênero *Megatrypanum*, é um parasito de sangue de mamíferos transmitido por tabanídeos, com distribuição mundial e elevada prevalência nas regiões tropicais (RODRIGUES et al., 2006).

No presente trabalho foram identificados 11 animais positivos para *T. theileri*, através da PCR de sangue e/ou hemocultura, sendo que durante o exame clínico realizado no momento da coleta de amostras nenhum desses animais apresentavam quaisquer sinais sugestivos de tripanossomose ou outra doença, corroborando com o descrito em literatura sobre a ausência/baixa patogenicidade desse tripanossoma na espécie bovina (BÖSE et al., 1987; DE LA CADENA et al. 2023; GARCIA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2006). Embora os relatos de ocorrência de sinais clínicos pela infecção por *T. theileri* em ruminantes estejam associados às infecções concomitantes causadas por vírus, como o da leucose bovina (MATSUMOTO et al., 2011) e por outros protozoários como *Theileria* spp. (VILLA et al., 2008), à condição de prenhez em fêmeas bovinas (BRAUN et al., 2002; SOOD et al., 2011) e à idade como descrito em bezerros (DOHERTY et al., 1993), animais adultos podem desenvolver sinais clínicos como febre, aumento de linfonodos e anemia (HAJIHASSANI et al., 2020) e apresentar alterações hematológicas como redução nos valores de hemoglobina, albumina e cálcio (SUGANUMA et al., 2022).

Dos 111 bovinos avaliados foram identificados 11 positivos para *T. theileri* utilizando como alvo *primers* específicos para o gene codificador da cathepsina L-like desse tripanossoma em amostra de sangue e/ou de isolados em hemocultura, gerando uma positividade de 10% com esse alvo molecular independentemente do tipo de amostras testada. As positivities por tipo de amostra foram de 7,2% (8/111) na PCR de amostras de sangue e 8,1% (9/111) na PCR de amostras de isolado.

Recentemente, os estudos que buscam identificar *T. theileri* em bovinos também utilizam esses *primers*, sendo encontradas na literatura positivities para amostras de sangue de 26,7% (8/30) por Garcia et al. (2011) na Tailândia, 12,2% (39/320) por Pacheco et al. (2018) em região amazônica do estado de Rondônia no Brasil e 8,6% (3/35) por De La Cadena et al. (2023) em uma região amazônica do Equador.

De acordo com Rodrigues et al. (2010) a PCR com o *primer* TthCatL1 apresentou alta sensibilidade e especificidade na detecção de infecção por *T. theileri* em bovinos e búfalos, ao ser capaz de identificar animais infectados por esse parasito em específico e não amplificar DNA de outros tripanossomas correlatos como *T. vivax*, *T. evansi*, *T. brucei* ssp. e *T. congolense*, demonstrando-se apropriado para a detecção desse tripanosoma em amostras de sangue obtidas a campo em inquéritos epidemiológicos e justificando a escolha desse *primer* no presente trabalho para a identificação dos tripanossomas observados em hemocultura e pesquisa do DNA desse parasito em amostras clínicas de sangue.

Embora tenham sido identificados 11 bovinos positivos para *T. theileri* através da PCR de sangue e/ou hemocultura não foi observada a presença de tripanossoma em nenhuma lâmina de exame parasitológico realizado com as amostras de sangue desses animais. Tal fato pode ser explicado pela baixa parasitemia no momento da coleta, corroborando com o descrito por Fernandez, Baticados e Baticados (2010), Paixão (2017).

Na comparação entre os testes diagnósticos, a PCR para *T. theileri* com os *primers* TthCatL1 e DTO155 apresentou uma concordância substancial com a hemocultura, esta última detectando 9 dos 11 animais positivos para esse tripanossoma. O fato de não terem sido observados tripanossomas nas amostras de sangue de outros 2 animais através do cultivo pode estar relacionada a uma baixa parasitemia, característica da infecção por *T. theileri* em bovinos, corroborando com a não observação desses parasitos no exame parasitológico e com o descrito por Pacheco et al. (2018) e por Rodrigues et al. (2003, 2010). Apesar da comparação entre as PCRs para *Trypanosoma* spp. com os *primers* DTO154 e DTO155 e para *T. theileri* com os *primers* TthCatL1 e DTO155 terem apresentado uma concordância substancial, na primeira foram diagnosticados como positivos apenas 4 animais, já na segunda 8 animais, logo recomenda-se a utilização do conjunto de *primers* TthCatL1 e DTO155 (RODRIGUES et al., 2009) no diagnóstico de tripanossomose por *T. theileri* em bovinos.

Os 11 bovinos positivos para *T. theileri* pertenciam a uma mesma propriedade localizada em Ilha Solteira, da qual foram avaliados um total de 30 bovinos, caracterizando uma frequência de ocorrência de 36,7% desse tripanossoma nesta propriedade. A cidade de Ilha Solteira está localizada no extremo oeste do Estado de São Paulo e seu clima é do tipo “Aw” – quente e úmido com chuvas de verão de acordo com a classificação de Wilhelm Köpen (Sistema de Monitoramento Agrometeorológico – SMA Fundação abc), características climáticas que

podem favorecer a atividade dos tabanídeos vetores de *T. theileri* (BALDACCHINO et al., 2014) em uma região na qual é comprovado o parasitismo desses insetos em animais de produção (COELHO; BRESCIANI, 2013).

O rebanho desta propriedade era leiteiro, criado em sistema intensivo e composto por vacas e touros mestiços. A alimentação era feita a pasto com suplementação de concentrado e os animais eram vermifugados e vacinados periodicamente contra raiva, febre aftosa e brucelose.

A visita à propriedade para anamnese e coleta de amostras foi realizada no mês de janeiro, sendo evidenciada a presença de outros animais, como cães e cavalos e a presença de insetos como a “mosca dos estábulos” (*Stomoxys calcitrans*.) e “mutucas” (*Tabanus* spp.).

6.2 IDENTIFICAÇÃO DE TRIPANOSSOMATÍDEOS PELA NESTED-PCR DE ITS1

A região do ITS (*Internal Transcribed Spacer*), é uma região do RNA ribossomal dos tripanossomatídeos flanqueada por segmentos altamente conservados que servem como base para o desenho de *primers* usados na amplificação do DNA desses organismos. Essa região é rotineiramente utilizada nos estudos de filogenia para tripanossomatídeos, principalmente de *Leishmania* (CUPOLILLO et al., 1995). A região ITS pode ser dividida ainda em ITS1, localizada entre os genes 18S e 5.8S do rRNA e ITS2, localizada entre os genes 5.8S e 28S (AKHOUNDI et al., 2017; DESQUESNES et al., 2001).

A Nested-PCR de região ITS1, com os *primers* LITSR e L5.8S, amplifica produtos da faixa de 300 a 350pb para *Leishmania* spp., gerando resultados positivos para diversas espécies: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (EL TAI et al., 2001; SCHÖNIAN et al., 2003).

No presente trabalho a Nested-PCR de ITS1 utilizando os *primers* supracitados foi capaz de identificar a presença de tripanossomatídeos em amostras de sangue e suabe conjuntival de bovinos e caprinos e amostras de sangue, suabe conjuntival e suabe oral de ovinos. Para todas as amostras (sangue, suabe conjuntival e suabe oral) das três espécies de ruminantes estudadas houve ampliações de bandas com comprimentos de 100 e 200pb, diferente do esperado para *Leishmania* spp.

Ao comparar a Nested-PCR de ITS1 de amostras de sangue, suabe conjuntival e suabe oral as concordâncias observadas foram consideradas ruins ou pobres para as três espécies de

ruminantes estudadas, indicando a necessidade de maiores estudos para identificar quais tripanossomatídeos possam estar sendo identificados nas amostras de suabe.

Neste estudo, as prevalências obtidas utilizando-se a Nested-PCR de ITS1 foram: 23,4% para amostras de sangue e 19,8% para amostras de suabe conjuntival de bovinos, 29,5% para amostras de sangue, 14,7% para amostras de suabe conjuntival e 6,5% para amostras de suabe oral de ovinos e 27,8% para amostras de sangue e 5,5% para amostras de suabe conjuntival de caprinos. Para Nested-PCR de ITS1 são descritas prevalências de 54,4% em amostras de sangue de bovinos (HAN et al., 2018), de 1%, 2,7% e 1,3%, para amostras de sangue de, respectivamente, bovinos, ovinos e caprinos submetidos a Nested-PCR (ROHOUSOVA et al., 2015) e de 23% em amostras de sangue de bovinos (PAIXÃO, 2017), valor este semelhante ao obtido no presente trabalho.

A única amostra de suabe conjuntival positiva na Nested-PCR de ITS1 da qual foi possível obter um sequenciamento adequado, sugeriu se tratar de um *Trypanosoma* spp. com identidade de 93% com *T. simiae* e *T. congolense*, no entanto para uma cobertura de apenas 60% da sequência, indicando os olhos como uma possível localização extravascular de tripanossomas, conforme já evidenciado por Whitelaw, Gardiner e Murray (1988) para a presença de *T. vivax* no humor aquoso dos olhos de cabras.

Das 9 amostras de isolado de sangue bovino positivas para *T. theileri*, todas foram positivas na Nested-PCR de ITS1 amplificando fragmentos na faixa de 300 a 400pb demonstrando a capacidade desse alvo molecular na detecção de DNA de *T. theileri* em um tamanho de fragmento próximo ao amplificado para *Leishmania*.

Os resultados de sequenciamento sugerem que a os produtos amplificados são similares aos tripanossomatídeos pertencentes aos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, sendo que 4 amostras de sangue pertencentes a bovinos tiveram elevada similaridade com *L. major*, com valores de cobertura da sequência acima de 97% e de identidade acima de 88%, corroborando com os estudos de Paixão-Marques et al. (2019) e Vioti et al. (2019) de detecção de *Leishmania* spp. em bovinos. Apesar dessas amostras terem apresentados valores de identidade com sequências de *Leishmania* spp., devido a qualidade das mesmas não foi possível realizar análises filogenéticas, no entanto, mais estudos serão conduzidos para verificar a possível infecção dos animais com esses parasitos.

Os amplificadores sequenciados de 1 caprino e 1 ovino também tiveram suas sequências similares com a de *L. major*, no entanto com baixos valores de cobertura.

Embora tenham sido encontrados resultados positivos na Nested-PCR de ITS1 e similaridade desses resultados com sequências de *Leishmania* spp. a presença de kDNA desse parasito não foi encontrada nas amostras de sangue e suabe conjuntival dos bovinos e nas amostras enviadas para sequenciamento, levantando a necessidade da realização de outros estudos com alvos moleculares diferentes, para melhor identificação de quais tripanossomatídeos se tratam esses amplificadores em Nested-PCR de ITS1.

Apesar de ser bastante utilizada para estudos filogenéticos, a região do ITS1 no presente trabalho apresentou a dificuldade na obtenção de sequências de qualidade, principalmente para o *primer* L5.8S que apresentou falhas em diversas reações sendo necessária repeti-las.

No sequenciamento das amostras de isolados positivas para *T. theileri* os valores de cobertura da sequência e de identidade foram elevados, próximos a 100%, indicando se tratar dessa espécie de *Trypanosoma* e confirmado pela análise filogenética de sequências obtidas a partir das regiões de ITS1 e cdCATL1 desses isolados, que se posicionaram dentro do mesmo grupo de *T. theileri* pertencentes à linhagem TthI encontrada em bovinos e búfalos de regiões Central, Sudeste e Sul do Brasil conforme o descrito por Rodrigues et al. (2006, 2010).

Como os 9 animais positivos no cultivo celular pertenciam a mesma propriedade e todos apresentaram o mesmo padrão de amplificação na PCR para *T. theileri*, optou-se pelo sequenciamento de amostras de isolado de apenas 2 animais.

6.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Como parte dos animais avaliados pertenciam a propriedades localizadas em áreas endêmicas para LV humana e canina (cidades de Ilha Solteira e Andradina) foi realizado um estudo sorológico através da RIFI utilizando antígenos de *L. infantum*.

No presente trabalho foi encontrada uma taxa de 57,6% de bovinos reagentes na RIFI, Paixão (2017) em estudo semelhante com 100 bovinos encontrou uma taxa de 25% de animais reagentes e, semelhante ao presente trabalho a maior concentração de animais reagentes se deu para os títulos 1:40 e 1:80, não sendo encontrados animais reagentes no título de 1:320 em ambos os trabalhos.

Braga, Langoni e Lucheis (2014), em inquérito realizado com felinos, observaram que mesmo que negativos para a presença de *Leishmania* spp. nos testes moleculares e na

hemocultura, os animais apresentavam títulos de anticorpos variando entre 40 e 320 na RIFI, fenômeno também observado no presente trabalho, no qual 54,8% (37/64) dos bovinos reagentes na RIFI não apresentaram resultados positivos tanto para hemocultura quanto para os testes moleculares. Já Giadinis et al. (2015) não encontraram nenhum bovino reagente dentre as 156 amostras de soro avaliadas na RIFI para o antígeno de *L. infantum* em uma área endêmica para LV canina no norte da Grécia.

Foram realizadas buscas na plataforma PubMed[®] com descritores previamente cadastrados nas coleções de termos Medical Subject Headings (MeSH) da National Library of Medicine (NLM) acerca de estudos que utilizaram a RIFI para detecção de ovinos ou caprinos reagentes aos antígenos de *L. infantum*, não sendo encontrados estudos relacionados a esta técnica. Entretanto, por meio de outros testes sorológicos são descritas positivities de 37,6% para ovinos e 10,5% para caprinos em Ensaio de Imunoabsorbância Ligada a Enzima (ELISA) para diagnóstico de *L. infantum* em região endêmica para LV humana na Etiópia (ROHOUSOVA et al., 2015), positividade de 3,77% em caprinos de região endêmica para LV canina na Espanha (SOLSONA et al., 2023) através do teste de ELISA, positividade 6,5% em caprinos através de teste rápido de imunocromatografia com antígeno recombinante K39 (rK39) em região endêmica para LV de Bangladesh (ALAM et al., 2018) e positivities de 23,8% para caprinos e 11,5% para ovinos através do Teste de Aglutinação Direta em área endêmica para LV e LC humanas no Irã (REZAEI et al., 2022).

O presente trabalho encontrou elevadas taxas de ovinos e caprinos reagentes na RIFI para o antígeno de *L. infantum*: 24,6% e 66,7%, respectivamente, sendo que 53,3% (16/30) desses ovinos positivos e 66,7% (16/24) dos caprinos positivos não foram positivos na Nested-PCR de ITS1 para nenhuma das três amostras (sangue e suabes conjuntival e oral) analisadas. Esses achados, assim como para os bovinos podem estar relacionadas à presença de determinantes antigênicos em comum para diferentes espécies de tripanossomatídeos, levando a ocorrência de reações cruzadas conforme demonstrado por Vexenat; Santana; Teixeira (1996) para *T. cruzi*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* no soro de pacientes humanos, por Luciano et al. (2009) para *T. cruzi* e *Leishmania* spp. no soro de cães e por Ferreira et al. (2014) para *T. cruzi*, *T. evansi* e *L. chagasi* em cães. O mesmo foi observado por Zanette et al. (2013) em amostras de soro de cães testados na RIFI para *L. infantum* e patógenos como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *T. cruzi*. Esta hipótese de reação cruzada é reforçada

pelo fato de que 81,8% (9/11) dos bovinos positivos para *T. theileri* foram reagentes na RIFI para *L. infantum*. Desta forma, sugere-se, quando possível, a repetição da sorologia 15 ou 30 dias após a primeira coleta para comparação de resultados, conforme proposto por Paixão (2017).

Na comparação da RIFI com outros métodos diagnósticos as concordâncias foram consideradas razoáveis, ruins ou pobres para as três espécies de ruminantes estudadas, o que corrobora com a hipótese da ocorrência de reação cruzada entre tripanossomatídeos neste teste sorológico.

6.4 TESTE DE IMUNOCROMATOLOGIA – *T. vivax*

Apesar de terem sido identificados 22 bovinos positivos no teste rápido de imunocromatografia para anticorpos específicos contra *T. vivax* nenhum desses animais foi positivo pela PCR para pesquisa do DNA desse tripanossoma, tal fato pode ser explicado devido aos diferentes limiares e alvos de detecção da técnica molecular quando comparada ao teste sorológico de forma que a positividade encontrada no presente trabalho para os bovinos através do teste de imunocromatografia provavelmente indica um contato prévio com *T. vivax* e não uma infecção ativa no momento da coleta das amostras (DESQUESNES et al., 2022).

Dos 22 bovinos positivos no teste rápido, 20 foram reagentes na RIFI com títulos de 1:40 e 1:80, reforçando a hipótese supracitada de uma possível reação cruzada com outros tripanossomatídeos quando utilizada a RIFI para diagnóstico de *L. infantum* em bovinos.

6.5 HEMATOLOGIA

Quando comparados os animais positivos em Nested-PCR de ITS1 com os animais negativos, os únicos parâmetros hematológicos que diferiram estatisticamente entre esses dois grupos foram: monócitos com valor de mediana menor para o grupo dos bovinos positivos e valores de medianas de GGT e bilirrubina total menores para o grupo dos caprinos positivos.

Em relação a diferença entre os grupos de bovinos positivos e negativos para *T. theileri*, houve diferença estatística significativa para os parâmetros: hemácias, hemoglobina, hematócrito, CHCM, AST, proteína plasmática e albumina, com valores de média e mediana maiores para o grupo dos positivos, diferente do descrito por Hajihassani et al. (2020), que observaram valores reduzidos de hemoglobina e hemácia em um bovino infectado com este tripanossoma.

Embora tenham sido encontradas essas diferenças os valores de média ou mediana encontravam-se dentro do intervalo de referência para as espécies proposto por Meyer e Harvey (2004) e Weiss e Wardrop (2010) e as alterações individuais encontradas nos parâmetros hematológicos não estavam relacionadas a qualquer sinal de doença ou alteração em exame clínico.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença e a exposição a tripanossomatídeos foi confirmada em amostras de sangue e suabe conjuntival de bovinos, ovinos e caprinos de cidades endêmicas para leishmanioses do estado de São Paulo através de técnicas sorológicas, moleculares e parasitológicas.

Foi detectada a ocorrência de *T. theileri* linhagem Tth1 em bovinos de uma das regiões estudadas, linhagem esta já identificada em bovinos no Brasil, Equador, Estados Unidos, Sri-Lanka, Filipinas, Vietnã e em búfalos no Vietnã. Não foram identificadas alterações em exames de hemograma e bioquímico e sinais clínicos que sugerissem a ocorrência da doença nestes animais infectados.

A utilização do teste de imunocromatografia para a detecção de anticorpos contra *T. vivax* mostrou-se uma ferramenta rápida para a identificação de bovinos expostos a este parasito, no entanto não foram identificados animais com infecção ativa no momento da coleta, visto os resultados negativos de testes moleculares específicos e de hemocultura.

O sequenciamento de amostras de sangue e suabe conjuntival positivas pelo ITS1 das 3 espécies de ruminantes estudadas mostrou similaridade com DNA de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp., no entanto devido à baixa qualidade do sequenciamento genético de algumas amostras são necessários mais estudos com alvos moleculares diferentes e de análise filogenética para identificação das espécies de tripanossomatídeos em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com as diretrizes para apresentação de teses e dissertações da USP e ABNT.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.3, 2016.

AKHOUNDI, M. et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v.57, 2017.

ALAM, M.Z. et al. An investigation about the possible role of cattle and goats as reservoir hosts for *Leishmania donovani* in Bangladesh. **J. Vector Borne Dis.**, v.55, 2018.

ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v.215, 1990.

ALVES-MARTIN, M.F. Detection of *Leishmania* spp. in Cats: Analysis of Nasal, Oral and Conjunctival Swabs by PCR and HRM. **Animals**, v.13, 2023.

AMATO, B. et al. A case of bovine trypanosomiasis caused by *Trypanosoma theileri* in Sicily, Italy. **Parasitology research**, v.118, 2019.

AUSTEN, J.M.; BARBOSA, A.D. Diversity and Epidemiology of Bat Trypanosomes: A One Health Perspective. **Pathogens**, v.10, 2021.

BAL, M.S. et al., Detection and management of latente infection of *Trypanosoma evansi* in cattle herd. **Indian J. Anim. Res.**, v.48, n.1, 2014.

BALDACCHINO, F. et al. Tabanids: Neglected subjects of research, but important vectors of disease agentes! **Infection, Genetics and Evolution**, v.28, 2014.

BATISTA, J.S. et al. Clinical evaluation and reproductive indices of dairy cows naturally infected with *Trypanosoma vivax*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.38, n.5, Londrina, Brasil, 2017.

BASTOS, T.S.A. et al. Comparision of therapeutic efficacy of different drugs against *Trypanosoma vivax* on experimentally infected cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.181, 2020.

BASTOS, T.S.A. et al. Epidemiological and molecular identification of *Trypanosoma vivax* diagnosed in cattle during outbreaks in central Brazil. **Parasitology**, v.147, 2020.

BENCHIMOL BARBOSA, P.R. The oral transmission of Chagas's disease: An evolution of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, v.112, 2006.

- BHATTARAI, N.R. et al. Domestic Animals and Epidemiology of Visceral Leishmaniasis, Nepal. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.2, 2010.
- BITTNER, L. et al. Malnutrition as the cause of recumbency in suckler cows associated with *Trypanosoma theileri* infection. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.63, n.2, 2021.
- BORGHESAN, T.C. et al. Molecular Phylogenetic Redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a Genus of Insect Parasites Associated with Flies. **Protist**. v.164, 2013.
- BÖSE, R. et al. Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. **Parasitol. Res.**, v.73, 1987.
- BOUCINHA, C. et al. A Stroll Throught the History of Monoxenous Trypanosomatids Infection in Vertebrate Hosts. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, v.12, 2022.
- BOURDEAU, P.; ROWTON, E.; PETERSEN, C. Impact of different *Leishmania* reservoirs on sand fly transmission: Perspectives from xenodiagnoses and other one health observations. **Veterinary Parasitology**, v.287, 2020
- BRAGA, A.R.C.; LANGONI, H.; LUCHEIS, S.B. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.20, n.5, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico: Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas Crônica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. Nota Técnica Conjunta nº001/2016. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento & Ministério da Saúde**, 2016.
- BRAUN, U. *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. **Veterinary Record**, v.150, n.1, 2002.
- BROTÁNKOVÁ, A. et al. Trypanosomes of the *Trypanosoma theileri* Group: Phylogeny and New Potential Vectors. **Microorganisms**, v.10., 2022.

- BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z.R. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, v.79, 1998.
- CADIOLI, F.A. et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Rev. Braz. Parasitol. Vet.**, v.21, n.2, 2012.
- CASTILHO NETO, K.J.G.A. et al. Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v.30, n.1, 2021.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA “PROF. ALEXANDRE VRANJAC” – CVE. **Distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral no Estado de São Paulo**. Disponível em: http://saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv_mapasate2021.pdf. Acesso em: 20 maio 2023.
- CHAO, C.; LEONE, J.L.; VIGLIANO, C.A. Chagas disease: Historic perspective. **BBA – Molecular Basis of Disease**, v.1866, 2020.
- CLAES, F. et al. *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake? **Trends in Parasitology**, v.21, n.7, 2005.
- CLARK, K. et al. GenBank. **Nucleic Acids Res.**, v.44, 2016.
- COELHO, W.M.D.; BRESCIANI, K.D.S. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in a dipteran of the species *Tabanus importunus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.22, n.4, 2013.
- COSTA, R.V.C. et al. Parasitological and clinical-pathological findings in twelve outbreaks of acute trypanosomiasis in dairy cattle in Rio de Janeiro state, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 22, 2020.
- CUPOLILLO, E. et al. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.73, 1995.
- DELL’PORTO, A. et al. Prevalence of *Trypanosoma (Megatrypanum)* spp. in cattle and buffaloes from Vale do Ribeira, SP., Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.91, 1996.
- DE LA CADENA, E. et al. Molecular identification of *Trypanosoma theileri* in cattle from the Ecuadorian Amazon. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v.37, 2023.
- DESQUESNES, M. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. Paris: **OIE**, 2004.

DESQUESNES, M. et al. Diagnosis of animal trypanosomoses: proper use of current tools and future prospects. **Parasites & Vectors**, v.15, 2022.

DESQUESNES, M., GONZATTI, M., SAZMAND, A. et al. A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. **Parasites Vectors**, v.15, p.64, 2022.

DOHERTY, M.L. et al. Clinical disease associated with *Trypanosoma theileri* infection in a calf in Ireland. **Vet. Rec.**, v.132, n.26, 1993.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDi). **2020 Relatório Anual Medicamento para as pessoas**. DNDi. 2020.

ECHEVERRIA, J.T. et al. Clinical and therapeutic aspects of na outbreak of canine trypanosomiasis. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v.28, n.2, 2019.

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

EL TAI, N.O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of *Leishmania danovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, n.94, 2000.

FERNANDEZ, C.P.; BATICADOS, A.M.; BATICADOS, C.A.W. Parasitological examination for *Trypanosoma theileri* infection of cattle from Quirino Province, Philippines. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v.1, 2010.

FERREIRA, L.R. et al. New insights about cross-reactive epitopes of six trypanosomatid genera revealed that *Crithidia* and *Leptomonas* have antigenic similarity to *L. (L.) chagasi*. **Acta Tropica**, v.131, 2014.

FETENE, E. et al. Global distribution, host change, and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. **Parasites vectors**, v.14, n.80, 2021.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 6, 1981.

FIDELIS JUNIOR, O. L. et al. Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 2, p. 203–209, 2019.

GAO, C. 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, 2015.

GARCIA, H.A. et al. High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. **Veterinary Parasitology**, v.180, 2011.

GARCIA PÉREZ, H.A. et al. High *Trypanosoma vivax* infection rates in water buffalo and cattle in the Brazilian Lower Amazon. **Parasitology International**, v.79, 2020.

GIADINIS, N.D. Serological investigation for West Nile virus, *Anaplasma ovis* and *Leishmania infantum* in Greek cattle. **Veterinaria Italiana**, v.51, n.3, 2015.

GIMONNEAU, G.; RAYAISSE, J.B.; BOUYER, J. Integrated control of trypanosomiasis. In: GARROS, C. et al. Pests and vector-borne diseases in the livestock industry: Ecology and control of vector-borne diseases. Wageningen: **Wageningen Academic Publishers**, 2019.

GIORDANI, F. et al. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology**, v.143, 2016.

HAJIHASSANI, A. et al. Hemolytic anemia associated with *Trypanosoma theileri* in a cow from Kurdistan province, West of Iran. **Veterinary Research Forum**, v.11, n.2, 2020.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v.41, 1999.

HAN, S. et al. Epidemiological survey of sheep as potential hosts for *Leishmania* in China. **BMC Veterinary Research**, v.14, 2018.

HERRERA, H.M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.125, 2004.

HOARE, C.A., WALLACE, F.G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology. **Nature**, v.212, 1966.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal, 2020**. Rio de Janeiro, v.48, p.1-12, 2020.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Censo agropecuário de 2017 – CENSO AGRO**. Brasília.

JAISWAL, A.K. et al. Insight into Trypanosomiasis in Animals: Various Approaches for its Diagnosis, Treatment and Control: A Review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v.9, n.5, 2015.

KATOH et al. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. **Nucleic Acids Research**, v.33, n.2, 2005

KAUFER, A. et al. Evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, v.10, 2017.

KOEHLER, K. et al. Cutaneous leishmaniosis in a horse in Southern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.109, 2002.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v.33, n.1, 1977.

LEONEL, J.A.F. **Aspectos bioecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) em área endêmica para leishmaniose visceral no estado de São Paulo.** (Dissertação) Mestrado em Ciências – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

LEONEL, J.A.F. Leishmaniasis in cat shelters: a serological, molecular, and entomological study. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.67, n.5, 2020.

LUCIANO, R.M. et al. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.46, 2009.

LOBSIGER, L. et al. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v.169, 2010.

MARTINS, M.F. et al. *Triatoma williamsi* in intradomiciliary environments of urban areas in Mato Grosso State, Brazil: domiciliation process of a wild species? **Infectious Diseases of Poverty**, v.11, n.18, 2022.

MATSUMOTO, Y. et al. A Case of a Japanese Black Cow Developing Trypanosomosis Together with Enzootic Bovine Leukosis. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v.64, n.12, 2011.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. **Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis.** Ed. Saunders. 2 ed. 2004.

MILLÁN, J.; FERROGLIO, E.; SOLANO-GALLEGO, L. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. **Parasitol. Res.**, v.113, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Interministerial Nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União:** seção I, Brasília, DF, n. 133, p. 37, 14 de jul. de 2008

MORE, S. et al. Assessment of listing categorisation of animal diseases within the framework of Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): *Trypanosoma evansi* infections (including Surra). **EFSA Journal**, v.15, n.7, 2017.

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

NASCIMENTO, K.C.S. **Estudo da interação entre *Trypanosoma caninum* e células macrofágicas: aspectos morfológicos biológicos e ultraestruturais.** (Dissertação) Mestrado em Biologia Parasitária – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

NEI M.; Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. **Oxford University Press**, New York, 2000.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). **Compendium of standard diagnostic protocols for animal trypanosomoses of african origin.** Office International des Epizooties (OIE), 2017.

OLIVEIRA, T. M. F. S. **Animais domésticos como hospedeiros de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* no Brasil.** 119p, 2020. Tese (Livre Docência). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

OLIVEIRA, T.M.F.S. et al. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v.24, n.2, Jaboticabal, 2015.

OLIVEIRA, T.M.F.S. et al. Study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.17, n.1, 2008.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas.** Washington, DC: OPAS; 2022. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56832>. Acesso em: 04. abr.2023.

OSÓRIO, A.L.A.R. et al., *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.103, n.1, 2008.

PACHECO, T.A. et al. Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in cattle in Brazil's western Amazon region. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v.27, n.4, 2018.

PAIXÃO, M.S. **Análise espacial e detecção de tripanossomatídeos em animais de produção de região endêmica para leishmaniose visceral.** 2017. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2017.

PAIXÃO-MARQUES, M. dos S. et al. First isolation of *Leishmania infantum* by blood culture in bovines from endemic area for canine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, 2019.

PALAVESAM, A. et al. Evaluation of multiplex PCR assay for detection of *Babesia* spp. *Ehrlichia canis* and *Trypanosoma evansi* in dogs. **Acta Tropica**, v.188, 2018.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas Disease**. Washington, D.C.: PAHO, 2019a.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Manual of procedures for leishmaniasis surveillance and control in Americas**. Washington, D.C.: PAHO, 2019b.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Guidelines for the treatment of leishmaniasis in the Americas**. 2ed. Washington, D.C.: PAHO, 2022.

PENNISI, M.G. et al. Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.15, 2013.

PÉREZ-MOLINAJ.A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v.391, 2018.

QGIS Development Team. QGIS Geographic Information System. [Internet]. Open Source Geospatial Foundation Project. 2023. Disponível em: <https://qgis.org/en/site/>. Acesso em: 14 set. 2022.

RAMÍREZ, J.D. et al. Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. **Infection, Genetics and Evolution**, v.22, 2014.

RANGEL, O.; SAMPAIO, S.M.P. Spatial distribution of the concentration of tegumentary Leishmaniasis cases in municipalities in the Region of Campinas and the considerations on the spatial limits of the Hydrographic Sub-basins for the construction of the scenario of the Entomological Surveillance in this Region. **Bol. epidemiol. paul.**, v.18, n.214, 2021.

REZAEI, Z. Livestock infected with *Leishmania* spp. in Southern Iran. **Parasites & Vectors**, v.15, 2022.

ROATT, B.M. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.104, 2020.

RODRIGUES, A.C. et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v.116, 2003.

RODRIGUES, A.C. et al. Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: Cathepsin L-like gene sequences as target of phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. **Parasitology International**, v.59, 2010.

RODRÍGUEZ, N.F. et al. Cross-sectional study on prevalence of *Trypanosoma evansi* infection in domestic ruminants in an endemic area of the Canary Islands (Spain). **Preventive Veterinary Medicine**, v.105, 2012.

- ROHOUSOVA, I. et al. Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. **Parasites & Vectors**, v.8. 2015.
- ROVID, A. 2015a. **Durina/Mal do Coito**. Traduzido e adaptado a situação do Brasil por Mendes, Ricardo, 2019. Disponível em: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pt/dourine-PT.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2023.
- ROVID, A. 2015b. **Surra**. Traduzido e adaptado a situação do Brasil por Mendes, Ricardo, 2019. Disponível em: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pt/surra-PT.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- RUIZ, H. et al. Clinical leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in goat: Clinical findings and treatment response. **Animal – Science Proceedings**, v.14, 2023.
- SANTIAGO, M.E.B. et al. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas of Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v.150, n.4, 2007.
- SEIFI, H.A. Clinical Trypanosomiasis due to *Trypanosoma theileri* in cow in Iran. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, v.27, 1995.
- SHÖNIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.47, 2003.
- SILVA, J. A. et al. Reemerging of natural infection by *Trypanosoma evansi* in horses in Arari, Marajó Island, Brazil. **Ciência Rural**, v.46, n.12, 2016.
- SILVA, R.A. et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: phlebotominae) populations. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.113, n.5, 2018.
- SILVA, R. A. M. S. et al. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax***: Biologia, Diagnóstico e Controle. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.
- SINGH, N. et al. Animal reservoirs of visceral leishmaniasis in India. **J. Parasitol.**, v.99, n.1, 2013.
- SISTEMA DE MONITORAMENTO AGROMETEOROLÓGICO. **Classificação Climática: São Paulo**. Fundação ABC. Disponível em: https://sma.fundacaoabc.org/climatologia/classificacao_climatica/sao_paulo. Acesso em: 03 maio 2023.
- SPICKLER, A.R. **African Animal Trypanosomiasis. Last update in October 2018**. Disponível em: https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/trypanosomiasis_african.pdf. Acesso em: 29 maio 2023.

SOARES, I.R. et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 197, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. **Equine Veterinary Journal**, v.35, n.3, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.165, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v.4, n.86, 2011.

SOLSONA, A. et al. *Leishmania infantum* seropositive in goats from a endemic region of canine leishmaniosis. **Animal – science proceedings**, v.14, n.1, 2023.

SOOD, N.K. et al. Association of *Trypanosoma theileri* with peritonitis in a pregnant cross-bred cow: a case report. **Veterinarni Medicina**, v.56, n.2, 2011.

SOUSA, F. das C. A., et al. Epidemiological profile of neglected mandatory reporting diseases in Brazil with analysis of government investments in this área. **Research, Society and Development**, v.9, n.1, 2020.

SOUZA, T.D. et al., Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. **Veterinary Parasitology**, v.200, 2014.

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

STUART, K., et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, n.4, 2008.

SUGANUMA, K. et al. Genetic and seasonal variations of *Trypanosoma theileri* and the association of *Trypanosoma theileri* infection with dairy cattle productivity in Northern Japan. **Parasitology International**, v.86, 2022.

TAMURA K., STECHER G., KUMAR S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, 2021.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TECHNELYSIUM PTY LTD. **Chromas 2.6.6**. Disponível em:
<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>.

TOGAWA, R.C.; BRIGIDO, M.M. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology –

IcoBiCoBi, 14th to 18th May, 2003. Ribeirão Preto. Disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Acesso em: 12 maio 2023.

VALLEJO, G.A. et al. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polimerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Tropica**, v.72, 1999.

VEXENET, A.C.; SANTANA, J.M; TEIXEIRA, A.R.L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.38, n.3, 1996.

VILLA, A. et al. Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. In: Animal Biodiversity and Emerging Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, n.1, 2008.

VIOTI, G. et al. Molecular detection of *Leishmania* spp. in brazilian cattle by means of PCR using internal transcribed spacer 1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, 2019.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6 ed. WileyBlackwell, 2010.

WHEELER, R.J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The limits on Trypanosomatid morphological diversity. **Plos One**, v.8, n.11, 2013.

WHITELAW, D.D.; GARDINER, P.R.; MURRAY, M. Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. **Parasitology**, v.97, 1988.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). **Dourine in horses (*Trypanosoma equiperdum* infection)**. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022. Paris: Office International des Epizooties (OIE), 2013. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>. Acesso em: 27 mar. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis – Fact sheets** Update 2023 January 12. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 30 abr. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **WHO Tech Rep Ser.**, v.5, n.975, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO interim guidelines for the treatment of gambiense human African trypanosomiasis**. Geneva: World Health Organization, 2019.

YASUDA, M.A.S. Emerging and reemerging forms of *Trypanosoma cruzi* transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.

ZANETTE, M.F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Indicação de amostras de DNA positivas enviadas para Sequenciamento de Sanger e sequência de nucleotídeos geradas

Amostra	Sequência de nucleotídeos
B8 SG	TTGATACCACTTATCGCACTTTGCTGCGTTCTTCAACGAAATAGGAAGCCAAGTCATC CATCGCGACACGTTGTGAAAGCCGTGCTCCAAGCACTGGGCGTGTGTTTGTGTACAC ACTGCAGGCTCGAGCGGCAAAAATGTAATTGGAAGGGGTGTTGAGCTCGAACGCCGC CCCCCGAAAGAGAGAGACGCCGAAGCTGGGTTGGGTTTGTGTTTGTATCATCGGA AAATGATCCAGAAAC
B9 SG	ATACCACTTATCGCACTTTGCTGCGTTCTTCAACGAAATAGGAAGCCAAGTCATCCAT CGCGACACGTTGTGAAAGCCGTGCTCCAAGCAGACGACACGGTGTGTGCAAGAAGG CTCGAGCGGCAAAAGTAAGAGAGAGTTGCGTCCGAGCGCCCGAGGGGGACGCCGAA CAGGTTTTGGGTTTTGTTTTTTGATCATCGGAAAATGATCCAGA
B11 SG	ATACCACTTATCGCACTTTGCTGCGTTCTTCAACGAAATAGGAAGCCAAGTCATCCAT CGCGACACGTTGTGAAAGCCGTGCTTCAATCTGATGCTGGAAGCAAGAGATCAAGCG GCAAAAACAATAAAGTTTCGAAGGGGTTTTGATTGCACCACGGGGTGAGCCCGGAT GCGGGTTTTGTTTTTTGTTTTTTGATCATCGGAAAATGATCCA
B16 SG	TTGATACCACTTATCGCACTTTGCTGCGTTCTTCAACGAAATAGGAAGCCAAGTCATC CATCGCGACACGTTGTGAAAGCCGTGCTCCAAGCAGACGACACGGTGTGTGCAAGA AGGCTCGAGCGGCAAAAGTAAGAGAGAGTTGCGTCCGAGCGCCCGAGGGGGACGCC GAACAGGTTTTGGGTTTTGTTTTCTGATCATCGGAAAATGATCCAGAATAAACAAAA CCAAACCTGTTCCGGCTTCCCC
B17 SG	ATACCACTTATCGCACTTTGCTGCGTTCTTCAACGAAATAGGAAGCCAAGTCATCCAT CGCGACACGTTGTGAAAGCCGTGCTTCAATCTGATGCTGGAAGCAAGAGATCAAGCG GCAAAAACAATAAAGTTTCGAAGGGGTTTTGATTGCACCACGGGGTGAGCCCGGAT GACGGCGGTTTATGTTTTTTGTTTTTTGATCATCGGAAAATGATCC
B33 ISO LITSR	CCGCGGGGTGGATAATATATTTTTATGTATGTATATATACATATGTATATTTCTCTTC GCACAGATGTATTACATATTGCATTTTGTCTGTTGTTGTGTGTGGGTGTATATCTCTCA TGCACAGCCTCAGACAGTGCAATAACAAAAAAACTCATGCCGTTGACTCTCTTCCAC ATAATAATTAATTATTATATGGTGATTGTTGAGAACGGCCCCAACACGTGTGCGGAT GGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAAAACGCAGCAAAGTGCG
B33 ISO TthCatL1	TTGATACCATCTATCGCACTTTGCTGCGTTCTTCAACGAAATAGGAAGCCAAGTCATC CATCGCGACACGTTGTTGGGGCCGTTCTCAACAATCACCATATAATAATTAATTATTA TGTGAAGAGAGTCAAGCGGCATGAGTTTTTTTTGTTATTGCACTGTCTGAGGCTGTGC ATGAGAGATATACACCCACACACAACAACAGACAAAATGCAATATGTAATACATCTG TGCGAAGGAGGAAATATACATATGTATATATACATACATAAAATATATTATCCCCC CGCGGTACATATAAAAAATATGTGTAATACAAAATCTCACAAAAATGAAACCAAAAA AAGATCTTTTTCTTGTGATTTGGCTATCCACCAATCCCTCTAAAAAGTACCACATGCTC ATACAGATCAACATGGTCCATTGCTTAACCACATGAAATCCACACAAGTTATTATG GACAAATTAGCAGGGTATAATCTCGTTGCGTTGACGGAATTAACCAACCCCTACC ACGAACTATGAACGGCCATGCACCACTAGCCACCAATCAAGAAGGAACAACCAATC TGTCTATCACCATAATGTCCGGTTCGGGTGAATTTCCCGGGTGAATCAAATAAAAC CTGCAGCTCCACTCCCAGTGGTGCCTTCCGTCAATTTCTTTAAGTTTCAGCTTTGCAA CCATACTTTCCCCGA
B35 SC ITS1	GTCCCCTCGGGCGCTCGGACGCAACTCTCTTACTTTTGCCGCTCGAGCCTTCTTGAC ACACACCGTGTGCTGCTTGGAGCAGGCTTTCACAACGTGTGCGGATGGATGACTT GGCTTCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGAT
B38 SG ITS1	TAAAGCTTCCACGAGTCTTGATGATCCAGTACGGTGGATTGCTGCTGTCATCGTAGC CGACAAGAAGTACGCCGTGGTTCAACTGGTCCGATTACAGTTCGTCAAAAACCACT TACGTACGACAGAAAGCTGTTGGCGTGCACAGCGATAGCAATGGGTCCATTGGTAGC AAGCCATCCGCATCTTGCTCATCTTTGGCAAGTCCACAAAGCCAGTGACTGTGCG CACCACCTCATGTTCACTTGTGAGCAGCCGGCGTTGACCGAGNCCAGAGACGG AAANCTGGCTTTTTAATTGGGTCAAAAA
B38 ISO ITS1	TTGATACCATCTATCGCACTTTGCTGCGTTCTTCAACGAAATAGGAAGCCAAGTCATC CATCGCGACACGTTGTTGGGGCCGTTCTCAACAATCACCATATAATAATTAATTATTA TGTGAAGAGAGTCAAGCGGCATGAGTTTTTTTTGTTATTGCACTGTCTGAGGCTGTGC ATGAGAGATATACACCCACACACAACAACAGACAAAATGCAATATGTAATACATCTG TGCGAAGGAGGAAATATACATATGTATATATACATACATAAAATATATTATCCCCC

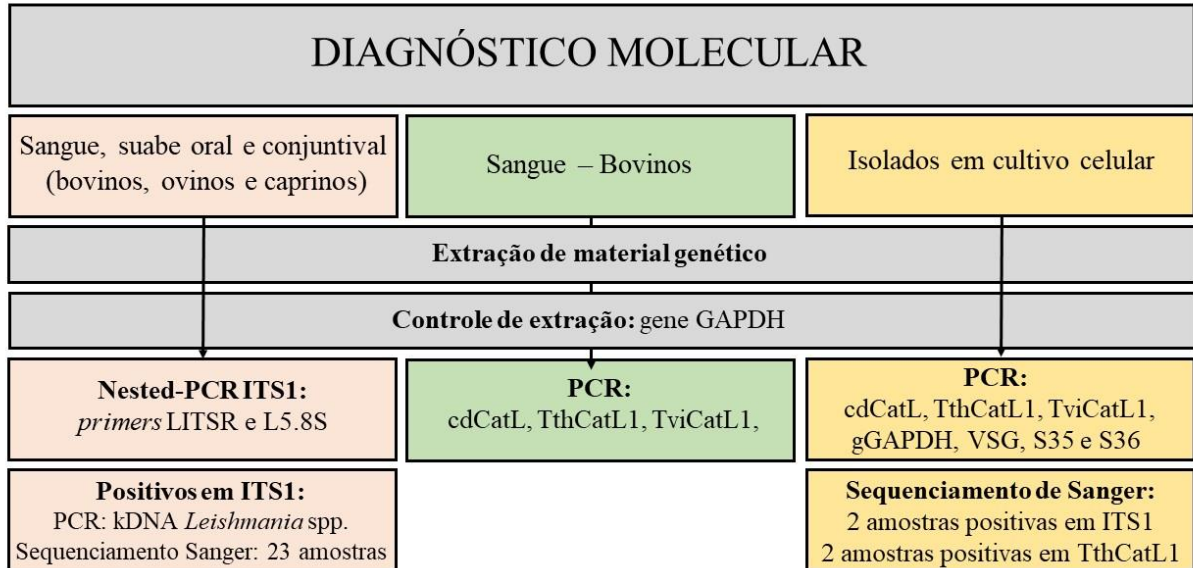
	CGCGGTACATATAAAAAATATGTGTAATACAAAATCTCACAAAAAATGAAACCAAAAA AAGATCTTTTTCTTGTGATTTGGCTATCCACCAATCCCTCTAAAAAGTACCACATGCTC ATACAGATCAACATGGTCCATTGCTTAACCACATGAAATCCACACAAAGTTATTTATG GACAAATTAGCAGGGTATAATCTCGTTCGTTGACGGAATTAACCAAAACCCCCCTACC ACGAACTATGAACGGCCATGCACCACTAGCCACCAATCAAGAAGGAACAACCAATC TGTCTATCACCATAATGTCCGGTTCGGGTGAATTTCCCGGGTTGAATCAAATAAAAC CTGCAGCTCCACTCCCGGTGGTCCCTTCCGTCAATTTCTTTAAGTTTCAGCTTTGCAA CCCATACTTTCCCGGA
B38 ISO TthCatL1	TTTTTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTACGGTGGATTGCTGCTGCATCGT AGCCGACAAGAAGTACGCCGTGGTTCAACTGGTCCGATTACAGTTCGTCAAACAC CACTTACGTACGACAGAAAGCTGTTGGCGTGCACAGCGATAGCAATGGGTCCATTGG TAGCAAGCCATGCCGCCATCTTGTCCCTCATCTTTTGGCAAGTCCACAAAGCCAGTGAC TGTCGCACCAACCTCATGTTCACTGTGAGCAGCGCCGGCTTTGACC
B75 SG ITS1	ATACCACTTATCGCACTTTGCTGCGTTCTTCAACGAAATAGGAAGCCAAGTCATCCAT CGCGACACGTTGTGAAAGCCGTGCTTCAATCTGATGCTGGAAGCAAGAGATCAAGCG GCAAAAACAATAAAGTTTCGAAGGGTTTTGATTGCACCACGGGGGTGAGCCCGGAT GCGGGGTTTTGTTTTTTGTTTTTTGATCATCGGAAAATGATCCA
B86 SG ITS1	GGGGTGTTTTGTGTTAACCCAATGCCGGCTCATGCGGCAAAAAAGTAATTGGAAGG GGTGTGAGGTTGAAAGCCGCCCCCGAAAGAGAGAGAAGCCGAAGATGGTTGGGG TTTTGGTGTTTTGGGTCATTTTTGTGATGATCAAAACAACAAAAACCAACCCGGTTTTG GGTTTTTTTTTTGGGGGGCGGCTTCGAGCTCAACACCCCTTCCAATTACATTTTT GCCGCTCGAGCCTGCAGTGTGTGACAACAAAAACGCCCAAGTGTGGAGCACGGCT TTCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAA GTGCGATAAGTGGTATCAA
C21 SG ITS1	AGAATTA AAAACACTGCCAAATTTTAAAACGTCCCCAGGTAACAAGTAGTTATATTA TTTTCCCCTGAGGCAAGCCGAAAAGTGGCACAAGCGGGGGGGGTTTGGGCCCCGCG GGGAAAATAAACAAATAGGACAGAAATTTTTCCCCAACAGAGCCAATTGTCCCTC AATGTTGATTTTGAAGGTTGGGGGCCAGCCTTTTGTGAAATTCAAACCCCTGTGGGG CACTTGCTCATAAGCGGGGGGGTGGAGTCCCAGTTTTGGGGATGTGTCCTCCAG AGGCCAGATGGCCGCGGAAAAACGCCAGGGTTAAAGGGGATGCAGCCTCCGA GGCCCCAGGGGACGCCGAACCAGCTTGGGGGGTGGTTTTTCTGGGTCATTTTTCGATG ATCAAAAAACA AAAACCCAAACCTGTTTGGGGTCCCCCTCGGGCGCTCGGACGCAA CTCTCTTACTTTTGCCGCTCGAGCCTTCTGACACACACCGTGTCTGCTTGGAG CACGGCTTTCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTTATTTTCGTTGAAGAACG CAGCAAAGTGCANAGTGGTATCAANCTCAGCATTTACAGGGCAGATTTTCATG CACGAAAAGTGAAGTCGAGAATAAAAGCCACTGCCAAGTATTAATACATCCCCAA GTTAAACAAGTAGTAATATTATGTCCACCTGAGGCAAGCAGAAATGTGCCAAGCCC CTCAATTCTGGGCAAGGAGAGAAAAATAAACAAATAGAACAGAAATTTTCCCCACA ACAGACCAATTTGTCCATCAATGTTGATTTTGGGGTCCAGCCATCTGTGAA TTCGAAACCTTTGAGGCCACTAGCTCATGCGCAGTGGGAGTATGGAGCCCAAAGTTT GGACGCTGTGGCCCCGAGAGCCCAGATGGCCACGGAAAGCCAGCCTGGTTCTGGGG GGCCGCCCCCTCCCTGCCGGCACGGCATCCACTTACCTGCAGGGCAGGCTGCTTAAT GGAGGCAATGCGTCTTGGATGGAGCTGGGGCTGCGGGGCGTGGGGTGCATTTTGTG ACTTGGGTACTTTTCTAAGCAGGAGGCAACTTTACTCAGGATCTGGTATGCAATTC TCTCCTGCTGCTTTTCAAGATAATGCCTCCCTCCCCGCATCTTTTTCCATTCTTCTC ATTTTTTAATGTCC
C34 SG ITS1	GTCCCCCTCGGGCGCTCGGACGCAACTCTCTTACTTTTGGCGCTCGAGCCTTCTTGA CACACACCGTGTCTGCTTGGAGCACGGCTTTCACAACGTGTGCGATGGATGACT TGGCTTCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCAGATAAGTGGTAT
O03 SG ITS1	TTTTTAAAGAATTAGAAGGCAAGTTTTTATGCGTCTCGTTGGAAGCCGGTTCCCAA CACGGGGGTGTTTTGTGTCACACAATGCCGCTCAGGGCAAAAAAGTAAATGGAAG GGGGTTGAGTCGAAAGCCGCCCCCGAAAGAGAGAGAAGCCGAGCGGTTGGGTTT TGGTGTTTTTTGGTCATTTTTGTGATGATCAAAACAACAAAAACCAACCCCGCTTGGG GTTTTTTTTTTTTGGGGGGCGGCTTCGAGCTCAACACCCCTTCCAATTACATTTTTG CCGCTCGAGCCTGCAGTGTGTGACAACAAAACAGCCCAGTGTGGAGCACGGCTTT CACAACGTGTGCGATGGATGACTTGGCTTCTTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGT GCGAAAAGTGGTATCAAANNNTAGTTTTGCCGCTGGAAGGTTAGTTCTCCCCGCGGT CCCCCATCCGAAGACAGCAAGCAATTTCTATTGCTGCTTTTGTCTCTTTTGTAAAG TGGCGAAAGTAGTACTTTTTTGTCTCAGGCGCCATCGGGGCTCTCGTCTTGTCAAGT TTATCCCCGCTTCTGCACGGGTGAACCAAGTTTCGCTGAGTGTATGGGGAGACAGTA GACTCTGGGTTTTTACATGGGGGGGGTCTTTACCCCCCCCCCGTGTGATTGCGGT

	ACTTTTCGATGAGCGAAGTATGGCCGCCGTTAAACTGAGTCACGGGGCGGGTGGGAC CTCTTACACATCGATGTTGGTCAGACGCAATGT
O05 SG ITS1	TCCCCTCGGGCGCTCGGACGCAACTCTCTTACTTTTGCCGCTCGAGCCTTCTTGACA CACACCGTGTCTGCTGCTTGGAGCACGGCTTTCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTG GCTTCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCCTAAAGTGGTAT
O13 SG ITS1	GTCCCCCTCGGGCGCTCGGACGCAACTCTCTTACTTTTGCCGCTCGAGCCTTCTTGA CACACACCGTGTCTGCTGCTTGGAGCACGGCTTTCACAACGTGTCGCGATGGATGACT TGGCTTCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAAAGTGCCTAAAGTGGTAT
O30 SG ITS1	CGTCTCTCTTTTCGGGGGGCGGCGTTCGAGCTCAACACCCCTTCCAATTACATTTTT GCCGCTCGAGCCTGCAGTGTGTGACAACAAAACACGCCAGTGTGGAGCACGGCT TTCACAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGAACGCAGCAA GTGCGTAAAGTGGTAT

Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: as letras B, C e O, se referem, respectivamente às espécies bovina, caprina e ovina; SG: sangue; SC: suabe conjuntival e ISO: isolado

APÊNDICE B – Descrição resumida de etapas do diagnóstico molecular para amostras de sangue, suabes oral e conjuntival de bovinos, ovinos e caprinos, amostras de sangue de bovinos e amostras de isolados em cultivo celular de bovinos



APÊNDICE C – Resultados gerais de testes diagnósticos realizados em amostras de sangue e suabes oral e conjuntival e de isolado em cultivo celular de bovinos

Animal	Cultivo SG	ITS1 SG	ITS1 SC	ITS1 SO	DT0154/DT0155 (<i>Trypanosoma</i> spp.)	TviCatL1 (<i>T. vivax</i>)	VSG (<i>T. evansi</i>)	TthCatL1 (<i>T. theileri</i>)	S35/S36 (<i>T. cruzi</i>)	13a13b (<i>Leishmania</i> spp.)	Sequenciamento Sanger	RIFI	Teste Rápido (<i>T. vivax</i>)
Bov01	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov02	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov03	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov04	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov05	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N		1:40	P
Bov06	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:160	Não realizado
Bov07	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N		NR	P
Bov08	N	P	N	Sem DNA	N	N	N	N	N	SC – N	SG - ITS1 <i>L. major</i>	1:40	P
Bov09	N	P	N	Sem DNA	N	N	N	N	N	SG – N	SG - ITS1 <i>L. major</i>	1:40	N
Bov10	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:80	Não realizado
Bov11	N	P	P	N	N	N	N	N	N	SG e SC – N	SG - ITS1 <i>L. major</i>	1:40	P
Bov12	N	P	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SG e SC – N		1:40	N
Bov13	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov14	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov15	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:80	Não realizado
Bov16	N	P	N	Sem DNA	N	N	N	N	N	SG – N	SG - ITS1 <i>L. major</i>	1:80	N
Bov17	N	P	N	Sem DNA	N	N	N	N	N	SG – N	SG - ITS1 <i>L. major</i>	1:160	P
Bov18	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado

Bov19	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:80	Não realizado
Bov20	N	N	N	N	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov21	N	N	N	N	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov22	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov23	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov24	N	N	N	N	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov25	N	N	P	N	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N		NR	N
Bov26	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:80	Não realizado
Bov27	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:80	Não realizado
Bov28	N	P	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SG – N		1:40	P
Bov29	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov30	N	P	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SG – N		1:40	P
Bov31	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov32	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov33	P	P	N	Sem DNA	P	N	N	P	N	SG – N	ISO – ITS1/ TthCatL1 <i>T. theileri</i>	1:40	P
Bov34	N	N	N	Sem DNA		N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	P
Bov35	N	P	P	Sem DNA	P	SG e SC - N	SC - N	SG - P	N (SC)	SG e SC – N	SC - ITS1 <i>T. simiae/ T. congolense</i>	1:40	P
Bov36	P	P	N	Sem DNA	N	N	N	N	N	SG – N		1:40	P
Bov37	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov38	P	P	N	N	P 500	N	N	P 300	N	SG – N	SG - ITS1 ISO – ITS1/ TthCatL1 <i>T. theileri</i>	1:40	P

Bov39	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	1:40	Não realizado
Bov40	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N	1:40	Não realizado
Bov41	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	1:40	Não realizado
Bov42	N	P	N	Sem DNA	N	N	N	N	N	SG – N	1:40	P
Bov43	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	1:40	P
Bov44	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	1:40	Não realizado
Bov45	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	1:40	Não realizado
Bov46	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	1:40	Não realizado
Bov47	N	P	P	Sem DNA	P	N	Não realizado	P	Não realizado	SG e SC – N	1:40	P
Bov48	P	P	N	Sem DNA	N	N	N	P	N	SG – N	1:40	P
Bov49	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	1:40	Não realizado
Bov50	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N	NR	N
Bov51	N	P	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SG e SC – N	NR	P
Bov52	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	NR	Não realizado
Bov53	P	N	N	Sem DNA	N	N	N	P	N	N	1:40	Não realizado
Bov54	P	P	N	Sem DNA	N	N	N	N	N	SG – N	1:40	P
Bov55	P	P	N	Sem DNA	N	N	N	P	N	SG – N	NR	N
Bov56	P	P	N	Sem DNA	N	N	N	N	N	SG – N	1:40	I
Bov57	P	P	N	Sem DNA	N	N	N	P	N	SG – N	NR	N
Bov58	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	1:160	Não realizado
Bov59	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	1:40	Não realizado
Bov60	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N	1:80	N

Bov61	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov62	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:80	Não realizado
Bov63	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:80	Não realizado
Bov64	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov65	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N		1:40	P
Bov66	N	N	N	N	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov67	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:160	Não realizado
Bov68	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N		1:80	P
Bov69	N	N	N	N	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov70	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N		1:80	P
Bov71	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov72	N	P	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SG – N		NR	N
Bov73	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov74	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:80	Não realizado
Bov75	N	P	N	Sem DNA	N	N	N	N	N	SG – N	SG - ITS1 <i>L. major</i>	1:80	P
Bov76	N	N	N	N	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov77	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov78	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov79	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:160	Não realizado
Bov80	N	N	P	N	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N		NR	N
Bov81	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov82	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado

Bov83	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov84	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov85	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov86	N	P	N	Sem DNA	N	N	N	N	N	SG – N	SG - ITS1 <i>L. major</i>	NR	P
Bov87	N	P	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SG – N		NR	P
Bov88	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov89	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov90	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov91	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov92	N	P	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SG – N		NR	N
Bov93	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N		NR	N
Bov94	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov95	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov96	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		1:40	Não realizado
Bov97	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov98	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov99	N	P	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SG e SC – N		1:40	N
Bov100	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N		NR	N
Bov101	N	N	N	N	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov102	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov103	N	N	N	N	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado
Bov104	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado		NR	Não realizado

Bov105	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N	NR	Não realizado
Bov106	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	NR	Não realizado
Bov107	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N	NR	Não realizado
Bov108	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N	NR	Não realizado
Bov109	N	N	P	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	SC – N	NR	Não realizado
Bov110	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	NR	Não realizado
Bov111	N	N	N	Sem DNA	N	N	Não realizado	N	Não realizado	Não realizado	NR	Não realizado

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: SG (sangue), SC (suabe conjuntival), SO (suabe oral), Bov (bovino), N (negativo), P (positivo), NR (não reagente), ISO (isolado)

APÊNDICE D – Resultados gerais de testes diagnósticos realizados em amostras isolado em cultivo celular de sangue de bovinos

Animal	Cultivo	ITS1	gGAPDH	DTO154/DTO155 (<i>Trypanosoma</i> spp.)	TviCatL1 (<i>T. vivax</i>)	VSG (<i>T. evansi</i>)	TthCatL1 (<i>T. theileri</i>)	S35/S36 (<i>T. cruzi</i>)	Sequenciamento Sanger
Bov33	P	P	P	P	N	N	P	N	TthCatL1/ ITS1 <i>T. theileri</i>
Bov36	P	P	P	P	N	N	P	N	Não realizado
Bov38	P	P	P	P	N	N	P	N	TthCatL1/ ITS1 <i>T. theileri</i>
Bov48	P	P	P	P	N	N	P	N	Não realizado
Bov53	P	P	P	P	N	N	P	N	Não realizado
Bov54	P	P	P	P	N	N	P	N	Não realizado
Bov55	P	P	P	P	N	N	P	N	Não realizado
Bov56	P	P	N	P	N	N	P	N	Não realizado
Bov57	P	P	P	P	N	N	P	N	Não realizado

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Bov (bovino), N (negativo), P (positivo)

APÊNDICE E – Resultados gerais de testes diagnósticos realizados em amostras de sangue e suabes oral e conjuntival de ovinos

Animal	Cultivo SG	ITS1 SG	ITS1 SC	ITS1 SO	13a13b (<i>Leishmania spp.</i>)	Sequenciamento Sanger	RIFI
Ov01	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Ov02	N	N	N	P	Não realizado		NR
Ov03	N	P	N	Sem DNA	N	SG - ITS1 <i>L. major</i>	1:40
Ov04	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		NR
Ov05	N	P	N	N	N	SG - ITS1 <i>T. simiae</i> <i>T. congolense</i>	NR
Ov06	N	N	N	N	Não realizado		1:160
Ov07	N	P	N	Sem DNA	Não realizado		1:80
Ov08	N	P	N	N	Não realizado		NR
Ov09	N	N	P	Sem DNA	Não realizado		NR
Ov10	N	P	N	N	Não realizado		1:80
Ov11	N	N	N	N	Não realizado		1:40
Ov12	N	P	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Ov13	N	P	N	N	N	SG - ITS1 <i>T. simiae</i>	1:40
Ov14	N	N	N	P	Não realizado		NR
Ov15	N	N	N	N	Não realizado		NR
Ov16	N	N	P	N	Não realizado		NR
Ov17	N	N	N	N	Não realizado		NR
Ov18	N	P	N	N	Não realizado		NR
Ov19	N	N	N	N	Não realizado		1:40
Ov20	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		1:80
Ov21	N	N	N	N	Não realizado		NR
Ov22	N	P	N	N	Não realizado		1:80
Ov23	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		1:80
Ov24	N	P	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Ov25	N	N	P	Sem DNA	Não realizado		1:40
Ov26	N	N	N	N	Não realizado		1:40
Ov27	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		NR
Ov28	N	P	N	N	Não realizado		NR
Ov29	N	N	N	N	Não realizado		NR
Ov30	N	P	N	Sem DNA	N	SG - ITS1 <i>L. major</i>	NR
Ov31	N	N	N	N	Não realizado		NR
Ov32	N	N	N	N	Não realizado		NR
Ov33	N	P	N	Sem DNA	Não realizado		NR
Ov34	N	N	N	N	Não realizado		NR

Ov35	N	P	N	N	Não realizado	1:40
Ov36	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov37	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov38	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov39	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov40	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov41	N	P	P	N	Não realizado	NR
Ov42	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov43	N	P	N	N	Não realizado	NR
Ov44	N	P	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov45	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov46	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov47	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov48	N	N	N	N	Não realizado	1:80
Ov49	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov50	N	N	P	P	Não realizado	NR
Ov51	N	P	N	N	Não realizado	NR
Ov52	N	N	N	P	Não realizado	NR
Ov53	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov54	N	P	N	N	Não realizado	NR
Ov55	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov56	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov57	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov58	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov59	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov60	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov61	N	P	P	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov62	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov63	N	N	P	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov64	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov65	N	P	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov66	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov67	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	1:80
Ov68	N	P	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov69	N	N	P	N	Não realizado	NR
Ov70	N	P	N	N	Não realizado	NR
Ov71	N	N	P	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov72	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov73	N	P	N	N	Não realizado	NR
Ov74	N	N	N	P	Não realizado	NR
Ov75	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov76	N	P	N	N	Não realizado	1:160
Ov77	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR

Ov78	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov79	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov80	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov81	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov82	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov83	N	N	P	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov84	N	N	P	Sem DNA	Não realizado	1:640
Ov85	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	1:80
Ov86	N	N	P	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov87	N	P	P	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov88	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov89	N	P	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov90	N	N	P	N	Não realizado	NR
Ov91	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	1:40
Ov92	N	N	P	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov93	N	P	N	N	Não realizado	NR
Ov94	N	N	N	P	Não realizado	NR
Ov95	N	N	P	N	Não realizado	1:80
Ov96	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov97	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov98	N	P	N	N	Não realizado	NR
Ov99	N	P	N	P	Não realizado	NR
Ov100	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov101	N	P	P	P	N	NR
Ov102	N	N	N	N	Não realizado	1:80
Ov103	N	P	N	N	Não realizado	1:80
Ov104	N	N	N	N	Não realizado	1:80
Ov105	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	1:160
Ov106	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov107	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov108	N	P	N	N	Não realizado	NR
Ov109	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov110	N	P	N	N	Não realizado	NR
Ov111	N	P	P	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov112	N	N	N	N	Não realizado	1:40
Ov113	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov114	N	N	N	N	Não realizado	1:40
Ov115	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov116	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov117	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov118	N	N	N	N	Não realizado	1:40
Ov119	N	N	N	Sem DNA	Não realizado	NR
Ov120	N	N	N	N	Não realizado	NR

Ov121	N	N	N	N	Não realizado	NR
Ov122	N	P	N	N	Não realizado	NR

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: SG (sangue), SC (suabe conjuntival), SO (suabe oral), Ov (ovino), N (negativo), P (positivo), NR (não reagente)

APÊNDICE F – Resultados gerais de testes diagnósticos realizados em amostras de sangue e suabes oral e conjuntival de caprinos

Animal	Cultivo SG	ITS1 SG	ITS1 SC	ITS1 SO	13a13b (<i>Leishmania</i> spp.)	Sequenciamento	RIFI
						Sanger	
Cap01	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Cap02	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Cap03	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Cap04	N	P	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Cap05	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		NR
Cap06	N	P	N	N	Não realizado		1:40
Cap07	N	P	N	Sem DNA	Não realizado		1:80
Cap08	N	P	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Cap09	N	N	N	N	Não realizado		1:80
Cap10	N	N	N	N	Não realizado		1:80
Cap11	N	N	N	N	Não realizado		1:80
Cap12	N	N	N	N	Não realizado		1:40
Cap13	N	N	N	N	Não realizado		1:40
Cap14	N	N	P	N	N (SC)		1:40
Cap15	N	N	N	N	Não realizado		NR
Cap16	N	P	N	N	Não realizado		1:160
Cap17	N	N	N	N	Não realizado		1:160
Cap18	N	N	N	N	Não realizado		1:80
Cap19	N	N	N	N	Não realizado		1:80
Cap20	N	N	P	N	Não realizado		1:40
Cap21	N	P	N	N	N	SG - ITS1 <i>L. major</i>	1:80
Cap22	N	P	N	Sem DNA	Não realizado		NR
Cap23	N	N	N	N	Não realizado		1:80
Cap24	N	P	N	N	Não realizado		NR
Cap25	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		NR
Cap26	N	N	N	N	Não realizado		1:40
Cap27	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		NR
Cap28	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		NR
Cap29	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Cap30	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Cap31	N	N	N	N	Não realizado		NR
Cap32	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		NR
Cap33	N	N	N	N	Não realizado		NR
Cap34	N	P	N	N	N	SG - ITS1 <i>T. simiae</i> <i>T. congolense</i>	NR
Cap35	N	N	N	Sem DNA	Não realizado		1:40
Cap36	N	P	N	Sem DNA	N		NR

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: SG (sangue), SC (suabe conjuntival), SO (suabe oral), Ov (ovino), N (negativo), P (positivo), NR (não reagente)