

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

ANA PAULA PERES LOPES ROMARIZ

**ESTUDO DE TRIPANOSOMATÍDEOS EM BÚFALOS DOMÉSTICOS (*Bubalus
bubalis*)**

Ilha Solteira
2018

ANA PAULA PERES LOPES ROMARIZ

ESTUDO DE TRIPANOSOMATÍDEOS EM BÚFALOS DOMÉSTICOS (*Bubalus bubalis*)

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Wilma Aparecida Starcke Buzetti

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

R761e Romariz, Ana Paula Peres Lopes.
Estudo de tripanosomatídeos em búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) /
Ana Paula Peres Lopes Romariz. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2018
88 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Ciência e Tecnologia
Animal, 2018

Orientador: Wilma Aparecida Starcke Buzetti
Coorientador: Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira
Inclui bibliografia

1. *Trypanosoma theiler*. 2. *Leishmania infantum*. 3. RIFI. 4. Búfalos.
Parasitologicos. 5. PCR.


Raiane da Silva Santos
Supervisora Técnica de Seção

Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

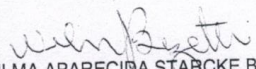
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo de Tripanosomatídeos em Búfalos (*Bubalus bubalis*)

AUTORA: ANA PAULA PERES LOPES ROMARIZ

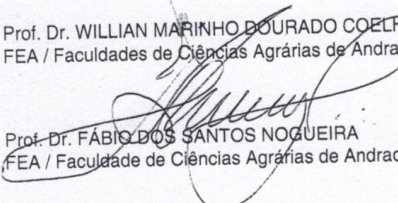
ORIENTADORA: WILMA APARECIDA STARCKE BUZETTI

COORIENTADORA: TRICIA MARIA FERREIRA DE SOUSA OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E
TECNOLOGIA ANIMAL, área: PRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. WILMA APARECIDA STARCKE BUZETTI
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. WILLIAN MARINHO DOURADO COELHO
FEA / Faculdades de Ciências Agrárias de Andradina


Prof. Dr. FÁBIO DOS SANTOS NOGUEIRA
FEA / Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina

Ilha Solteira, 02 de março de 2018

DEDICATÓRIA

Meu amado esposo Marco Antônio Evangelista Romariz, que sempre apoiou em tudo, dando forças e, soube compreender minhas ausências que não foram poucas. Sempre segurou minhas mãos nos piores e melhores momentos, com amor, carinho, paciência dedicação e fidelidade. TE AMO.

Minha filha Mariana Lopes Luvezuti, o maior presente que a vida me concedeu. Que eu possa ser para você um incentivo a nunca desistir dos seus planos e sonhos por maiores que sejam as dificuldades. Acredite sempre em Deus, somente ele tem poder sobre os homens e será sempre conforme a sua vontade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele, eu não teria forças para essa longa jornada.

Meus singelos agradecimentos a Universidade Paulista Estadual “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Ilha solteira.

Ao programa de pós-graduação.

Minha orientadora Prof^a. Dr^a. Wilma Aparecida Starcke Buzetti por compartilhar seus conhecimentos. Obrigado por aceitar como sua orientada, dar conselhos e sempre oferecer estímulos. Sou imensamente grata, sinto orgulho por ter sido orientada por uma profissional tão competente e tão importante no meio científico.

Agradeço de coração a professora Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira, sempre pronta a ajudar mesmo estando longe, pela parceria, realização e processamento de amostras na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo USP, Campus de Pirassununga.

Ao Diogo Tiago da Silva (Firmeza), por me apoiar e me ensinar a maior parte das análises do projeto.

A Julia Cristina Benassi técnica do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo USP, Campus de Pirassununga. O meu muito obrigada pelos ensinamentos e toda paciência durante minhas análises moleculares.

Aos meus queridos e amados alunos da Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina, Ângela, Alípio, Guilherme, William Bethoven, Maria Eduarda, Laís, Daniel, Henrique, Mariana, Edney, todos vocês foram muito importante para que eu concluísse esse trabalho, agradeço imensamente.

A minha querida amiga companheira de trabalho Cícera Galdino da Silva, por ajudar na realização dos exames Hematológicos, Bioquímicos e Parasitológicos, serei eternamente grata por tudo que fez para eu concretizar essa pesquisa.

Aos meus amigos da pós-graduação Amábile Morello, uma pessoa maravilhosa, alegre, companheira, sempre tentando ajudar de varias formas, que realmente se preocupa com os amigos, obrigada pelo apoio do inicio ao fim.

Elis Marina, Jessica, Carol, Gustavo, Pamela, Guilherme, Diego, Keller, Juliana, por dividirem amavelmente seus muitos conhecimentos nas aulas de Estatísticas.

Aos proprietários da Fazenda São Francisco, Eduardo Aziz Haick e Andre Haick, o meu muito obrigada, sem vocês não conseguiria a realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEPE) da UNESP-Campus de Ilha Solteira, pela colaboração no dia da coleta das amostras.

Aos meus amigos que direta ou indiretamente ajudaram com palavras de apoio e dando forças para eu concluir mais essa etapa na minha vida, João Vera, Júlio Spada, Maria Luana, Maria Fernanda, muito obrigada.

Agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina e a todos meus companheiros de trabalho do dia a dia, pela compreensão de minha ausência, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

Aos meus companheiros de trabalho, Fabio dos Santos Nogueira, Carla Renata Baleroni Guerra, Dércio Calister e o Adalberto Bento, obrigada pela confiança e sempre entender minha ausência.

Aos professores de pós-graduação Rosemeire da Silva Filardi, Ricardo Fonseca, Cristiana Atrighetto, Ricardo Velludo, Valquíria Caçao, Leda Gobbo de Freitas Bueno, Cristiano de Botucatu, o meu muito obrigado a todos vocês

Aos animais o meu eterno respeito e carinho que indiretamente forneceram as amostras de sangue para nossa pesquisa. Que os homens da ciência sejam capazes de valorizar esta nobre doação.

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência”

Henry Ford

RESUMO

Tripanosomatídeos são protozoários parasitas flagelados que em ruminantes no Brasil incluem os pertencentes à família Trypanosomatidae, com os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Com relação aos búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*), pouco ou nada se conhece sobre estes parasitas. Este estudo teve como objetivo avaliar por meio de métodos parasitológicos (exame direto do parasita no microscópio), sorológicos (RIFI – reação de imunofluorescência indireta) e moleculares (PCR – reação em cadeia pela polimerase e sequenciamento) a presença de tripanosomatídeos em búfalos. Amostras de sangue e suabe conjuntival foram coletadas de 100 búfalos da Fazenda São Francisco, Andradina, SP e de 10 búfalos de Selvíria, MS. Dos 110 búfalos, 60,9% (67/110) apresentaram hemoflagelares tripanosomatídeos nos esfregaços sanguíneos e 90% (99/110) deles apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* pela RIFI. O DNA destes parasitas foi detectado em 29,09% (32/110) dos búfalos pela técnica de PCR, sendo, 26,36% (29/110) na PCR do sangue e 3,6% (4/110) na PCR do suabe conjuntival. Das amostras positivas para PCR, sete foram enviadas para o sequenciamento gênico, e uma delas foi identificada como *Leishmania infantum* e três como *Trypanosoma theileri*, ambas as amostras apresentaram 100% de similaridade com as respectivas espécies após comparação pelo GenBank. Este estudo relata o primeiro registro de infecção por *L. infantum* em *B. bubalis* na região de Andradina, SP, e a presença de búfalos infectados por espécies de *T. theileri*, evidenciando a necessidade de mais estudos sobre tripanosomatídeos em búfalos.

Palavras-chaves: *Trypanosoma Theiler*. *Leishmania infantum*. RIFI. Búfalos. Parasitológicos. PCR.

ABSTRACT

Trypanosomatides are flagellate protozoan parasites that in ruminants include those belonging to the family Trypanosomatidae, with the genera *Trypanosoma* and *Leishmania*, but with little or nothing information about these parasite infections in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*). This study was assessed through the parasitological (direct examination of the parasite under microscope), serological (IFAT – immunofluorescence antibody test), and molecular tests (PCR from blood and conjunctival swab and genic sequencing) to detect possible trypanosomatides in buffalo herds from Andradina, SP and Selvíria, MS. Thus, 60.9% (67/110) buffaloes presented trypanosomatid parasites in the blood smears, 90% (99/110) had anti-*Leishmania* antibodies by IFAT. The DNA of these parasites was detected in 29.09% (32/110) of buffaloes by the PCR technique; 26.36% (29/110) in blood and 3.6% (4/110) in conjunctival swab. Positive PCR samples from seven animals were sent for DNA sequencing, and one of them was identified as *Leishmania infantum* and three as *Trypanosoma theileri*, both samples showed 100% of similarity with the respective species after comparison by BenBank. This study reports for the first time the presence of parasite *L. infantum* in *B. bubalis* from Andradina, SP, and highlights the presence of buffaloes infected with *T. theileri*, and indicates the need for more studies on trypanosomatid parasites in buffaloes.

Keywords: *Trypanosoma theileri*. *Leishmania infantum*. IFAT. Water buffalo. Parasitological. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Foto do esfregaço sanguíneo de búfalo positivo no parasitológico direto (PA), mostrando nas setas vermelhas as formas flagelares de <i>Trypanosoma</i> spp. Coloração em Panótico Rápido.	39
Figura 2	- Fotos do resultado da eletroforese em gel de agarose mostrando as bandas representadas por bases/pares (bp) de nucleotídeos após a realização da PCR, utilizando o primer específico para protozoários da família Trypanosomatidae (ITS1) de amostras de suabe conjuntival de 100 búfalos, provenientes da Fazenda São Francisco, Andradina (SP).....	41
Figura 3	- Fotos do resultado da eletroforese em gel de agarose mostrando as bandas representadas por bases/pares (bp) de nucleotídeos após a realização da PCR, utilizando o primer específico para protozoários da família Trypanosomatidae (ITS1) de amostras sanguíneas de 100 búfalos, provenientes da Fazenda São Francisco, Andradina (SP).....	42
Figura 4	- Números de búfalos da Fazenda São Francisco e da FEPE (N=110) positivos pela RIFI, de acordo com a titulação de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp. Ilha Solteira, SP, 2018.....	45
Figura 5	- Números totais e porcentagens de búfalos positivos nos métodos RIFI, PA e PCR, provenientes tanto da fazenda São Francisco como da FEPE. Ilha Solteira, SP, 2017. Ilha Solteira, SP, 2018.....	45
Figura 6	- Foto dos búfalos da Fazenda São Francisco	47
Figura 7	- Foto dos búfalos da Fazenda FEPE.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Números e porcentagens de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco do município de Andradina, SP (N=100) e da Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEPE) da UNESP, Selviria, MS, (N=10), positivos no parasitológico (PA), nos exames e na PCR, identificando-se parasitas da família Trypanosomatidae no exame sorológico RIFI para tripanosomatídeos. Ilha Solteira, SP, 2018.....	38
Tabela 2	- Resultado do Sequenciamento de DNA realizado com amostras de sangue de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco do município de Andradina , SP , Ilha Solteira , SP, 2018.....	43
Tabela 3	- Números e porcentagens (%) de búfalos da fazenda São Francisco (N=100) e da Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEPE) da UNESP, Selviria, MS (N=10), positivos no exame sorológico RIFI e sua comparação com o exame PA e PCR, Ilha Solteira, SP, 2018.....	44
Tabela 4	- Análise comparativa entre os métodos de diagnostico de búfalos positivos para infecção por trpanossomatideos, Ilha Solteira,SP,2018.....	45
Tabela 5	- Análise hematológica de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco de Andradina, SP e FEPE, positivos e negativos para a infecção por protozoários da família Trypanosomatidae no parasitológico direto ou na PCR. Ilha Solteira, SP, 2018.	49
Tabela 6	- Análise de valores médios do exame bioquímico do sangue de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco, Andradina, SP e FEPE, positivos e negativos para a infecção por protozoários da família Trypanosomatidae pelo parasitológico direto e PCR. Ilha Solteira, SP, 2018.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiaminotetracético.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
ml	Mililitro
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase,
PBS	Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPT	Proteína Plasmática Total
SP	São Paulo
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
VCM	Volume Corpuscular Médio
USA	United States of America
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitro
KCl	Cloreto de potássio
<i>Mm</i>	Milímetro
mg	Miligrama
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
g	Grama
pmol	Conversão da unidade molar de concentração entre picomol / microlitro e microMola

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Importância do búfalo no Brasil e sua relação com hematozoários.....	15
1.2	Leishmaniose visceral.....	16
1.3	Outras espécies de animais domésticos acometidos por L V.....	21
1.4	Hemoprotzoários (Tripanosomoses) em búfalos	22
1.5	Diagnostico molecular dos tripanosomatideos.....	25
2	JUSTIFICATIVAS.....	27
3	OBJETIVO	28
3.1	Objetivos gerais.....	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Animais e área de estudo	29
4.2	Avaliações clínica dos búfalos	29
4.3	Coletas de amostras biológicas.....	29
4.3.1	Sangue	29
4.3.2	Suabe conjuntival.....	30
4.4	Exames laboratoriais	30
4.4.1	<i>Hemograma completo.....</i>	30
4.4.2	<i>Exame parasitológico.....</i>	30
4.4.2.1	<i>Exame parasitológico direto.....</i>	30
4.5	Exame das hemoculturas.....	30
4.6	Realização de bioquímica sérica.....	31
4.7	Técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) para <i>Leishmania</i> spp	32
4.8	Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	32
4.8.1	<i>Extração do DNA de Leishmania spp.....</i>	32
4.8.2	<i>PCR para Leishmania spp.....</i>	33
4.8.3	<i>PCR para Tripanosomatideos.....</i>	33

4.8.4	Detecção do amplicon.....	34
4.8.5	Controle positivo e negativo	34
4.8.6	Sequenciamento.....	35
4.9	Aspectos éticos	35
4.9.1	Análise estatísticas.....	35
5	RESULTADOS	37
5.1	Parasitológicos e PCR.....	37
5.2	PCR do Sangue e do suabe conjuntival	40
5.3	Análise do sequenciamento do DNA.....	43
5.4	Exame sorológico (RIFI).....	44
5.5	Análise de comparação de métodos pelo índice kappa.....	45
5.6	Análise clínica dos búfalos.....	45
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	59
8	REFERÊNCIAS	60
9	APÊNDICES	77
	APÊNDICE A - Exame hematológico dos búfalos	77
	APÊNDICE B - Exames bioquímicos dos búfalos	81
	APÊNDICE C – Valores hematológicos de búfalos (Andradina) POSITIVOS no PA e na PCR	83
	APÊNDICE D – Valores hematológicos de búfalos (Andradina) NEGATIVOS no PA e na PCR	84
	APÊNDICE E – Valores hematológicos dos búfalos da FEPE (positivos e negativos)	85
	APÊNDICE F – Valores bioquímicos de búfalos (Andradina) POSITIVOS no PA e na PCR	86
	APÊNDICE G – Valores bioquímicos de búfalos (Andradina) NEGATIVOS no PA e na PCR	87
	APÊNDICE H – Valores bioquímicos de búfalos da FEPE (positivos e negativos) no PA e na PCR	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância do búfalo no Brasil

A população mundial de búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) está estimada em aproximadamente 195 milhões de cabeças com a maior concentração no continente asiático (origem da espécie) com 97% dos animais (FAO, 2011). Apesar dos búfalos terem sido introduzidos no país há pouco mais de um século, essa espécie adaptou-se e vem apresentando desempenho produtivo superior ao apresentado no continente de origem (DAMÉ, 2012). Inicialmente mais pelo seu exotismo que por suas características produtivas (BERNARDES, 2007), os primeiros búfalos teriam entrado na Amazônia entre 1890 e 1895, trazidos por condenados foragidos da Guiana Francesa em um barco que aportou na costa Norte da Ilha do Marajó. Seriam da variedade maláia ou chinesa, mas provenientes de Ilha do Caribe ou das Guianas, onde foram introduzidos pelos colonizadores ingleses e holandeses (ABCB, 2017). A mais remota entrada que se tem confirmado é o de uma importação por volta de 1902 feita por Bertino Lobato de Miranda, para sua Fazenda São Joaquim, nas margens do rio Ararí, na Marajó, os quais eram búfalos pretos, de procedência italiana (ABCB, 2017).

O búfalo doméstico (*B. bubalis*), teve portanto sua origem no continente asiático, onde foi levado à África, posteriormente à Europa e Oceania e finalmente à América (DAMÉ, 2006). Variadas condições ambientais, a alta fertilidade e a longevidade produtiva permitiram que em pouco mais de 100 anos, a bubalinocultura no país apresentasse evolução expressiva e relevada importância para diversos criadores. No Brasil, a exploração de búfalos para produção de carne ainda é a mais importante, pois ainda falta interesse dos criadores brasileiros em explorar a produção leiteira (ROSA et al., 2007), entretanto, a partir dos anos 80, cresceu o interesse em animais com aptidão leiteira ou duplo propósito (leite/carne). Considerando as características físico-químicas do leite de búfala, as mesmas apresentam teores de matéria seca (41,1%), gordura (8,5%) e caseína (4,7%) superiores ao do leite bovino, variando de acordo com o nível nutricional do animal. A industrialização desse leite tem gerado produtos diferenciados como mozzarella italiana, provolone e ricota, obtendo remuneração superior aos produtos oriundos do leite bovino (ROSA et al., 2012).

1.2 Leishmaniose Visceral

As leishmanioses são antroponoses causadas por protozoários pertencentes ao filo Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). O gênero *Leishmania* é constituído por 30 espécies que infectam vertebrados de diferentes ordens, principalmente de répteis e mamíferos e que são transmitidas por vários invertebrados hematófagos da família Psychodidae (LAINSON, 1983).

A leishmaniose visceral (VL) é considerada uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial da Saúde (OMS) e que por sua alta letalidade é um problema de saúde pública. A LV é encontrada nas Américas, África, Sul da Europa, Ásia e Oriente Médio (LAINSON et al 1987). Nas Américas, a LV ocorre desde o México até a Argentina, sendo que o Brasil contribui com 90% dos casos do continente (GRIMALDI et al, 1989, WORLD HEALTH ORGANIZATION 1990; SOARES et al, 2003). No Brasil, a prevalência de LV em áreas endêmicas está em torno de 5,9 a 29,8% (FRANÇA-SILVA, et al. 2003; LOPES et al., 2010; LEITE, et al. 2015). No Brasil, sua distribuição atinge cerca de 21 estados (BRASIL, 2012).

A LV foi primeiramente descrita na Grécia em 1835, quando era denominada “ponos” ou “haplopinakon”. Ficou conhecida como calazar (kala-azar) na Índia, que significava “pele negra”, em virtude da leve pigmentação que decorre do acometimento cutâneo. Embora o termo “calazar” seja utilizado para todas as formas da doença, somente o tipo indiano ocasiona hiperpigmentação da pele. É uma doença crônica grave, potencialmente fatal e sua letalidade pode alcançar 10% quando não há um tratamento adequado. Inicialmente, acreditava-se que a doença era causada por três espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, clínica e biologicamente distintas e com diferentes distribuições geográficas: *Leishmania donovani*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* (CAMARGO et al., 2007; LAINSON; SHAW, 1987). Em 1937, Evandro Chagas e Cunha descreveram a espécie *L. chagasi* como causadora da LV na América (CUNHA et., al 1937).

Quanto à origem da LV no Novo Mundo, acredita-se que ela realmente foi introduzida no início da colonização europeia no século XVI, sendo seu precursor a espécie *L. infantum*. Outra teoria é que a *L. chagasi* existia há milhões de anos, com a introdução dos canídeos, esta teoria existe devido às altas taxas de infecção dos

canídeos originários da Amazônia (LAINSON et al., 1987). A espécie foi descrita em 1908 por Charles Nicolle como *L. infantum* (NICOLLE, 1908).

No entanto, mais recentemente analisando-se a constituição morfológica das espécies *L. chagasi* e *L. infantum* verificou-se que estas duas espécies são muito semelhantes. Dessa forma, alguns autores compararam suas estruturas em estudos bioquímicos e moleculares e sugeriram que as duas espécies poderiam ser consideradas como uma única espécie formando um grupo monofilético dentro do complexo *Donovani*, permitindo assim que a espécie *L. infantum* passasse ser o agente etiológico desta zoonose também nas Américas, passando a ser considerada sinonímia de *L. chagasi* (MAURÍCIO et al., 1999; MAURÍCIO et al., 2000; KUHLS et al., 2011).

As leishmanioses são transmitidas através da picada da fêmea de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos por flebotomíneos, de hábito noturno, podendo ser encontrado em todos os meses do ano. Existem duas espécies, a *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, que transmitem a LV no Brasil, vulgarmente chamadas de mosquito palha, tatuquiras, Birigui, entre outros (MONTEIRO et al., 2005). No hospedeiro intermediário, somente as fêmeas dos vetores flebotomíneos participam diretamente do processo de transmissão, uma vez que são hematófagas (BRASIL, 2003).

O ciclo de vida do mosquito vetor da LV é constituído de ovo, larva, pupa e adulto. As larvas são terrestres e bastante ativas, movimentando-se com rapidez para buscar alimento, com isso, provavelmente, se dissemina em uma grande área (SHERLOCK, 2003). Os flebotomíneos se refugiam em locais com bom teor de umidade, pouca ou nenhuma luminosidade, movimentação de ar e com matéria orgânica em decomposição, o que dificulta seu combate e favorece sua adaptação no ambiente doméstico e peridoméstico (AGUIAR; MEDEIROS, 2003). O vetor se infecta ao ingerir formas amastigotas presentes nas células mononucleadas do hospedeiro vertebrado mamífero. Essas formas parasitárias transformam-se em promastigotas procíclicas que possuem moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície, permitindo a interação com lectinas intestinais e consequente adesão ao epitélio do tubo digestório, impedindo sua eliminação junto ao alimento. Tais formas evolutivas reproduzem-se no trato digestório dos flebotomíneos e passam pelo processo de metaciclogênese, transformando-se em promastigotas metacíclicas entre oito e 20 dias (OLIVER et al., 2005). A promastigota metacíclica é

a forma infectante para o hospedeiro mamífero. Estas formas são finas, curtas, altamente ativas e com flagelo medindo mais que a metade do comprimento do corpo (RANGEL; LAINSON, 2003).

Hoje, existem mais de 900 espécies de flebotomíneos descritas no mundo, das quais cerca de 500 ocorrem na região neotropical. O Estado de São Paulo tem 69 espécies registradas em seu território (SHIMABUKURO; GALATI, 2010), incluindo os principais vetores de leishmaniose tegumentar americana *Nyssomyia intermedia* (LUTZ; NEIVA, 1912), *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), *Nyssomyia whitmani* (ANTUNES; COUTINHO, 1939) e da LV americana *L. longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (AGUIAR; MEDEIROS, 2003; GALATI, 2003 a; MARCONDES et al., 1998; ANDRADE-FILHO et al., 2007).

As alterações ambientais ocasionadas pelo homem e, como consequência, a dispersão de animais silvestres que serviam como fonte de alimentação aos insetos, causou a adaptação de muitas espécies a diferentes ambientes (GOMES et al, 1989). Além disso, devido às transformações provocadas pelo intenso processo migratório, por questões econômicas ou sociais, o processo de urbanização cresceu, criando novas áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos. Este fenômeno levou a uma redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de uma epidemia (OLIVEIRA, 2006). Os novos dados epidemiológicos dos últimos 10 anos mostram a periurbanização e urbanização da LV em diversas áreas com Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRUSTOLONI, 2006 BRASIL, 2014).

Na LV, a *L. infantum* apresenta ciclo nos hospedeiros vertebrados e é intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear (BATES, 2007). É uma doença grave, que atinge crianças, adultos jovens ou pessoas imunodeprimidas e, quando não tratada, pode apresentar letalidade de 95%. Em cães, seu principal reservatório doméstico, há uma prevalência significativa, sendo que muitos casos são assintomáticos ou oligossintomáticos (PESSÔA et al 1982; BADARO et al 1996; GENARO, 2000).

O primeiro vestígio dos parasitos é no local da picada. Logo depois ocorre a infecção de vísceras e eventualmente distribui-se através da derme (ALVAR et al., 1994). A LV canina apresenta lesões cutâneas, principalmente dermatite esfoliativa

acompanhada de alopecia, ulcerações, descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha; pequenas úlceras rasas, localizadas no nível das orelhas, focinho, cauda e articulações, descamação e alopecia focais no focinho e região periocular; pelagem sem brilho, quebradiça e de baixa qualidade (ETTINGER; FELDMAN, 1997). Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se, com grande frequência, onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose. Na fase final da infecção, ocorrem em geral a paresia dos membros posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo (NOLI; AUXILIA, 2005). Também podem ocorrer infecções oportunistas concomitantes tais como cistites, pneumonias bacterianas, piodermites, malasseziose, dermatofitoses e demodicoses, devido à imunossupressão causada pela leishmaniose (FEITOSA, 2006).

Até a década de 30, o diagnóstico humano e os inquéritos caninos eram realizados por meio dos exames diretos como a punção de linfonodos, de fígado, de baço e o raspado de pele. Esses exames são seguros quanto à positividade dos casos, mas não eficazes para realizar uma cobertura total dos animais positivos (ADLER, 1932).

Assim, para um melhor diagnóstico dessa doença é necessário fazer a associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos. Os testes laboratoriais são utilizados para evidenciar o parasita ou para detectar componentes da resposta imune, como anticorpos específicos ou reações de tipo celular. Os testes disponíveis incluem os métodos parasitológicos, sorológicos, imunocromatográficos, imunoistoquímicos e moleculares. Para o diagnóstico parasitológico de cães, obtêm-se espécimes clínicos a partir de aspirado de medula óssea, de baço, de fígado, de linfonodos, e em alguns casos, biópsias de pele íntegra. Um dos problemas dos métodos parasitológicos diretos é a baixa sensibilidade, o que leva a taxas de infecções subestimadas e consequentemente permitindo a manutenção de animais infectados em áreas endêmicas (DE PAULA et al., 2003; PORROZZI et al., 2007). A técnica de imunoistoquímica aumenta a sensibilidade para a detecção do parasita em relação à técnica histoquímica, em que os tecidos são apenas corados com hematoxilina e eosina e por isso de difícil

visualização de amastigotas nos tecidos (TAFURI et al., 2004; ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010).

Entre os métodos sorológicos mais utilizados estão a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA), muito utilizados em estudos epidemiológicos (NUNES et al., 2001; ALMEIDA et al., 2005). No entanto, a interpretação dos testes sorológicos na prova de RIFI deve ser criteriosa em função da reatividade cruzada (TRONCARELLI et al 2009; MATOS et al 2015), mas ainda há discussões sobre reatividade cruzada entre os testes sorológicos (ZANETTE et al., 2013). Alguns autores sugerem que pode ocorrer reação cruzada entre leishmaniose visceral, tegumentar e doença de Chagas (LUCIANO et al., 2009; LANGONI, 2016) porque todos os agentes etiológico destas patologias pertencem à família Trypanosomatidae e compartilham um grande número de antígenos, o que favorece a ocorrência de reação cruzada por métodos sorológicos (SOBRINHO et al., 2012). Zanette et al. (2013) compararam os métodos de RIFI e ELISA em cães e indicaram a ocorrência de reatividade cruzada em 42,9% dos cães chagásicos, que também foram reativos pela RIFI para *L. infantum*. Troncarelli et al. (2009) relataram que 16,5% (33/200) de amostras de soro canino mostraram reatividade para *Leishmania* spp. e *T. cruzi* na cidade de Bauru, dos quais 30 foram positivos para *Leishmania* spp. por PCR; indicando a infecção por reações cruzadas de *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. Outro fator é a fraca concordância de testes sorológicos que pode estar relacionada à natureza do antígeno, pois a sensibilidade e especificidade da RIFI podem variar de acordo com a espécie de antígeno utilizada (GONTIJO 2003; SCHWANKE, 2014).

Várias abordagens moleculares têm sido utilizadas na caracterização de espécies do gênero *Leishmania* (ALONSO 2011). Pereira (2016) realizou um estudo comparativo entre as técnicas de PCR de sangue (PCR-SG) e PCR de suabe conjuntival (PCR-SC) e observou maior facilidade de coleta, sendo menos invasiva e dolorosa do que a coleta de sangue. Conforme análise estatística, a associação entre animais positivos na PCR-SC e a presença de sinais clínicos foi estatisticamente significativa e a sensibilidade da PCR-SG em detectar um maior número de animais sem sinal clínico também foi significativa. Enquanto a qPCR-SG não foi capaz de detectar *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos, a qPCR-SC foi capaz de detectar o parasito nas três espécies avaliadas. Dessa forma, a associação entre a qPCR e o uso de um método prático, fácil e não invasivo, como o

suabe conjuntival, representa um grande avanço no diagnóstico da doença em cães, gatos e equinos (BENASSI et al., 2017).

A sensibilidade das técnicas pode variar durante a evolução da doença bem como entre indivíduos, por isso se faz necessário uma combinação de técnicas sorológicas e moleculares para confirmar o diagnóstico da LVC (NUNES, 2007; ASSIS et al., 2010; QUEIROZ et al., 2010; SILVA et al., 2013).

1.3 Outras espécies de animais domésticos acometidos por LV

No ambiente silvestre, os reservatórios de LV são principalmente raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) (DEANE, 1956; LAINSON et al., 1990) e marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) (SHERLOCK, 1996; CORREDOR et al., 1989). Nas regiões rurais, periurbanas e urbanas, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório da infecção para o homem (RAMIRO et al., 2003). Segundo Caldas et al. (2001), os roedores constituem um dos grupos de animais sinantrópicos mais procurados pelos flebotomos, o que reforça necessidade desses animais serem estudados como possíveis reservatórios de *L. chagasi*.

Um estudo em uma área endêmica de leishmaniose tegumentar e visceral mostrou que as espécies *Rattus rattus* e *Thrichomys apereoides* foram encontrados naturalmente infectados por espécies de *Leishmania* (OLIVEIRA et al., 2005). Além dos roedores, os gatos também têm sido encontrados naturalmente infectados (FIGUEIREDO et al., 2009), mas pouco se sabe sobre a importância epidemiológica destes animais como reservatórios da doença. O diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. tem sido relatado em cachorros-do-mato (*C. thous*) (LUPPI et al., 2008; SOUZA et al., 2010; TENÓRIO et al., 2011), o qual é apontado como hospedeiro natural do parasito (FERREIRA et al., 2013). Porém, a importância do *C. thous* como reservatório de *Leishmania* spp. depende do seu potencial de infectar os vetores flebotomíneos e de reintroduzir a infecção em uma população de cães livres da doença (DRESSEN, 1990).

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

Alemanha (KOEHLER et al., 2002). *Leishmania siamensis* também foi identificada em vacas provenientes da Suíça (LOBSIGER et al., 2010) e a participação desta espécie animal como reservatório da doença foi observada em estudos pretéritos (MUKHTAR et al., 2000; BHATTARAI et al., 2010; KHANAL et al., 2010; SINGH et al., 2013). No Brasil, poucos estudos foram realizados avaliando a participação de animais de produção na epidemiologia da LV. Recentemente na Bahia, foi investigado a participação de bovinos, caprinos, equinos e ovinos como reservatórios da doença. Nas espécies avaliadas foi possível amplificar o DNA do parasita no sangue periférico de 25% (5/20) do bovino (JULIÃO, 2011).

Em uma pesquisa em uma aldeia no Nepal, utilizando-se o exame PCR como método de diagnóstico em sangue de humanos, cabras, vacas e búfalos. Neste estudo ficaram constatado Infecções por *Leishmania* em humanos (6,1%), vacas (5%), búfalos (4%), e cabras (16%). Os dados foram referenciados e entrou em um sistema de informação geográfica (BHATTARAI et al., 2010).

O papel das aves, particularmente das galinhas (*Gallus gallus*), na cadeia epidemiológica da LV ainda não está totalmente elucidado. Apesar dessas aves possuírem a capacidade de atrair o vetor *L. longipalpis*, elas não são capazes de manter a infecção (ALEXANDER et al., 2002; OTRANTO et al., 2010), provavelmente pela elevada temperatura corporal (ALEXANDER et al., 2002).

Além dessas espécies citadas anteriormente, se faz necessário analisar também os búfalos domésticos (*B. bubalis*), uma vez que esses têm conquistado cada vez mais espaço na pecuária brasileira, principalmente em função da boa adaptabilidade desses animais aos trópicos (JORGE, 2001).

1.4 Hemoprotozoários (tripanosomoses) em búfalos

Em relação às doenças parasitárias, os búfalos, assim como os bovinos são espécies frequentemente acometidas por hemoprotozoários, como, por exemplo, o *Trypanosoma* spp, que infectam uma grande variedade de animais ungulados selvagens e domésticos, podendo causar grande impacto na produção de ruminantes na África, Américas Central e do Sul e Caribe (OSÓRIO et al. 2008).

São designados *Trypanosoma* spp os parasitas hemoflagelados pertencentes à família Trypanosomatidae. As diversas tripanosomoses podem ser causadas por um grande número de espécies de *Trypanosoma*, acometendo todas as classes de

vertebrados, a saber: anfíbios, répteis, aves e mamíferos, incluindo aqui os búfalos, estando presente em todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta (LEVINE, 1973), em áreas onde existem seus respectivos vetores artrópodes hematófagos (HOARE, 1965). Além disso, as diversas espécies de *Trypanosoma* são encontradas em sua maioria no sistema circulatório e fluídos tissulares dos hospedeiros e são divididas em dois grupos Salivária e Stercorária, de acordo com seu desenvolvimento no vetor e forma de transmissão, que poderá ser através da saliva injetada contendo o parasita (Salivária) ou pela contaminação fecal no local da picada (Stercorária). No entanto, sabe-se que o *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma theileri* são do tipo Stercorária, pois o estágio final do parasita se desenvolve no intestino posterior do vetor e dessa forma o parasita é transmitido pela contaminação fecal (SCHUSTER ; SCHAUD, 2000), por moscas tabanídeas (BOSE et al., 1987) e carrapatos (LATIF, et al., 2004).

O *Trypanosoma vivax* é um protozoário pertencente ao grupo Salivaria subgênero *Duttonella*, tipicamente cinetoplástico, apresentando-se como formas celulares tripamastigotas no hospedeiro vertebrado e epimastigotas no vetor invertebrado, medindo entre 20 µm a 26 µm de comprimento, apresentando um único flagelo livre, assemelhando-se muito com o *Trypanosoma brucei* (GARDINER, 1989).

Antes da primeira referência no Brasil em 1946, em bovinos do estado do Pará (BOULHOSA, 1946), a presença do *T. vivax* foi registrada na Venezuela em 1920, na Colômbia em 1931 e no Suriname e Guiana em 1939 (JONES; DÁVILA, 2001). Entretanto, é considerado o primeiro registro oficial de *T. vivax* em búfalos nas cercanias de Belém realizado por Shawn e Larson (1972). Na região norte, posteriormente no final da década de 1970 e início de 1980 houve vários diagnósticos desse parasito em bovinos, bubalinos e ovinos dos estados do Pará e Amapá (SERRA-FREIRE, 1981).

Posteriormente, *T. vivax* foi diagnosticado no Estado do Pará em 1972, infectando búfalo (MADRUGA et al. 1999). Em seguida, o protozoário foi detectado em búfalos nos estados do Amapá (SERRA-FREIRE 1981), Mato Grosso (OSÓRIO et al. 2008), Tocantins (LINHARES et al. 2006), Minas Gerais (CARVALHO et al. 2008), Paraíba (BATISTA et al., 2007), Maranhão (GUERRA et al., 2008) e recentemente no estado de Pernambuco (PIMENTEL et al. 2012). Embora com alguns estudos em muitas regiões do Brasil, é necessário ainda analisar dados

provenientes da região do Oeste Paulista, a qual possui numerosos rebanhos bubalinos.

Em 1995 foi realizada a identificação de *T. vivax* em um surto em bovinos no Pantanal da região de Poconé, estado de Mato Grosso (SILVA et. al, 1996). Esse surto caracterizou-se por manifestações de febre, anemia profunda, lacrimejamento, queratite, edema, perda de peso que resultaram em morte (SILVA et. al, 1996). A anemia foi um achado muito comum nesta tripanosomose em bovinos, havendo também a insuficiência cardíaca congestiva, devido aos danos no miocárdio (SANNUSI, 1979), sendo estas as principais causas de mortalidade dos animais infectados naturalmente (MURRAY et al., 1979c).

Em infecção experimental de bovinos com *T. vivax*, Moraes (2001) verificou que a parasitemia era relativamente baixa nos primeiros 60 dias da enfermidade e continuava reduzindo progressivamente, especialmente a partir do 120º dia pós infecção e não havia correlação direta entre a temperatura e a parasitemia. Além disso, não havia alteração dos valores normais com relação aos parâmetros hematimétricos e bioquímicos (MORAES, 2001). As principais lesões encontradas nos bovinos experimentalmente infectados com *T. vivax* eram moderadas e consistiam de hepatite focal, miocardite focal, nefrite focal, hiperplasia folicular dos linfonodos, pneumonia focal e adrenalite (MORAES, 2001).

Uma outra espécie que acomete ruminantes é o *T. theileri*, um parasita de bovinos transmitido por tabanídeos que é altamente prevalente em todo o mundo (HOARE, 1972; WELLS, 1976). Esta espécie está atribuída ao subgênero *Megatrypanum* por uma classificação baseada na sua morfologia original. Foi descrita pela primeira vez em bovinos por Theiler, Laveran e Bruce em 1902 (citado em Hoare, 1972). Além do bovino, tripanosomas morfologicamente indistinguíveis de *T. theileri* têm sido descritos em búfalos, ovinos, caprinos e ruminantes selvagens (RODRIGUES et al., 2006). A ocorrência de formas epimastigotas de um tripanosomatídeo na hemolinfa do carrapato do bovino *Boophilus microplus* sugerem tratar-se de *T. theileri*, espécie descrita como não patogênica aos bovinos e que usualmente é transmitida por tabanídeos (MARTINS et al., 2008).

Além disso, numerosos registros de *T. theileri* em bovinos, normalmente detectados acidentalmente durante a cultura celular, foram relatados na Europa (França, Alemanha, Inglaterra, Escócia, Bélgica, Itália e Espanha), América do Norte (EUA, Canadá), América do Sul (Brasil) e Ásia Bangladesh) (WELLS, 1976,

SCHLAFER, 1979; SAMAD; SHAHIDULLAH, 1985; KENNEDY, 1988; VERLOO et al., 2000; GRECO et al., 2000; VILLA et al., 2008). *Trypanosoma* (subgênero *Megatrypanum*) *theileri* foi identificado pela primeira vez há mais de cem anos e é um parasita generalizado no bovino. Seu ciclo de vida dentro do hospedeiro de mamífero raramente foi relatado. Se é que existe um estágio intracelular nos tecidos é desconhecida e esse estágio não foi demonstrado experimentalmente (LEE et al., 2010). O *T. theileri* induz infecções crônicas potencialmente patogênicas para animais sob estresse físico e nutricional severo, para bezerros recém-nascidos e vacas prenhes quando associado às doenças infecciosas concomitantes. Além disso, a Infecção de *T. theileri* pode persistir por um longo tempo sem quaisquer sinais clínicos. A depressão do sistema imunológico permite uma maior parasitemia e dispersão de *T. theileri* através de vários órgãos e do sistema nervoso central (WARD et al., 1984; SEIFI, 1995, BRAUN et al., 2002; VILLA et al. , 2008). No entanto, muito poucos isolados derivados de culturas foram molecularmente caracterizados (RODRIGUES et al., 2006; HAMILTON et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010a; RODRIGUES et al., 2010b).

Com o objetivo de avaliar a ocorrência de tripanosomatídeos no município de Bauru-SP, região endêmica para leishmaniose, Paixão (2017) examinou 200 animais, sendo 100 bovinos (*Bos taurus*) e 100 equídeos (*Eqqus spp.*), procedentes de áreas urbanas e periurbanas do município. O diagnóstico dos animais foi baseado em técnicas parasitológicas, como esfregaço sanguíneo e hemocultura; sorológicas (RIFI e ELISA); PCR e sequenciamento. Em amostras de bovinos positivas à PCR foram identificadas espécies do gênero *L. infantum*, *L. donovani* e *T. theileri* e em amostras de equídeos, foram identificadas espécie do complexo *Leishmania: Leishmania donovani*. Os resultados obtidos nas provas parasitológicas, sorológicas e/ou moleculares sugeriram a presença de tripanosomatídeos em animais de produção do município no Bauru-SP (PAIXÃO, 2017).

1.5 Diagnóstico molecular dos tripanosomatídeos

A sensibilidade da PCR pode ser aumentada, quando, como alvo de detecção do parasito, utiliza-se sequências representadas em múltiplas cópias do genoma, sendo que a escolha dos primers que irão amplificar regiões alvos, permitirá adaptar a especificidade da técnica (BRITO, 2014).

O ITS é uma região não codificante encontrada na subunidade menor do ribossomo (SSU-rRNA), onde o ITS-1 é delimitado pelos genes 18S e 5.8S, enquanto o ITS-2 pelos genes 5.8S e 28S. Esse espaçador tem sido descrito na identificação de espécies de *Leishmania* e de suas linhagens por meio da PCR-RFLP (SCHÖNIAN et al., 2003). No entanto, eles também amplificam sequências de outros tripanosomatídeos (TENÓRIO et al., 2014).

A PCR realizada com ITS-1 apresentou bons resultados em amostra de sangue, aspirado de medula ou esfregaços de lâminas coradas com Giemsa. Esses iniciadores podem amplificar regiões de outros tripanosomatídeos, inclusive de *T. cruzi*, com produtos que variam de 300 a 760pb de tamanho. Apesar do baixo número de cópias do rDNA em comparação ao kDNA, suas subunidades são bem exploradas no desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnóstico da infecção por *Leishmania*, sendo esse alvo um dos mais explorados na identificação de espécies (SILVA et al., 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Os búfalos são animais domésticos de grande importância mundial e apresentam ótimo desempenho produtivo no Brasil. Apesar do seu crescimento expansivo e de sua comprovada produtividade, existem poucas pesquisas envolvendo a espécie, sendo escassas as informações sobre a prevalência dos tripanosomatídeos e a importância epidemiológica destes parasitas na região Noroeste do estado de São Paulo.

Atualmente, existem na literatura, alguns trabalhos detectando o protozoário na espécie bubalina, no entanto, pouco ou nenhum relato há sobre leishmaniose em búfalos no Brasil. A LV é uma zoonose considerada, dentre as doenças negligenciáveis, a que se encontra em maior expansão com grande impacto e prejuízo à saúde pública e, o conhecimento dessa parasitose em búfalos, pode acrescentar dados importantes e relevantes aos mecanismos de transmissão da doença.

A relevância deste estudo foi devido à importância mundial da LV e à dificuldade de controle da mesma, o que demanda contínuas pesquisas relacionadas à doença. Além disso, o búfalo por já ter sido diagnosticado com *T. vivax* ou *T. theileri* no Brasil, pode ser considerado um portador assintomático destes parasitos e um reservatório potencial de transmissão a outras espécies mais susceptíveis, como os bovinos leiteiros. Dessa forma, a presente pesquisa foi conduzida no sentido de se realizar um levantamento sobre a ocorrência de espécies de tripanosomatídeos que podem acometer a espécie bubalina, na região em estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Realizar a identificação de espécies de tripanosomatídeos que acometiam naturalmente os búfalos domésticos (*B. bubalis*) da região Noroeste (Andradina) do estado de São Paulo e de Selvíria, estado do Mato Grosso do Sul.

3.2 Objetivos Específicos

1. Realização de exames parasitológicos diretos (esfregaço sanguíneo e cultura de sangue).
2. Realização de PCR e sequenciamento gênico de amostras sanguíneas e de suabe conjuntival.
3. Realização do exame sorológico RIFI.
4. Avaliação clínica dos animais: condição do escore corporal, hemograma e exames bioquímicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Área de Estudo

Foram avaliados 110 búfalos, machos e fêmeas, entre oito e 12 meses de idade, procedentes da Fazenda São Francisco próximo ao perímetro urbano do município de Andradina que está localizado a 620 km da capital, na região Noroeste do estado de São Paulo. Além disso, avaliou-se 10 bezerros búfalos, com idades aproximadas de um ano de vida pertencentes à Fazenda Experimental e Pesquisa da UNESP - Campos de Ilha Solteira (FEPE) que está localizada no município de Selvíria, MS, à margem direita do rio Paraná com divisa ao município de Ilha Solteira, SP.

4.2 Avaliações Clínica dos Búfalos

Todos os animais foram avaliados clinicamente: estado geral, frequências cardíaca e respiratória, coloração de mucosas, avaliação de linfonodos e particularidades observadas por sistema acometido.

Exames laboratoriais como o hemograma completo e exames bioquímicos também fizeram parte da avaliação clínica dos animais.

4.3 Coletas de Amostras Biológicas

4.3.1 Sangue

As coletas de sangue dos búfalos foram realizadas diretamente por punção da veia jugular, sendo coletados 10 mL de cada animal. Para isso significaram alguns cuidados como: lavagem com sabão e antissepsia prévia do local com álcool iodado. As amostras de sangue foram coletadas em frascos “vacutainers” com e sem anti-coagulante. A primeira amostra de sangue com o anti-coagulante EDTA foi destinada para a realização do esfregaço sanguíneo, hemograma e o exame molecular. A amostra destinada para o exame molecular foi congelada em freezer a -70°C até a extração do DNA. A segunda amostra, sem o anti-coagulante foi

destinada para a obtenção do soro imune para a realização dos exames sorológicos do tipo RIFI.

4.3.2 Suabe Conjuntival

Amostras de células foram coletadas da conjuntiva ocular de cada búfalo, tanto no olho do lado direito como no esquerdo, com auxílio de suabes estéreis. Após a coleta, os suabes foram colocados em microtubos plásticos com capacidade de 1,5 ml (livres de DNases e RNases), que foram identificados e mantidos à temperatura de 4°C, até o processamento por análise molecular.

4.4 Exames Laboratoriais

4.4.1 Hemograma Completo

O sangue total com EDTA foi processado em analisador hematológico automático (Sysmex pochH-100iVTM), no máximo 24 horas após a coleta, para obtenção do valor de leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina, plaquetas e proteínas totais. O valor do volume globular (VG) foi obtido pela leitura de microcapilar, após centrifugação do sangue total em microcentrífuga (Microline, Laborline). Os índices hematimétricos, como volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos valores de VG, hemoglobina e eritrócitos. A contagem diferencial de células leucocitárias foi realizada em lâminas contendo o esfregaço sanguíneo, contando-se um total de 100 células.

Os exames hematológicos foram realizados no laboratório do Hospital Veterinário de Andradina, Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina – SP.

4.4.2.1 Exame Parasitológico

4.5 Parasitológico Direto (PA)

O exame parasitológico direto (PA), por meio de esfregaços sanguíneos, foi realizado com intuito de observar hemoparasitas, mas principalmente , *Trypanosoma*

spp. e *Leishmania* spp., corados em Panóptico rápido® (Hematocor-Biocolor) ou Giemsa (Sigma).

O esfregaço sanguíneo por extensão foi realizado da seguinte forma: uma gota de sangue foi depositada em lâminas de vidro limpas e desengorduradas, com o auxílio de outra lâmina realizando-se uma extensão da amostra biológica, formando o esfregaço, que após a secagem e a coloração apropriada foi visualizado diretamente em microscópio ótico sob objetiva de imersão. Foi classificado positivo o esfregaço que apresentasse alguma forma do parasito e negativo quando sem a visualização do parasita em pelo menos 300 campos microscópicos visuais. Os exames parasitológico direto foi realizados no laboratório do Hospital Veterinário de Andradina, Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina – SP e no laboratório de Imunologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Faculdade De Engenharia , Campus de Ilha Solteira - SP.

4.5 Exame das hemoculturas

Para a realização da hemocultura, foram separados três tubos contendo, em cada um deles, 5 mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) estéril. A manipulação das amostras de sangue dos búfalos (n = 10) da FEPE, foi realizada em capela de fluxo laminar, previamente limpa com álcool 70% e mantida sob a ação de luz ultravioleta por 15 minutos.

4.6 Realização de Bioquímica Sérica

O sangue coletado em frascos sem anticoagulante foi centrifugado logo após a formação do coágulo, em centrífuga clínica, a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi alocado em frasco de polipropileno de 1,5 ml (tipo eppendorf) e levado ao analisador automático (Cobas c111®, Roche), para determinação de parâmetros bioquímicos, como uréia, creatinina, AST, ALT, proteínas totais, albumina (A). Para cada analito determinado foi utilizado kits específicos (Cobas c111, Brasil), seguindo a metodologia estabelecida de acordo com o fabricante. Antes da realização da rotina, utilizou-se soro controle padrão (Cobas c111, Brasil), para assegurar a confiabilidade dos exames. Os exames foram realizados no prazo máximo de 24 horas após a coleta. A realização dos exames de bioquímica sérica foi realizados no

laboratório do Hospital Veterinário de Andradina, Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina – SP.

4.7 Técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A técnica de RIFI foi realizada para detecção de anticorpos anti-*Leishmania spp* segundo Camargo (1966). Nas lâminas fixadas com o antígeno de *L. infantum*, foram distribuídos 10 µL de soro diluído (segunda diluição), incubando-se a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Logo foram lavadas três vezes com PBS 0,01 M, pH 7,4 por cinco minutos, posteriormente foram secas em estufa. O conjugado espécie-específico (Anti-Bovine IgG (whole molecule, FITC, Sigma®, USA), foi diluído segundo título pré-estabelecido em solução de Azul de Evans a 20%, no qual foi previamente diluído em PBS 0,01M pH 7,4 na proporção de 1:5. Em seguida, adicionou-se 10 µL do conjugado para cada diluição, incubando-se novamente a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Procedeu-se novamente as lavagens por três vezes com PBS 0,01 M pH 7,4 por 5 minutos e logo as lâminas foram secas em estufa e montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínulas de 24x60 mm, examinando-as em microscópio de Imunofluorescência na objetiva de 40x. Depois da leitura dos controles, procedeu-se a leitura das amostras dos soros dos animais do estudo, considerando-se positivas as amostras de soro com título igual a 1/40. Os soros positivos a partir de diluição 1:40, foram reavaliados após diluições seriadas para se determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em búfalos. Dessa forma a titulação máxima obtida foi de 1:320.

A RIFI foi realizada no laboratório de Imunoparasitologia II da Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Faculdade De Engenharia, Campus De Ilha Solteira -SP.

4.8 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.8.1 Extração do DNA

Extração de DNA do sangue total dos animais foi realizada utilizando-se o kit de extração DNA Isolation Kit for Cells and Tissues (Qiagen, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A extração de DNA do suabe conjuntival foi

realizada pela técnica de *salting out* descrita por Lahiri e Nurnberger (1991) com algumas modificações. A realização da extração de DNA foi realizado no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada (LMVPA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo USP, Campus de Pirassununga.

4.8.2 PCR para *Leishmania* spp.

A PCR para detecção de *Leishmania* spp. foi realizada conforme técnica descrita por Rodgers, Popper e Wirth (1990). As condições para a reação foram: 2,5 µL de tampão (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl, pH 8,4), 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL de dNTP's (10 mM cada), 1,5 µL de cada primer (10 pmol/µL), 0,15 µL de Taq (5 U/µL - Invitrogen®), 2,5 µL de DNA (10 ng/µL) e água Milli-Q o suficiente para completar 25 µL. A amplificação foi conduzida em termociclador (Veriti®, Applied Biosystems®), com ciclos de desnaturalização inicial a 94° C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desmaturação a 94° C durante 40s, pareamento a 56° C por 30s e extensão a 72° C durante 30s, com extensão final a 72° C por 5 minutos. O produto final amplificado da reação positiva para *Leishmania* spp. é de 120 pares de base (pb). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram o 13A (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3') e 13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3'), que amplificam um segmento conservado do minicírculo do cinetoplasto do gênero *Leishmania* spp. A realização da PCR para *Leishmania* spp foi no LMVPA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo USP, Campus de Pirassununga.

4.8.3 PCR para tripanosomatídeos

Os *primers* utilizados para a PCR de tripanosomatídeos foram os LITSR (5' - CTGGATCATTTTCCGATG - 3') e o L5-8S (5' - TGATACCACTTATCGCACTT - 3'), descritos previamente por El Tai et al. (2000) para a região do ITS1. De acordo com a quantidade de amostras, a mistura para a amplificação foi preparada utilizando: tampão de PCR (50mM Tris-HCl; 10mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP's, 2U de Taq-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®),

12,5pmol de cada iniciador e água deionizada estéril. Para a primeira amplificação foram adicionados 2,5µL de DNA extraído de cada amostra para 22,5µL de reação. Em seguida, a reação de amplificação foi conduzida em um termociclador. A desnaturação inicial será de 95°C (4 min), seguida de 35 ciclos de 95°C (30 seg), 53°C (30 seg) e 72°C (1 min). A extensão final foi de 72°C (5 min). Finalizada essa etapa, para a Nested-PCR, foram adicionados 2,5µL do produto amplificado na primeira reação a 22,5µL de uma nova mistura preparada como descrito anteriormente. A segunda reação de amplificação foi conduzida novamente em um termociclador, seguindo as mesmas etapas de desnaturação, anelamento e extensão final descritas. O produto final amplificado da reação positiva apresenta de 300 a 350bp de comprimento, sendo variável de acordo com a espécie de *Leishmania* ou outros tripanosomatídeos (SCHÖNIAN et al., 2003). A PCR para tripanosomatídeos foi realizado no LMVPA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo USP, Campus de Pirassununga.

4.8.4 Detecção do Amplicon

Os produtos de PCR foram visualizados pela luz ultra-violeta (UV) após a eletroforese em gel agarose 1,5%, contendo o corante SYBR® safe (Invitrogen®) em tampão Tris-borato (pH 8.0). O marcador de DNA de 100bp - DNA Molecular Weight Marker (Amresco®) foi utilizado para estimar o tamanho do amplicon.

4.8.5 Controles Positivo e Negativo

Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA de *L. infantum* (MCAN/BR/1984/CCC-17.481), *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. braziliensis* (MCAN/BR/1987/CLIOC-898) e *T. cruzi* cedidas pelo Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, e como controle negativo, água deionizada estéril. Amostras de cães sabidamente positivos e negativos (exames parasitológicos, sorológicos e moleculares positivos e negativos) também foram utilizadas como controles positivos e negativos.

4.8.6 Sequenciamento

Após eletroforese em gel de agarose a 2%, os produtos da PCR com os *primers* ITS1 foram retirados do gel e purificados usando o *kit* Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare, New York, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando 20ng/ul de produto purificado da PCR e 5μM de cada *primer*. As amostras foram enviadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - Instituto Biológico (IB) da Universidade de São Paulo (USP). Os cromatogramas obtidos com os *primers* senso e anti-senso foram montados no software Sequence Scanner 2 v2.2 e submetidas ao BLAST para a recuperação de sequências semelhantes a serem comparadas no Clustal W (disponível no *software* BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 7.1.11, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado para analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTN), objetivando-se procurar e comparar genes similares em banco de dados internacionais (GenBank) com as sequências obtidas.

4.9 Aspectos Éticos

Esse estudo teve seu conteúdo apresentado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Faculdade de Engenharia da UNESP de Ilha Solteira, em reunião ordinária realizada em 16 de outubro de 2017, sob o número Protocolo N°.CEUA – FEIS/UNESP 04/2017.

4.9.1 Análise estatística

Para avaliar a concordância entre os diferentes métodos de diagnóstico, calculou-se o índice Kappa (κ) de concordância, (intervalo de confiança 95%), usando-se o programa Biostat, versão 4.0 (AYRES et al., 2005), sendo $\kappa < 0,4$ aceito como concordância fraca, $0,4 < \kappa < 0,7$ como boa e $\kappa > 0,7$ como ótima.

De acordo com o teste F não houve diferença significativa no exame bioquímico, ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$). R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2018).

Comparação de médias no hematológico, pelo teste de Tukey. Letras minúsculas diferentes (a, b, e c) indicam significância estatística entre colunas ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$). Programa R version 3.1.1 (R CORE TEAM, 2018).

5 RESULTADOS

5.1 Parasitológico e PCR

Foram avaliados aproximadamente 110 bezerros búfalos, entre machos e fêmeas, de idades variando de oito e 12 meses, procedentes da Fazenda São Francisco, situada próxima ao perímetro urbano do município de Andradina (n = 100) e bezerros búfalos, com idades aproximadas de 12 meses (n = 10), provenientes da Fazenda de Ensino e Pesquisa da UNESP, situada no município de Selvíria, MS, às margens direitas do rio Paraná com divisa ao município de Ilha Solteira, SP.

Na Tabela 01 estão os dados dos exames parasitológicos diretos (PA) realizados por meio do esfregaço sanguíneo e do exame molecular realizado em amostras de sangue total e do suabe conjuntival, por meio da técnica de PCR, dos 110 búfalos provenientes da Fazenda São Francisco. Observa-se que 60,91% destes animais apresentavam formas de protozoários flagelares da família Trypanosomatidae no parasitológico, sendo que 26,36% das amostras de sangue e 3,64% das amostras de suabe conjuntival apresentaram positividade na PCR, quando se utilizou primers do tipo ITS-1 que identificam DNA da família Trypanosomatidae. Dessa forma, dando um total de 32 (29,10%) búfalos positivos, considerando-se a PCR do sangue (PCR/Sg) e a do suabe (PCR/Su). No entanto, levando-se em conta os exames parasitológicos e a PCR juntos, pode-se afirmar que 77/110 (70%) dos búfalos provenientes da Fazenda São Francisco e da FEPE encontravam-se positivos por estes protozoários flagelados tripanosomatídeos (Tabela 01). Cabe aqui ressaltar que apenas um animal da FEPE deu reatividade na PCR (1%) e nenhum no parasitológico PA, demonstrando, portanto, positividade dos animais da fazenda São Francisco em 76/100 (76%) dos animais em ambos os exames realizados.

Quando as mesmas amostras de DNA dos animais da fazenda São Francisco e da FEPE foram utilizadas para a realização da PCR utilizando-se os primers 13 A e 13 B, que identificam DNA de protozoários do gênero *Leishmania*, nenhuma banda foi observada, nem no sangue e nem no suabe conjuntival, demonstrando uma negatividade das amostras testadas.

Tabela 01 - Números e porcentagens de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco, Andradina, SP (N = 100) e da Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEPE) da UNESP, Selvíria, MS (N = 10), positivos nos exames parasitológico (PA) e na PCR, identificando-se parasitas da família Trypanosomatidae. Ilha Solteira, SP, 2018.

Números e porcentagens (%) de búfalos POSITIVOS para tripanosomatídeos, no PA e na PCR (N = 110)		
Métodos	Números	%
PA	67	60,91
PCR* Sg	29	26,36
PCR* Su	04	03,63
PCR* Sg + PCR* Su	32	29,09
PA/PCR* Su e Sg**	01	0,91
PA/PCR* Su ou Sg**	21	19,09
PCR*Sg e Su + PA***	77	70,00

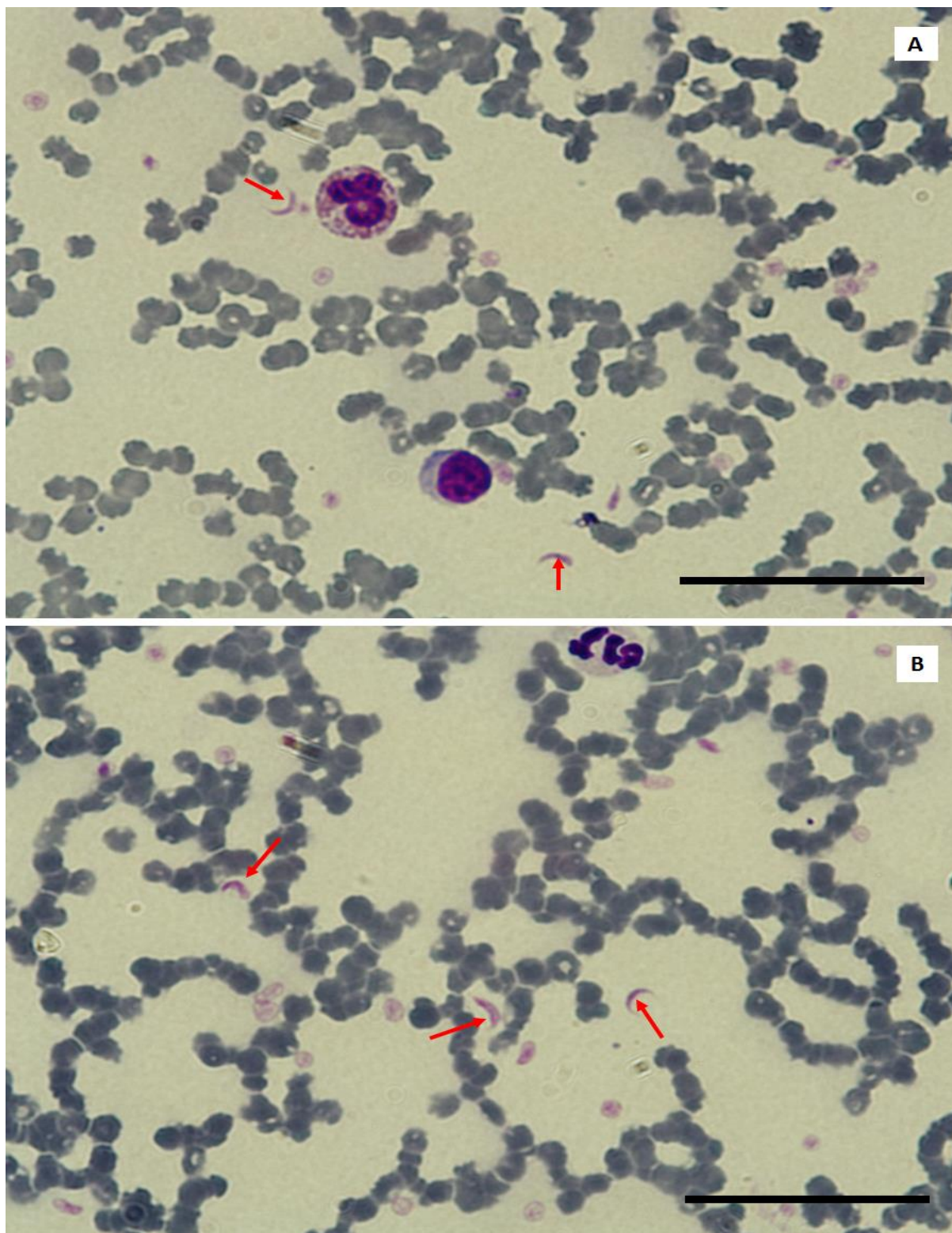
Fonte: Dados do próprio autor. * = PCR com primer ITS1; ** = animais positivos concomitantemente no PA e na PCR tanto no sangue (Sg) como no suabe; (Su); *** = somatória de animais positivos no PA e na PCR (Sg ou Su); PA: parasitológico; Sg: sangue; Su: suabe.

A Figura 01 ilustra imagens obtidas em microscópio de luz branca, na objetiva de 100x, de esfregaços sanguíneos de búfalos da Fazenda São Francisco, contendo parasitas flagelados da família Trypanosomatidae, corados com Panótico rápido.

Desta forma, da fazenda São Francisco, 67/100 (67%) dos búfalos apresentavam formas de protozoários flagelares do sangue, dos quais 21 deles (21%) com concomitância com os resultados positivos na PCR (Sg) nos primers ITS-1. Apenas em um animal, houve concomitância na PCR do sangue e do suabe, nas amostras do animal de nº 15, que estava positivo também no PA (Tabela 01).

Na hemocultura realizada com o sangue dos 10 búfalos da FEPE, em nenhuma delas visualizou-se o parasita.

Figura 01 - Foto do esfregaço sanguíneo de búfalo positivo no parasitológico direto (PA), evidenciadas pelas setas vermelhas, as formas flagelares de *Trypanosoma* spp. Coloração em Panótico Rápido.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

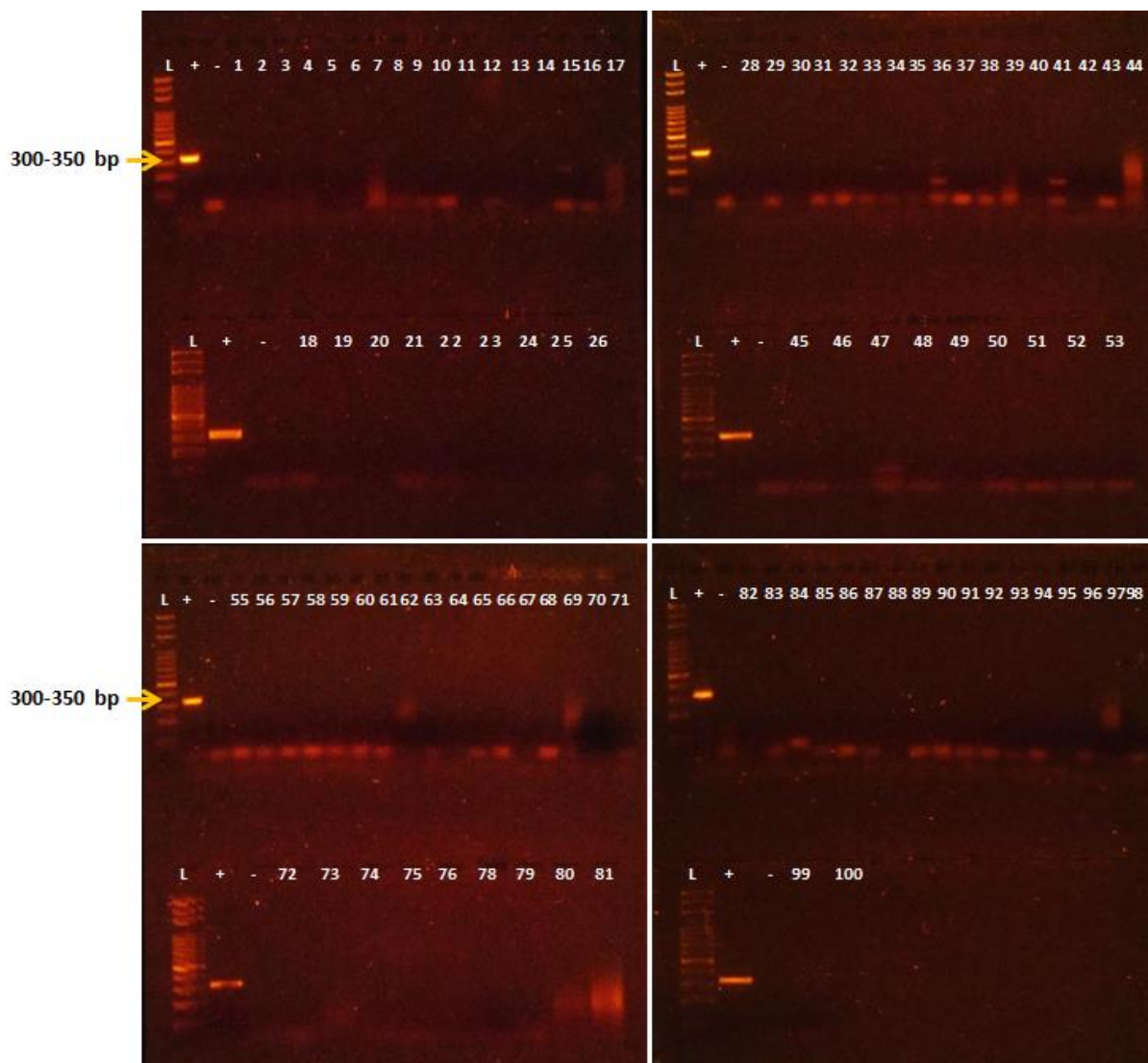
5.2 PCR do Sangue e do Suabe Conjuntival

O resultado da amplificação do DNA de amostras sanguíneas e de suabe conjuntival de búfalos da Fazenda São Francisco, utilizando-se o primer ITS-1 do parasita da família Trypanosomatidae, pode ser visualizado na Figura 02 (amostras de sangue) e na figura 03 (amostras do suabe).

Observa-se que as amostras sanguíneas de 28 búfalos apresentaram bandas de DNA no gel de agarose, das quais 10 foram consideradas bandas fracas (animais de nºs. 5, 8, 12, 15, 48, 69, 70, 83 e 95) e 18 animais com bandas fortes (animais de nºs. 53, 54, 55, 58, 59, 60, 61, 63, 71, 72, 73, 74, 75, 78, 80, 82, 86 e 90), com bandas variando de 200, 300/350 e 400 bp (figura 02).

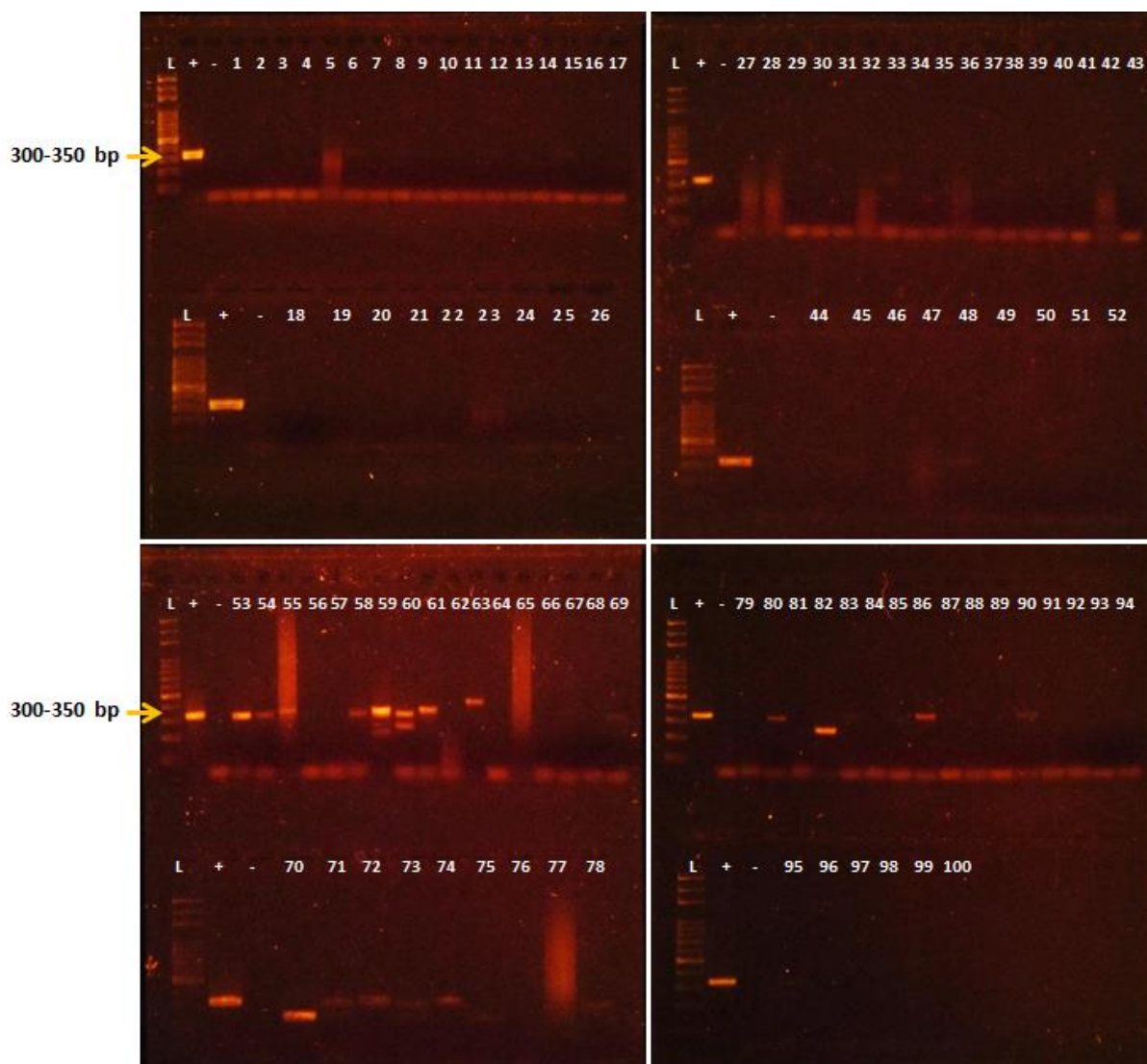
No suabe conjuntival, as bandas positivas foram dos seguintes animais: nºs. 15, 35, 41 e 47 e todas consideradas bandas fracas (Figura 03).

Figura 02 - Fotos do resultado da eletroforese em gel de agarose mostrando as bandas representadas por bases/pares (bp) de nucleotídeos após a realização da PCR, utilizando-se o primer específico para protozoários da família Trypanosomatidae (ITS1) de amostras de suabe conjuntival de 100 búfalos da Fazenda São Francisco, Andradina (SP).



Fonte: Dados do próprio autor

Figura 03 - Fotos do resultado da eletroforese em gel de agarose mostrando as bandas representadas por bases/pares (bp) de nucleotídeos após a realização da PCR, utilizando-se o primer específico para protozoários da família Trypanosomatidae (ITS1) de amostras sanguíneas de 100 búfalos da Fazenda São Francisco, Andradina (SP).



Fonte: Dados do próprio autor.

5.3 Análise do Sequenciamento do DNA

O sequenciamento foi realizado com os produtos de DNA amplificados e purificados pela PCR com os primers ITS-1 utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare, New York, USA) no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - Instituto Biológico (IB) da Universidade de São Paulo (USP). Das 07 amostras enviadas para sequenciamento, quatro delas (57,14%) foram positivas, das quais, a amostra de nº 53 foi para *L. infantum* e três (amostras de nºs. 61, 86 e 90) foram positivas para *T. theileri*, em 100% de similaridades com as respectivas espécies após comparação com genBank. (Tabela 02).

Tabela 2 - Resultado do sequenciamento de DNA realizado com amostras de sangue de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco do município de Andradina, SP. Ilha Solteira, SP, 2018.

Animal	Nome da Amostra	Análise do sequenciamento (Sequência consenso)	% Identificação
Búfalo 53	Consenso (TMF-5 e TMF-6)	CTATGTATATATATGTAGGCCTTTCCACATACACAGCAA AGTTTTGTACTCAAAATTTGCAGTAAAAAAGGCCGATC GACGTTATAACGCACCGCCTATACAAAAGCAAAATGTCC GTTTATACAAAAAATATACGGCGTTTCGGTTTTGGCGGG GTGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCG CGATGGATGACTTGGCTTCCTAT	100% <i>Leishmania infantum</i>
Búfalo 61	Consenso (TMF-9 e TMF-10)	ATAATATATATATTATGTATATGTATTTCTCCTTCGCACA GATGTATTACATATTGCATTTTGTCTGTTGTTGTGTGG GTGTATTATATATATATATCTCATGCACAGCCTCAGACAG TGCAATAACAAAAAACTCATGCCGCTTGACTCTCTTCA CATAATAATTATTTATTATGTGTGATTGTTGAGAACGGCC CCAACAACGTGTGCGGATGGATGACT	100% <i>Trypanosoma theileri</i>
Búfalo 86	Consenso (TMF-15 e TMF-16)	TTATATGTACCGCGGGGTGGAATAATATATATATTATGTA TATGTATTTCTCCTTCGCACAGATGTATTACATATTGCAT TTTGTCTGTTGTTGTGTGTGGGTGATTATATATATATATC TCATGCACAGCCTCAGACAGTGCAATAACAAAAAACTC ATGCCGCTTGACTCTCTTCACATAATAATTATTTATTATGT GTGATTGTTGAGAACGGCCCCAACAACGTGTGCGGATGG ATGACT	100% <i>Trypanosoma theileri</i>
Búfalo 90	Consenso (TMF-17 e TMF-18)	ATTATATGTACCGCGGGGTGGAATAATATATATATTATGT ATATGTATTTCTCCTTCGCACAGATGTATTACATATTGCA TTTTGTCTGTTGTTGTGTGTGGGTGATTATATATATATAT CTCATGCACAGCCTCAGACAGTGCAATAACAAAAAACT CATGCCGCTTGACTCTCTTCACATAATAATTATTTATTATG TGTGATTGTTGAGAACGGCCCCAACAACGTGTGCGGATG GATGACT	100% <i>Trypanosoma theileri</i>

Fonte: Próprio autor

5.4 Exame Sorológico (RIFI)

No exame sorológico 99/110 (90%) dos búfalos apresentaram reatividade positiva, utilizando-se o antígeno de *L. infantum*. A titulação dos anticorpos anti-*Leishmania* spp variou entre 1/40 e 1/320, sendo que 18, 38, 38 e 5 búfalos apresentaram, respectivamente os títulos de 1/40, 1/80, 1/160 e 1/320 (Figura 04). Seis búfalos da FEPE (60%) apresentaram reatividade na RIFI, mas também com títulos baixos de anticorpos, variando de 1/40 a 1/180.

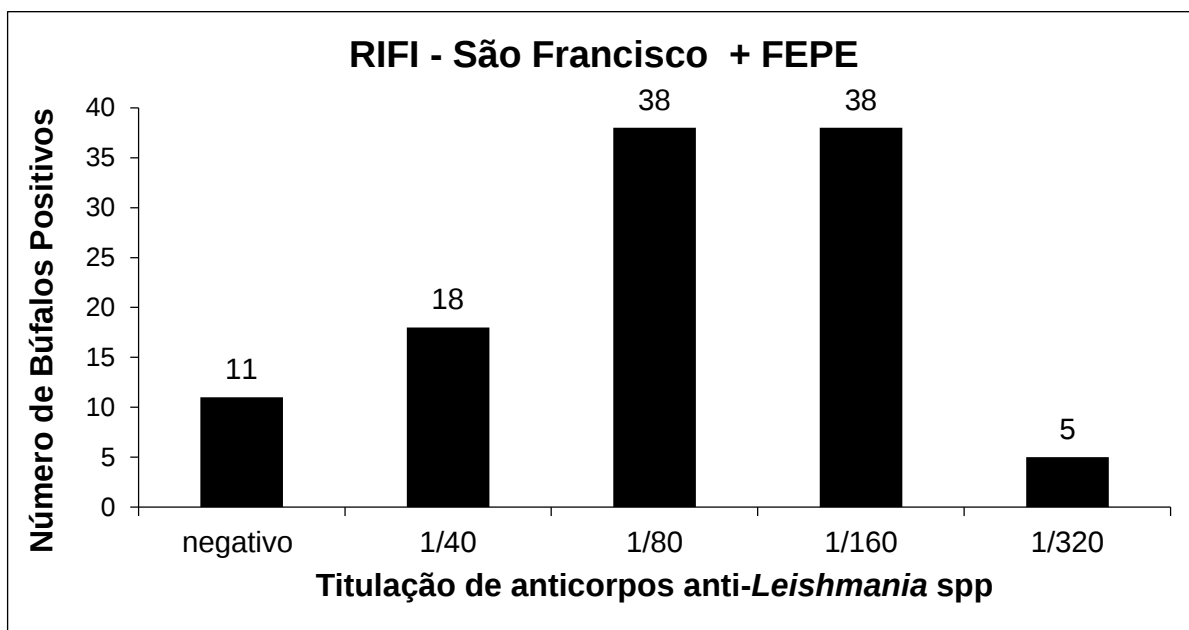
Na associação entre a RIFI e demais exames, verificou-se que 100/110 (90,91%) dos búfalos estavam positivos na RIFI ou na PCR (sangue ou suabe). Considerando-se o exame RIFI acrescido do PA, 104/110 (94,55%) dos búfalos estudados estavam positivos (Tabela 03). Vale lembrar que essas positivities altas foram em função da RIFI, cujas positivities para RIFI, PA e PCR, foram respectivamente de 90%, 60,1% e 29,1% (Figura 05).

Tabela 03 - Números e porcentagens (%) de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco, Andradina, SP (N = 100) e da Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEPE) da UNESP, Selviria, MS (N = 10), positivos no exame sorológico RIFI e sua comparação com o exame PA e PCR. Ilha Solteira, SP, 2018.

Números e porcentagens (%) de búfalos POSITIVOS no sorológico RIFI em relação ao PA e a PCR (N = 110)		
Métodos	Números	%
RIFI	99	90,00
RIFI + PA **	104	94,55
RIFI + PCR*Sg **	100	90,91
RIFI + PCR*Su **	99	90,00
RIFI + PCR*Sg ou Su **	100	90,91

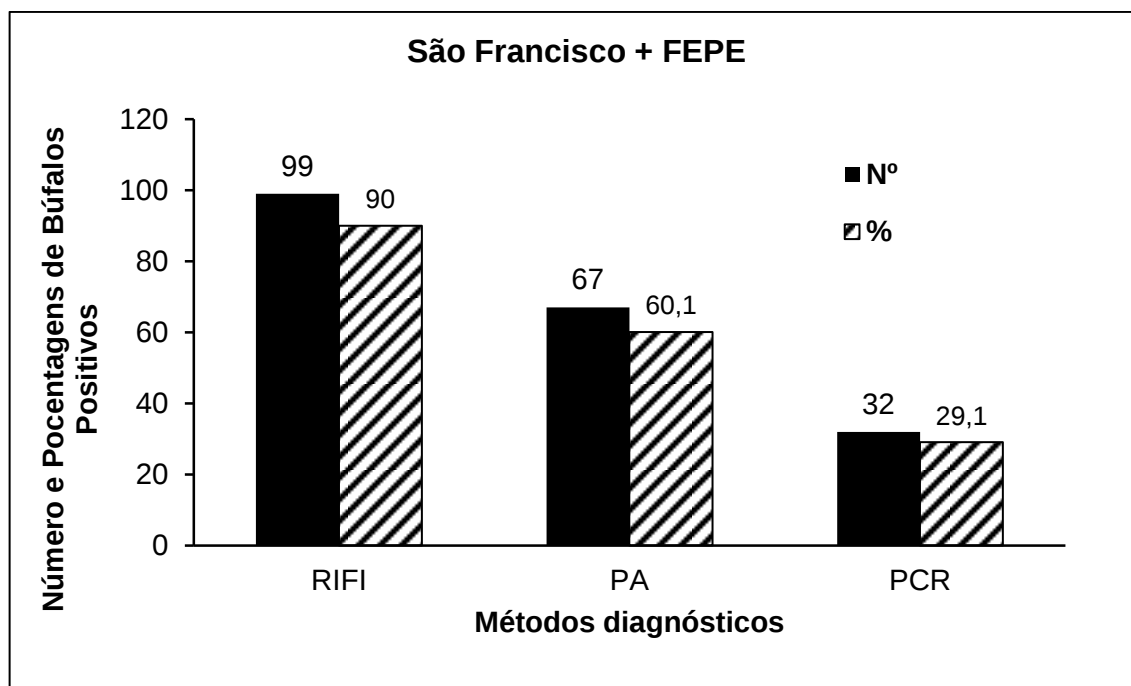
Fonte: Dados do próprio autor. PA = parasitológico; Sg = sangue; Su = suabe.* = PCR com primer ITS1; ** = somatória de animais positivos no PA e na PCR (Sg ou Su).

Figura 04 - Números de búfalos da Fazenda São Francisco e da FEPE (N = 110) positivos pela RIFI, de acordo com a titulação de anticorpos anti-*Leishmania* spp. Ilha Solteira, SP, 2018.



Fonte: Dados do próprio autor

Figura 05 - Números totais e porcentagens de búfalos positivos nos métodos RIFI, PA e PCR, provenientes tanto da fazenda São Francisco como da FEPE. Ilha Solteira, SP, 2018.



Fonte: Dados do próprio autor

5.5 Análise de Comparação de Métodos pelo Índice Kappa

Na análise de comparação entre os métodos diagnósticos, PA, PCR ou RIFI, analisados pelo índice kappa, a concordância entre eles foi considerada ruim (K variando de -0,0035 a 0,0749) em todas as associações possíveis realizadas (Tabela 04).

Tabela 04 - Análise comparativa entre os métodos de diagnóstico de búfalos positivos para a infecção por tripanossomatídeos. Ilha Solteira, SP, 2018.

Concordância entre os métodos de diagnóstico (N = 110)				
Técnicas	Nº Positivos	Nº Negativos	Total Concordância	Índice Kappa (κ)
PA x PCR-Sg	19	33	52	0,0440 (Frac)
PA x PCR-Su	04	43	47	0,0473 (Frac)
PA x RIFI	62	6	68	0,0749 (Frac)
PCR-Sg x PCR-Su	1	78	79	-0,0035 (Frac)
PCR-Sg x RIFI	28	10	38	0,0501 (Frac)
PCR-Su x RIFI	04	11	15	0,0084 (Frac)

Fonte: Dados do próprio autor.

5.6 Análise Clínica dos Búfalos

A Figura 05 ilustra os búfalos da Fazenda São Francisco, Andradina, SP e a Figura 06 búfalos da FEPE, Selvíria, MS. Os 100 búfalos do rebanho de Andradina pertenciam à raça Murrah, enquanto os 10 búfalos de Ilha Solteira, pertenciam à raça Mediterrânea, ambos com idades de até 12 meses.

Todos os animais foram avaliados clinicamente quanto ao estado geral, frequências cardíaca e respiratória, coloração de mucosas, avaliação de linfonodos e particularidades observadas por sistema acometido.

Nessa avaliação clínica geral, os animais não mostraram nenhuma alteração clínica notória.

Figura 06 - Fotos dos búfalos da Fazenda São Francisco de Andradina, São Paulo Brasil, 2018.



Fonte: Próprio autor

Figura 07 - Fotos dos búfalos da FEPE, Selvíria, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2018.



Fonte: Próprio autor

Com relação ao exame clínico laboratorial hematológico realizado nos animais da fazenda São Francisco e da FEPE (Tabela 05), verificou-se que à exceção das plaquetas que estavam abaixo dos valores de referência em alguns animais, a maioria apresentava valores dentro da normalidade, ou levemente superiores aos de referência, tanto os animais positivos no PA e PCR assim como os negativos (Tabela 05).

Com relação às plaquetas, alguns búfalos 28/110 (25,45%) apresentaram valores abaixo dos de referência (abaixo de $101 \times 10^3/\mu\text{L}$) e destes 21/77 (27,27%) estavam positivos no parasitológico ou na PCR, sendo que dois deles encontravam-se positivos tanto na PCR quanto no parasitológico. Dos animais negativos no PA e na PCR, 7/33 deles (21,21%) apresentaram índices plaquetários abaixo do normal (Tabela 05).

Outro dado digno de nota foram os índices de proteína plasmática, pois 14 búfalos (14%) apresentaram valores abaixo dos de referência, ou seja, abaixo de 60 g/L e 11% eram búfalos positivos no PA ou na PCR (Tabela 5). No entanto, analisando-se estatisticamente estes valores hematológicos comparando-se os animais positivos com os negativos no PA e na PCR, não se verificou diferença estatística significativa ($p \leq 0.05$).

Com relação aos búfalos de Ilha Solteira, nenhum deles apresentou alteração no quadro hematológico (Tabela 05),

Para melhor compreensão, encontra-se no Apêndice 01, os dados individuais da análise hematológica dos búfalos de Andradina e no Apêndice 2, os dados hematológicos dos búfalos da FEPE. Além disso, nos Apêndices 05 e 06 estão os dados dos animais de Andradina e no Apêndice 07 da FEPE, agrupados em positivos e negativos (com relação ao parasitológico e molecular), mostrando não só os dados médios, mas também a amplitude.

Tabela 05 - Análise hematológica de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco de Andradina, SP e FEPE, positivos e negativos para a infecção por protozoários da família Trypanosomatidae no parasitológico direto ou na PCR. Ilha Solteira, SP, 2018.

Valores hematológicos dos búfalos (N = 110)				
Parâmetros	Média ± DP Positivos (N=77)	Média ± DP Negativos (N=33)	Referência (Fontes et al, 2014)	Referência (Alencar Filho et al., 1972)
Hematócrito	34,90 ± 3,15 ^a	35,11 ± 2,99 ^a	25 – 45	19 - 41
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	8,47 ± 0,81 ^a	8,54 ± 0,74 ^a	4,7 - 11,8	7,3 – 10,9
Hemoglobinas (g/dL)	13,65 ± 1,30 ^a	13,93 ± 1,33 ^a	08 – 16	11,0 – 17,4
VCM	41,30 ± 2,37 ^a	41,12 ± 2,08 ^a	37 - 66	18 - 50
CHCM	39,20 ± 3,11 ^a	39,69 ± 1,25 ^a	27 – 36	31 - 97
Leucócitos (x10 ³ /μL)	13,56 ± 2,42 ^a	13,59 ± 2,25 ^a	04 – 12	10,2 - 30
Neutrófilos	4,94 ± 3,97 ^a	4,42 ± 2,25 ^a	0,6 - 4,0	3,4 – 11,2
Monócitos	4,14 ± 4,21 ^a	5,12 ± 4,16 ^a	0,0 - 0,98	0 -1, 9
Basófilos	0,20 ± 0,71 ^a	0,13 ± 0,28 ^a	0,18 - 0,37	0 – 12,9
Linfócitos	4,28 ± 3,85 ^a	3,51 ± 3,63 ^a	8,1 - 9,2	3,5 – 19,7
Eosinófilos	0,47 ± 1,00 ^a	0,15 ± 0,28 ^a	0,2 - 1,2	1,2 – 5,5
PPT (g/L)	74,23 ± 5,29 ^a	72,19 ± 5,25 ^a	70 - 85	-
Plaquetas (x10 ³ /μL)	176,83 ± 106,7 ^a	204,25 ± 107,18 ^a	101 - 775	-

Fonte: Dados do próprio autor; VCM = volume corpuscular médio; CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média. PPT: Proteína Plasmática Total.

Nota: De acordo com o teste F não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$). R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2018).

Na Tabela 06 estão os dados do exame bioquímico dos bezerros búfalos positivos e negativos, nos exames parasitológico e molecular, da fazenda São Francisco e FEPE. Verificou-se que os valores das dosagens da enzima ALT sorológica estavam acima dos valores de referência, que são de 22,9 a 40,97 U/L, na maioria dos animais, ou seja, em 86% deles, tanto nos animais positivos quanto nos negativos (Tabela 06). Já a enzima AST, estava com os valores dentro da normalidade (174,8 a 386,6 U/L) em 74% dos animais examinados, mas 34,3% dos animais positivos apresentavam valores inferiores ao de referência.

Com relação aos compostos uréia e creatinina, verificou-se que o primeiro encontrava-se acima dos valores de referência (28,7 a 61,6 mg/dL) em 76% dos animais examinados da fazenda São Francisco e FEPE, sendo para os animais positivos e para os animais negativos. Já com relação à creatinina, verificou-se o contrário, na grande maioria dos animais (97%), a creatinina apresentava-se com valores inferiores aos de referência (2,1 a 2,36 mg/dL), tanto para animais positivos, quanto para negativos (Tabela 06).

A proteína soro albumina esteve acima dos valores de normalidade (1,3 a 2,39) em% dos búfalos, sem diferenças entre animais positivos e negativos (Tabela 06). O restante dos búfalos apresentava valores normais de albumina.

Analisando-se estatisticamente na comparação destes valores bioquímicos dos búfalos positivos, dos negativos, verificou-se significância estatística ($p \leq 0.05$), nos valores de uréia, creatinina e albumina.

Para melhor compreensão, encontram-se no Apêndice 03, os dados individuais da análise bioquímica dos búfalos de Andradina e no Apêndice 04, os dados bioquímicos dos búfalos da FEPE. Além disso, nos Apêndices 08 e 09 estão os dados dos animais de Andradina e no Apêndice 10 da FEPE, agrupados em positivos e negativos (com relação ao parasitológico e molecular), mostrando não só os dados médios, mas também a amplitude, além do desvio padrão da média.

Tabela 06- Análise de valores médios do exame bioquímico do sangue de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco, Andradina, SP e FEPE, positivos e negativos para a infecção por protozoários da família Trypanosomatidae pelo parasitológico direto e PCR. Ilha Solteira, SP, 2018.

Valores bioquímicos de búfalos (Andradina/Selvíria) positivos (N = 67) e negativos (N=43)			
Parâmetros	Média ± DP Positivos (N=77)	Média ± DP Negativos (N=33)	Referência (Fontes et al, 2014)
ALT	51,85 ± 10,97 ^a	47,42 ± 13,42 ^a	22,9 – 40,97
AST	194,75 ± 42,35 ^a	193,54 ± 49,42 ^a	174,8 – 386,6
Ureia	60,77 ± 29,09 ^b	74,18 ± 33,07 ^a	28,7 – 61,56
Creatinina	1,01 ± 0,42 ^b	1,22 ± 0,61 ^a	2,1 – 2,36
Albumina	3,35 ± 3,78 ^a	2,41 ± 0,53 ^b	1,3 – 2,39

Fonte: Dados do próprio autor, Nota: Comparação de Médias pelo teste de Tukey. Letras minúsculas diferentes (a, b, e c) indicam significância estatística entre colunas ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0.05$). Programa R version 3.1.1 (R CORE TEAM, 2018). ALT: alanina aminotransferase. AST aspartato aminotransferase. PA = Parasitológico.

6 DISCUSSÃO

Para a presente pesquisa foram avaliados 110 bezerros búfalos, procedentes da Fazenda São Francisco do município de Andradina, SP (N = 100) e da FEPE, no município de Selvíria, MS (N = 10), com idades entre oito a 12 meses. Esses animais foram examinados, realizando-se um exame clínico geral, exame hematológico e bioquímico, exame parasitológico (PA) direto do esfregaço sanguíneo para detecção de tripanosomatídeos, exame molecular (PCR e sequenciamento gênico) e exame sorológico RIFI. As positivities foram de 90% (RIFI), 60,1% (PA) e 29,1% (PCR).

Pelo exame PA, que foi por meio da visualização direta em microscópio óptico, dos esfregaços sanguíneos histoquimicamente corados, constatou-se que em nenhum búfalo da FEPE, mas em 67% dos búfalos examinados no município de Andradina continham formas hemoflagelares semelhantes a *Trypanosoma* spp. Segundo alguns autores como Griebel et al (1989), devido à baixa parasitemia de *Trypanosoma* spp, raramente é detectado no exame parasitológico direto em microscópio óptico, por meio do esfregaço sanguíneo e, por isso o isolamento dele na hemocultura seria o mais indicado. No entanto, na presente pesquisa, a positividade do esfregaço sanguíneo foi relativamente alta (67%) e o da hemocultura realizada apenas com as amostras sanguíneas de búfalos da FEPE, foi nula, possivelmente devido ao baixo índice de parasitismo destes búfalos na PCR e nula no PA.

Altas parasitemias por *Trypanosoma* spp. ocorrem no geral, somente na fase inicial da doença, sendo a fase crônica caracterizada pela ausência dos flagelados na corrente sanguínea por longos intervalos de tempo. Os vários métodos que tem sido empregados para diagnosticar as infecções por tripanosomatídeos nos ruminantes podem ser divididos basicamente em métodos diretos, como os parasitológicos, utilizando-se técnicas que detectam a presença de anticorpos no soro e as reações da PCR. Segundo Rodrigues et al. (2010a) e Rodrigues et al. (2010b) estudos moleculares de *Trypanosoma* spp são indicados pelos baixos níveis de parasitemia frequentemente encontrados em hospedeiros ruminantes, como indicado por parasitas raros em esfregaços de sangue apesar de hemoculturas positivas

Para o exame molecular, realizou-se a PCR, utilizando-se os primers ITS1. Por este exame, foi identificado o DNA de tripanosomatídeos em 28% e 4%, respectivamente em amostras de sangue e suabe conjuntival de búfalos da Fazenda São Francisco e apenas no sangue de um animal (10%) da FEPE, dando um total 32 (29,2%) búfalos positivos. Considerando-se os exames parasitológicos e a PCR juntos, pode-se afirmar que 77/110 (70%) dos búfalos examinados encontravam-se infectados por estes hemoflagelados tripanosomatídeos. Na análise do sequenciamento 03/07 (42,86%) amostras foram positivas para *T. theileri*, com 100% de similaridade. Este resultado sugeriram que os hemoflagelados visualizados na corrente sanguínea dos búfalos pertenciam à espécie de *T. theileri*, o que está de acordo com Rodrigues et al. (2010a) e Rodrigues et al. (2010b) onde mencionam que *T. theileri* pode ser distinguida de outros tripanossomas pela amplificação por PCR usando vários marcadores genéticos, incluindo as pequenas subunidade de rRNA (ssrRNA), *internal transcribed spacer 1* (ITS1). Segundo Hoare (1972), os tripanossomas de bovinos e búfalos podem pertencer à espécie *T. theileri* e registrou sua prevalência em diferentes países, variando consideravelmente de 10 a 90%. Recentemente, Paixão (2017) identificou *T. theileri* em bovinos (*Bos taurus*) (23%) e equinos (*Eqqus spp.*) (16%), procedentes de áreas urbanas e periurbanas do município de Bauru, SP, onde o diagnóstico dos animais foi baseado em técnicas parasitológicas, sorológicas, PCR e sequenciamento.

Apesar do *T. theileri* ser bem conhecido em bovinos, há poucos registros de *T. theileri* em búfalos. No entanto, este parasita foi descrito no início do último século, no búfalo asiático (*B. bubalis*), nas Filipinas e na Índia. Em 1958, esta espécie foi registrada em búfalos africanos (*Syncerus caffer*) no Kenya (citado por HERBERT, 1964; WELLS, 1976). Mais recentemente foi descrito em búfalos na Indonésia (SISWANSYAH; TARMUDJI, 1989) e no Brasil (NUNES; OSHIRO, 1986; RODRIGUES et al., 2003).

Ainda com relação à PCR, quando se utilizou os primers 13A-13B, a positividade dos animais foi nula, tanto para animais da fazenda São Francisco, quanto da FEPE. Segundo Rodgers et al. (1990) os primers 13A-13B amplificam fragmentos do DNA de espécies de *Leishmania*, mas com baixa eficiência, pois detectam apenas concentrações superiores a 512 pb de DNA. No entanto, Manna, et al. (2004), usando esses mesmos iniciadores, mas com DNA de *L. infantum*, demonstraram uma sensibilidade de 1 pb de DNA.

No presente trabalho, quando realizou-se a PCR, utilizando-se marcadores genéticos ITS-1, e pelo sequenciamento gênico, uma das sete amostras (14,28%) testadas apresentou positividade para a espécie *L. infantum* com 100% de similaridade, constituindo-se num relato único no Brasil. Casos de leishmaniose já foram relatadas em outras espécies de hospedeiros, como os equinos na Espanha (SOLANO-GALLEGO et al., 2003), em Portugal (ROLÃO et al., 2005) e na Alemanha (KOEHLER et al., 2002). Foram encontrados cães, gatos e equinos positivos no estado de São Paulo, sem sinais clínicos, em ao menos um dos testes utilizados (BENASSI et al., 2017). Mais recentemente, a espécie *L. infantum* foi detectada em bovinos e equinos na região de Bauru, SP (PAIXÃO, 2017). Em Nepal, *Leishmania* spp. foi identificada em humanos (6,1%), vacas (5%), búfalos (4%) e cabras (16%) (BHATTARAI et al., 2010). No Brasil (Bahia), em investigação com bovinos, caprinos, equinos e ovinos como reservatórios da doença, foi possível amplificar o DNA do parasita no sangue periférico de 25% (5/20) dos bovinos (JULIÃO, 2011).

Outro método empregado quando a parasitemia nos animais infectados é baixa, é a utilização de técnicas que detectam a presença de anticorpos no soro, ou seja as técnicas sorológicas, incluindo a RIFI, técnica que também foi empregada na presente pesquisa. Na África, Swart et al. (1973) realizando a RIFI, detectaram 80% de positividade em bovinos, ao passo que através das técnicas parasitológicas diretas, detectaram apenas 15% dos bovinos positivos.

Desta forma, no exame RIFI, os búfalos apresentaram uma positividade alta, ou seja, 99/110 (90%), utilizando-se o antígeno de *L. infantum*. No entanto a titulação dos anticorpos anti-*Leishmania* variou entre 1/40 e 1/320, onde, embora acima do ponto de corte (1/40), 56/110 (50,91%) dos búfalos apresentaram titulação baixa, ou seja de 1/40 a 1/80 e apenas 5/110 (4,55%) com a titulação um pouco mais alta que foi 1/320 (titulação máxima). A técnica sorológica, embora com maior sensibilidade, ela também apresenta menor especificidade, e dessa forma com algumas limitações, como a apresentação de reações cruzadas com vários tripanosomatídeos (TRONCARELLI et al., 2009; GRIMALDI JR et al., 2012), além de apresentar alguns resultados inespecíficos. Quando essa técnica foi utilizada por Platt (1974) e por Platt; Adams (1976), para diagnosticar *T. vivax*, eles constataram uma reação cruzada entre *T. vivax* e *T. evansi*, na diluição sorológica de 1/50, fato não observado com a diluição 1/100, demonstrando que as baixas titulações de

anticorpos, podem significar reações cruzadas ou falso-positivas, possivelmente foi o ocorrido na presente pesquisa. Embora o antígeno utilizado fosse o de *L. infantum* a titulação baixa de anticorpo poderia estar significando reação cruzada com *T. theileri*, devido ao fato de que 67% dos búfalos encontravam-se infectados com esse parasita. Já com relação à *Leishmania* spp, embora, no sequenciamento uma amostra foi positiva para *L. infantum*, em nenhum outro momento, detectou-se esse parasita, quer seja, na corrente sanguínea destes animais e nem na PCR com primers para o gênero *Leishmania*. No entanto, este fato, único na literatura brasileira não deve ser descartado, mas pelo contrário, ele deve abrir uma porta para novas pesquisas, no sentido de se avaliar um maior número de amostras dos animais e determinar qual o papel desse parasita, ou a sua importância epidemiológica para a espécie bubalina.

Ainda, no presente estudo, quando se analisou o esfregaço sanguíneo dos búfalos, foi possível visualizar estruturas intraeritrocíticas em pelo menos 15,5% dos animais examinados. Embora, esse não tenha sido o objetivo da presente pesquisa é possível uma concomitância de parasitismos por outros hemoprotozoários, incluindo *Babesia* spp. e *Theileria* spp. Fato que pode ser investigado em outra oportunidade. Em outra pesquisa, 83,3% de bovinos e 86,3% dos búfalos infectados com *T. theileri* estavam também co-infectados com *Babesia* e/ou *Theileria* (YOKAYAMA, et al., 2015) e por essa razão há a necessidade de se testar reações cruzadas na sorologia também com estes agentes.

Apesar da ubiquidade de *T. theileri* e ao contrário dos tripanosomas patogênicos de bovídeos, os quais são espécies Salivaria (*T. vivax*, *T. brucei*, *T. evansi* e *T. congolense*), poucos dados existem a cerca do ciclo de vida nos vertebrados e das características bioquímicas e moleculares e patogenicidade deste parasita. Apesar do *T. theileri* ser muitas vezes considerado não patogênico, algum sinal clínico como anemia tem sido relatado em bovinos na Europa e Ásia (WARD et al., 1984; DOHERTY et al., 1993; SEIFI, 1995). Além disso, segundo alguns autores, em trabalhos realizados em bovinos, *T. theileri* pode induzir infecções crônicas e críticas e ser potencialmente patogênico para animais sob estresse físico e nutricional severo, para bezerros recém-nascidos e vacas prenhes quando associado com outras doenças infecciosas concomitantes. Além disso, a infecção por *T. theileri* pode persistir por um longo tempo sem quaisquer sinais clínicos, a depressão do sistema imunológico pode permitir uma maior parasitemia e dispersão

de *T. theileri* para vários tecidos e órgãos, inclusive para o sistema nervoso central (WARD et al., 1984; SEIFI, 1995; BRAUN et al., 2002; VILLA et al., 2008). Com relação aos búfalos, pouco ou nada se conhece sobre o papel de *T. theileri*, embora essa espécie animal seja considerada um reservatório sadio do parasita. Na presente pesquisa, todos os búfalos foram avaliados clinicamente quanto ao estado geral, frequências cardíaca e respiratória, coloração de mucosas, avaliação de linfonodos e particularidades observadas por sistema acometido, mas nenhum deles mostrou qualquer alteração clínica notória na anamnese, sendo assim assintomáticos.

O hemograma e as dosagens bioquímicas são exames rotineiramente utilizados na avaliação da saúde dos animais domésticos, incluindo os búfalos. Quando se analisou os valores hematológicos dos animais, verificou-se que embora a maioria apresentasse valores dentro da normalidade, ou levemente superiores aos valores de referência, alguns deles (animais de Andradina) apresentaram índices plaquetários abaixo dos de referência para a espécie, tanto os animais positivos (27,63%) como os negativos (21,21%), no PA ou PCR, indicando uma não relação com os parasitas estudados. Além disso, os dados não foram estatisticamente significativos quando se comparou animais negativos e positivos. Corroborando com esta ideia, Ferreira Neto et al. (1981) assinalam que a causa para a diminuição do número de plaquetas pode estar relacionada mais à produção anormal de plaquetas, que normalmente vem acompanhada de outra citopenia como anemia e/ou neutropenia, e são causadas por etiologias auto-imunes ou infecciosas, fármacos ou intoxicações (estrógenos, sulfadiazina e anti-inflamatórios não esteroides). Outros autores, Iglesia et al. (1999) mencionaram que pode ocorrer um aumento no número das plaquetas em búfalos, devido à pressão esplênica provocada pelo estresse no momento da coleta do sangue, porém provavelmente sem relevância clínica.

A proteína soro albumina estava também acima dos valores de normalidade em 35% dos búfalos da fazenda São Francisco, também sem diferenças significativas entre animais positivos e negativos. De acordo com Kaneco (1997), a hiperalbuminemia ocorre na desidratação e a hipoalbuminemia tem como causas principais as deficiências alimentares, nefropatias, hepatopatias, infecções graves e eclampsia. Além disso, a albumina é uma proteína de fase aguda da inflamação,

consequentemente, uma leve hipoproteinemia é frequentemente encontrada em doenças inflamatórias, não sendo o caso dos animais da presente pesquisa.

Com relação ao exame bioquímico, as alterações, mais notórias foram observadas nos animais de Andradina. As alterações incluíam os valores das dosagens da enzima ALT sorológica que estavam acima dos valores de referência (86% dos animais) e à enzima AST com valores inferiores aos de referência em 34,3% dos animais. A AST é uma enzima utilizada como indicador de lesão hepática e/ou muscular, estando presente em grande quantidade nestes tecidos (THRALL, 2007). É provável um aumento da atividade desta enzima nos animais com maior massa muscular. Dentre outros fatores de variabilidade que influenciam na atividade enzimática sérica da AST destacados por Gregory (1995), são aqueles relacionados à espécie animal, à raça, à idade, ao sexo, ao sistema de criação, à produção leiteira, assim como as variações da atividade enzimática sérica que ocorrem em doenças ou parasitoses hepáticas. No entanto, as alterações enzimáticas observadas nos búfalos não apresentaram diferenças significativas entre os animais positivos e os negativos, significando não serem os tripanosomatídeos estudados aqui responsáveis por estas pequenas alterações.

Com relação aos compostos ureia e creatinina, verificou-se que o primeiro se encontrava acima dos valores de referência em 76% e 70,1%, respectivamente para os animais positivos e negativos e com diferença significativa ($P \leq 0,05$) para ambos os compostos. Com relação à creatinina, constatou-se o contrário, na grande maioria dos animais (97%), a creatinina apresentava-se com valores inferiores aos de referência para animais positivos, quanto para negativos. A concentração de creatinina pode ser influenciada pela faixa etária dos animais (GREGORY, et al., 2004; FONTES et al., 2014;) e também com a massa muscular dos adultos.

Como as alterações hematológicas, assim como as bioquímicas foram observadas tanto nos animais positivos assim como nos negativos, concluiu-se que essas alterações não foram decorrentes dos parasitas, mas possivelmente ocasionadas por outros fatores. Em concordância com esta conclusão, Morais (2001) realizando um trabalho experimental de *T. vivax* em bovinos, não observou qualquer alteração nos valores normais para a espécie bovina com relação aos parâmetros hematimétricos e na bioquímica sanguínea. Segundo González et al, (2017), a interpretação do perfil bioquímico é complexa, tanto aplicada a rebanhos quanto a indivíduos, devido aos mecanismos que controlam o nível sanguíneo de

vários metabólitos e, também, à grande variação desses níveis em função de fatores, como raça, idade, estresse, dieta, nível de produção leiteira, manejo, clima e estado fisiológico (lactação gestação, estado reprodutivo).

Portanto fica difícil estabelecer a real importância dessas alterações hematológicas e bioquímicas em relação aos parasitas estudados na presente pesquisa.

Na análise de comparação entre os métodos diagnósticos, PA, PCR ou RIFI, analisados pelo índice Kappa, a concordância entre eles foi considerada ruim (K variando de -0,0035 a 0,0749) em todas as associações possíveis realizadas. Essa baixa concordância entre os métodos, possivelmente, pode ser em decorrência da alta positividade do exame RIFI em relação aos demais exames. Outros autores já verificaram em estudos com LVC, uma baixa concordância entre os testes RIFI, ELISA, imunoistoquímica e PCR (ASSIS et al., 2010), indicando que é necessária uma associação de métodos para diagnosticar uma enfermidade e que nenhuma prova diagnóstica é totalmente eficaz quando analisada individualmente.

7 CONCLUSÕES

- Búfalos (*B. bubalis*) procedentes de Andradina (SP) e de Selvíria, MS, quando analisados por meio de exames sorológicos, parasitológicos e PCR, apresentaram positivities para tripanosomatídeos em 90%, 60,1% e 29,1%, respectivamente.
- Pelos exames de sequenciamento gênico de amostras de sangue total detectou-se a espécie *T. theileri* e *L. infantum* com 100% de similaridade com as respectivas espécies após comparação pelo GenBank.
- Este estudo é o primeiro relato da ocorrência da espécie *L. infantum* em *B. bubalis* conforme investigação molecular e determinação por sequenciamento gênico.
- As alterações hematológicas e bioquímicas observadas nos búfalos não indicaram uma associação com os parasitas estudados, mas possivelmente ocasionadas por outros fatores.
- Os métodos de diagnósticos para detecção de tripanossomatídeos não apresentaram boa concordância entre si, sugerindo a necessidade de mais estudos.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS – **ABCB**. Site. São Paulo, 2018. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/info_criador/historico_bufalos.pdf>. Acesso: em 09 jan. 2018.
- ABRANCHES, P.; SILVA PEREIRA, M. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. M.; SANTOS G. M.; JANZ, J. G. **Canine leishmaniosis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection**. *J Parasitol*, Lawrence, v. 77, p. 557-561, 1991.
- ADLER, S; THEODOR, O. **In vestigations on Mediterranean kala-azar: VI. Canine visceral leishmaniasis**. *Proc R Soc Lond*, London, v. 110, p. 402-12, 1932.
- AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. **Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil**. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 207-255.
- AL-AMIN, S. K.; HANNA, W. J.; AL-MARAASHI, A. **Growth and development of buffaloes**. *Indian Journal Animal Science*, [S. l.], v. 58, n. 8, p. 942, 1988.
- ALENCAR-FILHO, R. A; SOOUD, A. D; ILDA, L. **Quadro Hemático de búfalos (*Bubalus bubalis* – Linnaeus, 1958)**. [S. l.: s. n.], 1972.
- ALEXANDER, B.; CARVALHO, R. L.; MCCALLUM, H.; PEREIRA, M. H. **Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) In the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil**. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 8, n. 12, p. 1480-1485, 2002.
- ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E. V.; SOUSA-ATTA, M. L. B.; ALVES, L. C.; BERNEM, E. A.; ATTA, A. M. **Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi***. *Vet Parasitol.*, Amsterdam, v. 127, p. 227-232, 2005.
- ALTSCHUL, S. F, et al. **Basic local alignment search tool**. *J. Mol. Biol.*, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDRADE-FILHO, J. D.; GALATI, E. A. B.; FALCÃO, A. **LNyssomyia intermedia (Lutz & Neiva, 1912) and Nyssomyia neivai (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) geographical distribution and epidemiological importance**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p. 481-487, 2007.
- ASHFORD R.W. **The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses**. *Int J Parasitol*, Oxford, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NORONHA-JUNIOR, A. C. F.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; STARKE BUZETTI, W. A. **Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para**

leishmaniose visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 17-25, jan/mar. 2010.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. *BioEstat - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Versão 4.0.* Belém: Instituto de desenvolvimento sustentável Mamirauá, 2005.

BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. **Leishmaniose visceral (calazar).** In: VERONESI, R. FOCACCIA, R. (Org.) *Tratado de infectologia.* São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1234-1259, 1996. 34 p.

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

BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. G.; MADRUGA, C. R.; SIMÕES, S. D. V.; MAIA, T. F. **Trypanosomiasis by Trypanosoma vivax in cattle in the Brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system.** *Vet. Parasitol.*, Oxford, v. 143, p. 174-181, 2007. 7 p.

BENVENGA, G. U. **Ocorrência de Leishmania spp em cães, gatos e eqüinos no Estado de São Paulo.** 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BERNARDES, O. **Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007. Disponível em: <<http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/293.pdf>>. Acesso em: 11 de jan. 2018.

BERTI, P. J.; STORER, A. C. **Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases.** *J Mol Biol.*, London, v. 246, p. 273-83, 1995.

BHATTARAI, N. R.; AUWERA, G. V.; RIJAL, S.; PICADO, A.; SPEYBROECK, N.; KHANAL, B.; DONCKER, S. D.; DAS, M. L; OSTYN, B.; DAVIES, C.; COOSEMANS, M.; BERKVEN D.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J. C. **Domestic Animals and Epidemiology of Visceral Leishmaniasis, Nepal.** *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 16, n. 2, p. 231, 2010.

BIONDO, A. W.; MARCONDES, M. **Serological cross-reactivity of Trypanosoma cruzi, Ehrlichia canis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Babesia canis to Leishmania infantumchagasi tests in dogs.** *Rev Soc Bras Med Trop.*, Uberaba, v. 47, n. 1, p. 105-107, 2014.

BOSE, R FRIEDBOFF, K. T., OLBRICH, S., BUSCHER, G., DONEYER, I., **Trnasmission of Trypanosoma theileri to cattle by Tabanide.** *Parasitol. Res.*, Berlin, v. 73, p. 421-424, 1987.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Aspectos epidemiológicos.** Brasília, DF, 2014. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31941>. Acesso em: 11 de jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília, DF, 2006.

BÖSE, R., HEISTER, N.C. **Development of Trypanosoma (*Megatrypanum*) theileri in tabanids.** *J. Eukaryot. Microbiol.*, Lawrence, v. 40, p. 788–792, 1993.

BRAUN, U.; ROGG, E.; WALSER, M.; NEHRBASS, D.; GUSCETTI, F.; MATHIS, A.; DEPLAZES, P. **Trypanosoma theileri in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis.** *Vet. Rec.*, London, v. 150, p. 18–19, 2002.

BRITTO CFPC, PEREIRA DP. **Hospedeiros, reservatórios e manutenção dos ciclos de transmissão- Diagnóstico molecular de Leishmania spp. em flebótomos provenientes de áreas de ocorrência de leishmanioses.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2014.p.226.

BRUSTOLONI, Y.M. **Leishmaniose visceral em crianças no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil: contribuição ao diagnóstico e ao tratamento.** 2006. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

BOULHOSA J. **Informação científica, boletim técnico Ministério da Agricultura.** [S. l.], 1946.

CALDAS, A. J. M.; COSTA, J. M. L.; SILVA, A. A. M.; VINHAS, V.; BARRAL, A. **Risk factors associated with asymptomatic infection by Leishmania chagasi in northeast Brazil.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, London, v. 95, p. 1- 8, 2001.

CAMARGO, J. B; TRONCARELLI, M. Z; RIBEIRO, M. G; LANGONI, H. **Leishmaniose visceral canina aspectos de saúde pública e controle.** *Revista Clínica Veterinária*, [S. l.], ano 12, n. 71, p. 85- 86, 2007.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. **New species of protozoa of the genus Leishmania pathogenic to man Leishmania chagasi n. sp previous note.** [S. l.: s. n.], 1937.

DAMÉ M. C. F. **Principais resultados de pesquisas, manejo e índices zootécnicos dos bubalinos da Embrapa Clima Temperado.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 36 p. (Documentos, 147)

DAMÉ, M. C. F. **Búfalo: animal de tração.** Pelotas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006. 24 p.

DAMÉ, M. C. F.; XAVIER, G. M.; OLIVEIRA-FILHO, J. P.; BORGES, A. S.; OLIVEIRA, H. N.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. **A nonsense mutation in the tyrosinase gene causes albinism in water buffalo.** *BMC Genetics*, [S. l.], v. 13:62. Disponível em <<http://www.fao.org/corp/estatistics/en/>> Acesso em: 18 abr. 2016.

DISCH, J. et al. **Single-step duplex kDNA-PCR for detection of *Leishmania donovani* complex in human peripheral blood samples.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, New York, v. 56, p. 395-400, 2005.

DOHERTY, M. L.; WINDLE, H.; VOORHEIS, H. P.; LARKIN, H.; CASEY, M.; CLERY, D.; MURRAY, M. **Clinical disease associated with *Trypanosoma theileri* infection in a calf in Ireland.** *Vet. Rec.*, London, v. 132, p. 653-656, 1993.

DRESSEN, D.W. ***Toxoplasma gondii* infections in wildlife.** *Journal American Veterinary Medicine Association*, [S. l.], v. 196, p. 274-276, 1990.

FERREIRA, P.R.B.; LARANJEIRA, D.F.; OLIVEIRA, L.S.; MALTA, M.C.C.; GOMES, M.C.; BASTOS, B.L.; PORTELA, R.W.; BARROUIN-MELO, S.M. **Teste de ELISA indireto para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral em canídeos silvestres.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 33, n. 4, p. 528-534, 2013. 6 p.

FERREIRA NETO, J. M; VIANA, E. S; MAGALHAES, L. M. **Patologia clínica veterinária.** Belo Horizonte: Rabelo, 1981.

FONTES, D. G.; MONTEIRO, M. V. B.; JORGE, E. M.; OLIVEIRA, C. M. C.; RITTER R. A.; NETO, J. D. B.; FILHO, E. S.; MONTEIRO, F. O. B. **Perfil hematológico e bioquímico de búfalos (*bubalus bubalis*) na Amazônia Oriental.** *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 57-63, 2014.

FRANÇA-SILVA, J. C. **Distribuição espacial e temporal da leishmaniose visceral canina em relação à densidade vetorial e ao controle de cães infectados em porteirinha-minas gerais (1998-2002).** 2003. 132 f. PhD (Thesis) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

GALATI, E. A. B. **Morfologia e taxonomia: classificação de *Phlebotominae*.** In: RANGEL, E.F.; LAINSON, R. (Org.). ***Flebotomíneos do Brasil*.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003a. p. 23-51.

GARDINER, P. R. **Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*.** *Adv. Parasitol.*, London, v. 28, p. 229-317, 1989. 12 p.

GARDINER, P.R. **Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*.** *Adv. Parasitol.*, London, v. 28, p. 229-317, 1989.

GENARO O. **Leishmaniose visceral.** In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. (Org.). *Parasitologia humana*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 2000. p. 56-72.

GOMES, A. C.; BARATA, J. M.; ROCHA E SILVA, E. O.; GALATI, E. A. **Ecologic aspects of american tegumentary leishmaniasis 6. Anthrophilic Phlebotomus fauna of residual forests located in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 31, p. 32-39, 1989.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. **Leishmaniose tegumentar americana.** *Rev Soc Bras Med Trop.*, Uberaba, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GRECO, A.; LORIA, G. R.; DARA, S.; LUCKINS, T.; SPARAGANO, O. **First isolation of *Trypanosoma theileri* in Sicilian cattle.** *Vet. Res. Commun.*, Amsterdam, v. 24, p. 471–475, 2000.

GREGORY, L. **Valores padrões de referência de parâmetros bioquímicos séricos utilizados na avaliação das funções hepática e renal de bovinos da raça Jersey, criados no estado de São Paulo.** 1995. 161 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

GREGORY, L.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; ARAÚJO, W. P.; BIRGEL, E. H. **Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no estado de São Paulo: influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos.** *Arqs Inst. Biológico*, São Paulo, v. 71, p. 339-345, 2004..

GUERRA, R. M. S.; FEITOSA, J. R. A. B.; SANTOS, H. P.; SILVA, A. L. A.; SANTOS, C. G. **Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, p. 833-835, 2008.

GRIMALDI, J. R. G.; TESH, R. B.; PRATT, D. M. **A review of geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World.** *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 41, p. 687-725, 1989.

HERBERT, I. V. ***Trypanosoma theileri*, Laveran, 1902. A cosmopolitan parasite of cattle.** *Vet. Bull.*, Farnham Royal, v. 34, p. 563–570, 1964.

HOARE, C. A. ***The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph.*** blackwell scientific publications. Oxford: [s. n.], 109 p. 1972.

HUGHES A.L. **Evolution of cysteine proteinases in eukaryotes.** *Mol Phylogenet Evol*, Orlando, v. 3, p. 310–21, 1994.

HOARE, C. A. **Subgenus megatrypanum: the trypanosomes of mammals: a zoological monograph.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 18 p. 1972.

HOARE, C. A. **Vampire bats as vectors and hosts of equine and bovine trypanosomes.** *Acta Tropica*, Basel, v. 22, p. 204-16, 1965.

IGLESIA, L. M. R.; AZUAJE, K. K., SANCHEZ, F.; RAMIREZ, A. D. **Observaciones hematológicas en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) aparentemente sanos em**

el Occidente de Venezuela. *Revta Cient. FCV-LUZ*, Maracaibo, v. 9, n. 6, p. 524-531, 1990.

JONES, T. W.; DÁVILA, A. M. ***Trypanosoma vivax* out of África.** *Trends in Parasitol.*, Oxford, v.17, p. 99-101, 2001.

JORGE, A. M. **Produção e qualidade de carne bubalina.** In: **SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 2001, Pirassununga. Anais..** Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2001. p. 1-47, 2001. 1 p.

JULIÃO, F. S. **Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR RealTime) na avaliação de reservatórios para leishmaniose visceral.** 2011. 84 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

KANEKO, J. J. **Serum proteins e as dysproteinemias.** In: KANEKO, J. J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5. ed. San Diego: Academic, 1997. Cap. 5, p. 12 - 117, 1997.

KHANAL, B.; PICADO, A.; BHATTARAI, N. R.; AUWERA, G. V. D.; DAS, M. L.; OSTYN, B.; DAVIES, C.R.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J.; RIJAL, S. **Spatial analysis of *Leishmania donovani* exposure in humans and domestic animals in a recent kala azar focus in Nepal.** *Parasitology*, London, v. 137, n. 11, p. 1597–1603, 2010. 6 p.

KUHLS K, MZ, ALAM E, CUPOLILLO GEM, FERREIRA IL, MAURICIO R, ODDONE MD, FELICIANGELI T, WIRTH MA, MILES G, SCHONIAN. **Comparative microsatellite of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and recent old world origin.** *PLoS Negl Trop Dis*, [S. l.], v. 5, n. 6, p. e1155, 2011.

KENNEDY, M. J. ***Trypanosoma theileri* in cattle of central Alberta.** *Can. Vet. J.*, [S. l.], v. 29, p. 937-938, 1988.

KOEHLER, K.; STECHELE, M.; HETZEL, U.; et al. **Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*.** *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.109, p.9–17, 2002. 8 p.

LANGONI H. IN: MEGID J, RIBEIRO MG, PAES AC. **Leishmanioses. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.** Rio de Janeiro: ROCA, 2016. 11 p.

LAINSON, R. **The American Leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Cleveland, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; RYAN, L.; SILVEIRA, F. T. **Leishmaniasis in Brazil XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the**

role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, London, v. 79, p. 223-226, 1985.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **New world Leishmaniasis: the neotropical leishmania species.** In: COLLIER, L. *Topley & Wilson: microbiology and microbial infections*. 9. ed. London: Ed. Feg Cox; 1988.

LAINSON, R.; SHAW J. J. **Evolution, classification and geographical distribution.** In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.) *The leishmaniasis in biology and medicine*. London. Academic, 1987. p. 1.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. **American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 81, n. 3, 1987. 81 p.

LAVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and man.** 2. ed. Minneapolis: Burguers, 1973.

LATIF, A. A.; BAKHEIT, M. A.; MOHAMED, A. E.; ZWEYGARTH, E. **High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*.** *Onderstepoort J. Vet. Res.*, Pretoria, v. 71, p. 251–256, 2004.

LEE, F. Y.; CHENG, C. C.; CHENA, J. S.; LINA, N. N.; HUNGA, W. Y.; WANGC, M. J.; TUD, W. C.; TUNGB, C. K.; CHUUA, T. Y. **Evidence of intracellular stages in *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in non-phagocytic mammalian cells.** *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, p. 228– 239, 2012.

LEITE, R. S. et al. **Evaluation of conjunctival swab as a mass-screening tool for molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis.** *Parasitology research*, v. 114, n. 6, p. 2255-2262, 2015.

LEONEL, R. A. B.; MATSUNO, R. M. J.; SANTOS, W.; VERONEZI, A. H. M.; COSTA, D. R.; SACCO, S. R. **Trombocitopenia em animais domésticos.** *Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária*, [S. l.], ano 6., n. 11, p. 1-5, 2008.

LIMA, A. P.; TESSIER, D.,C.; THOMAS, D.; SCHARFSTEIN, J.; STORER, A. C.; VERNET, T. **Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*.** *Mol Biochem Parasitol.*, Amsterdam, v. 67, p. 333- 338, 1994.

LINHARES, G. F. C.; DIAS FILHO, F. D.; FERNANDES, P. R.; DUARTE, S. C. **Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins: relato de caso.** *Ciênc. Anim. Bras.*, Goiânia, v. 7, p. 455-460, 2006.

LOBSIGER L.; MULLER, N.; SCHWEIZER, T.; FREY, C.F.; WIEDERKEHR, D.; ZUMKERHR, B.; GOTTSTEIN, B. **An authochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis In Switzerland.** *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 169, n. 3-4, p. 408-414, 2010.

LOPES, E. G. P. et al. **Temporal and spatial distribution of leishmaniasis in humans and dogs from Belo Horizonte-MG, 1993-2007.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 62, n. 5, p. 1062-1071, 2010.

LUCIANO RM, LUCHEIS SB, TRONCARELLI MZ, LUCIANO DM, LANGONI H. **Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI).** *Braz J Vet Res Anim Sci*, São Paulo, v. 46, p. 181-187, 2009.

LUPPI, M. M.; MALTA, M. C. C.; SILVA, T. M. A. SILVA, F. L.; MOTTA, R. O. C.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R. L. **Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil.** *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 155, p. 146-151, 2008.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R.; VALADÃO, I. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. **An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle.** *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.

MADRUGA, C. R.; MORZARIA, S.; MAJIWA, P.O. **Caracterização genética do *Trypanosoma vivax* isolado no pantanal do Estado de Mato Grosso e o diagnóstico diferencial da infecção por *Trypanosoma evansi* pela reação em cadeia da polimerase (PCR): resultados preliminares.** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 1999.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S. **Comparison of different sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis.** *Vet Parasitol*, Amsterdam, v. 125, p. 251-62, 2004.

MATOS, J. H.; PINTO, A. Y. N.; MIRANDA, A. M. M.; SILVA, F. L. C.; RAMOS, F. L. P. **Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças.** *Rev Pan-Amaz Saude*, Ananindeua, v. 6, n. 1, p. 65-8, 2015.

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. **genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex.** *Parasitology*, Cambridge, v. 119, pt 3, p. 237-246, 1999. 7 p.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. C. **The strange case of *Leishmania chagasi*.** *Parasitology Today*, Amsterdam, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MARCONDES, C. B.; LOZOVEI, A. L.; VILELA, J. H. **Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae).** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(1):51-58, 1998. 7 p.

MARTINS, R J; ROMÁRIO C., LEITE, R C., DOYLE R L. **Tripanosomatídeos like *trypanosoma theileri* in the cattle tick *boophilus microplus*.** *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, v. 17, n. 2, p. 113-114, 2008.

MONTEIRO, E. M. et al. **Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005. 5 p.

MORAES, M. A.V. **Infecção experimental em bovino (*bos indicus*) com *Tripanosoma vivax*, (ZIEEMAN, 1905).** 2001. 104 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

MUKHTAR, M. M.; SHARIEF, A. H.; EL SAFFI, S. H.; HARITH, A. E.; HIGAZZI, T. B.; ADAM, A. M.; ABDALLA, H. S. **Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 94, n. 1, p. 33–36, 2000. 3 p.

MURRAY, M.; McINTYRE, W.I.M.; MURRAY, P.K.; URQUHART, G.M.; JENNINGS, F.W.; GREIG, W.A.; CLIFFORD, D.J.; N'DOW, W.S.M.; TOURAY, B.; SANYANG, B.J. and BRAY, R.S. **Organization of African Unity, Scientific Technical and Research Commission, Nairobi, Kenya. Cattle diseases and trypanosomiasis in the Gambia I.** In: MEETING OF THE INTERNATIONAL SCIENTIFIC COUNCIL FOR TRYPANOSOMIASIS RESEARCH AND CONTROL, 1979, Banjul. *Proceeding...* [S. l.: s. n.], Banjul, 1979. p. 83-91.

NICOLLE, C. **Origine canine du kala-azar.** *Archives de L'Institut Pasteur de Tunis*, [S. l.], v. 3, p. 59-62, 1908.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. **Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review.** *Veterinary Dermatology*, Oxford, v. 16, n. 4, p. 213-232, 2005.

NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E. T. ***Trypanosoma (megatypanum) theileri* Laveran, 1902 em *Bubalus bubalis* no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.** In: CONGRESSO ON BRAS. MED. VET, 20., [S. l.]. *Proceedings....* [S. l.: s. n.], 1986. v. 78.

NUNES, V. L. B.; GALATI, E. A. B.; NUNES, D. B.; ZINEZZI, R. O.; SAVANI, E. S. M. M.; ISHIKAWA, E.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'ÁURIA, S. R. N.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C. **Ocorrência de leishmaniose visceral canina em assentamento agrícola no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.** *Rev Soc Bras Med Trop.*, Uberaba, v. 34, p. 301-302, 2001.

NUNES, C. M. **Avaliação da dinâmica de reposição e susceptibilidade de cães à *Leishmaniose Visceral* em área endêmica.** 2007. 113 f. Tese (Livre-Docência em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araçatuba, 2007.

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

OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q. **PCR based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil.** *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.129, n. p. 219-227, 2005.

OLIVEIRA, A. L. L. ***Estudos clínicos, epidemiológico e terapêuticos da leishmaniose visceral, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2000-2005.*** 2006. (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

PAIXÃO, M. S. ***Análise espacial e detecção de tripanosomatídeos em animais de produção de região endêmica para leishmaniose visceral.*** 2017. 151 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

PEREIRA, V. F. ***Uso de suabe conjuntival na detecção de Leishmaniose Visceral, Canina por PCR.*** 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2016.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. ***Parasitologia médica.*** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

PIMENTEL, D. S.; RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; BORBA, M. L.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. **First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil.** *Vet. Parasitol.* Amsterdam, v. 185, p. 286-289, 2012.

PLATT, K. B.; ADAMS, L. G. **Evolution of the indirect fluorescent antibody test for detecting *Trypanosoma vivax* in South America cattle.** *Research in Veterinary Science*, London, v. 21, p. 53-58, 1976.

PLATT, K. B. **The development of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Trypanosoma vivax* in Colombia.** (Tesis Mag. Sci.) Texas, A & M, University, 1974.

OSÓRIO, A. L. A. R.; MADRUGA, C. R.; DESQUENES, M.; SOARES, C.O.; RIBEIRO, L. R. R.; DA COSTA, C. G. ***Trypanosoma (Duttonella) vivax: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World: a review.*** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 103, p. 1-13, 2008.

OTRANTO D.; TESTINI, G.; BUONAVOGLIA, C.; PARISI, A.; BRANDONISIO, O.; CIRCELLA, E.; DANTAS-TORRES, F.; CAMARDA, A. **Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken.** *Acta Tropica*, Basel, v. 113, n. 1, p. 80–83, 2010. 3 p.

PORROZZI R DA COSTA M.V.S.; TEVA A.; FALQUETO A.; FERREIRA A.L.; DOS SANTOS C.D.; FERNANDES A.P.; GAZZINELLI R.T.; CAMPOS-NETO A.; GRIMALDI G. **Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant *leishmania* antigens for serodiagnosis of**

symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vacc Immunol*, Washington, v. 14, p. 544-548, 2007.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; MACHADO, R. Z.; NUNES, C. M.; SATRKE-BUZETI, W. A. **Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação coma RIFI e ELISA-teste.** *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 34-40, jan/mar. 2010. 6 p.

RAMIRO, M. J.; ZÁRATE, J. J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILHO, J. A.; LARRAGA, V. **Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous primeboost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK.** *Vaccine*, Kidlington, v. 21, p. 2474–2484, 2003.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. ***Flebotomíneos do Brasil***. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. 367 p.

REALE S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLORIOSO, N. S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. **Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 2931–2935. 1999. 4 p.

REICHENOW, E. **Ostafrikanische Beobachtungen an Trypanosomiden.** *Arch. f. Protistenk.*, [S. l.], v. 94, p. 267–287, 1940. 20 p.

RIBEIRO, V. M. **Leishmaniose Visceral Canina: Aspectos de tratamento e controle.** *Revista Clínica Veterinária*, [S. l.], ano 12, n. 71, p. 66, 2007.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. **Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*.** *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 3, n. 71, p. 267-275, 1990.

RODRIGUES, A. C.; NEVES, L.; GARCIA, H. A.; VIOLA, L. B.; MARCILI, A.; MAIA, D. A.; SILVA, F. **Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique.** *Parasitology*, London, v. 135, p. 1317–28, 2008.

RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; TEIXEIRA, M. M. **Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences.** *Parasitology*, London, v. 132, p. 215–224, 2006.

RODRIGUES, A. C.; GARCIA, H. A.; BATISTA, J. S.; MINERVINO, A. H.; GÓES-CAVALCANTE, G.; MAIA DA SILVA, F.; FERREIRA, R. C.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; TEIXEIRA, M. M. G. **Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian**

isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology*, London, v. 137, p. 111–122, 2010a.

RODRIGUES, A. C.; GARCIA, H. A.; ORTIZ, P. A.; CORTEZ, A. P.; MARTINKOVIC, F.; PAIVA, F.; BATISTA, J. S.; MINERVINO, A. H.; CAMPANER, M.; PRAL, E. M.; ALFIERI, S. C.; TEIXEIRA, M. M. G. **Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis.** *Parasitol. Int.*, London, v. 59, p. 318–325, 2010b.

RODRIGUES, A. C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; DELL' PORTO, A.; MILDER, R. V.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. G. **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.** *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v. 116, p. 185–207, 2003.

ROLÃO, N.; MARTINS, M. J.; JOÃO, A.; CAMPINO, L. **Equine infection with *Leishmania* in Portugal.** *Parasite*, Issy les Moulineaux, v. 12, p. 183-186, 2005.

ROSA, B. R. T.; FERREIRA, M. M. G.; AVANTE, M. L.; FILHO, D. Z.; MARTINS, I. S.; PICCININ, A. **Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão leiteira.** *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, [S. l.], n. 8, p. 1-6, 2007.

ROSS, R. (1) **note on the bodies recently described by *Leishman-Donovan* and (2) Further notes on *Leishman's* bodies.** *British Medical Journal*, London, v. 2, n. 1, p. 1261-1401, 1903.

SANNUSI, A. **Organization of African Unity. Unity, scientific technical and Research Commission, Nairobi, Kenya. Pathological changes associated with experimental *Trypanosoma vivax* Infection in Zebu cattle.** In: MEETING OF THE INTERNATIONAL SCIENTIFIC COUNCIL FOR TRYPANOSOMIASIS RESEARCH AND CONTROL, 16., 1979, Younde. *Proceedings...* [S. l.: s. n.], 1979. p. 203-214.

SERRA-FREIRE, N. M. **Oiapoque: outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil.** *Revista Bras. Med. Vet.*, Rio de Janeiro, v. 4, p. 30-31, 1981.

SAMAD, M. A.; SHAHIDULLAH, M. ***Trypanosoma theileri* infection in cattle of Bangladesh.** *Ind. Vet. J.*, Madras, v. 62, p. 903–905, 1985.

SCHLAFFER, D. H. ***Trypanosoma theileri*: a literature review and report of incidence in New York cattle.** *Cornell Vet.*, Ithaca, v. 69, p. 411–425, 1979.

SCHWANKE, K.; SILVA, A. M. M.; PACHECO, A.; BAHIA, M.; SILVEIRA, F. T.; SCOFIELD, A. **Diagnóstico molecular e frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em cães do município de Belém, Pará.** *Pesquisa Vet Bras.*, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, p. 255-60, 2014.

SEIFI, H.A., **Clinical trypanosomosis due to *Trypanosoma theileri* in a cow in Iran.** *Trop. Anim. Health Prod.*, Edinburgh, v. 27, p. 93–94, 1995.

SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; FREITAS, J.; MESQUITA, D.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. **Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil.** *Memórias Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 91, n. 5, p. 561-562, 1996.

SILVA, M. A. L.; MEDEIROS, R. A.; FILHO, S. B.; MELO, L. F.; MEDEIROS, Z. **Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana.** *Revista Eletrônica de Farmácia*, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 1-15, 2010.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; ABRANTES, T. R.; BARBOSA FILHO, C. J. L.; FIGUEIREDO, F. B. **Assessment of serological tests for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis.** *The Veterinary Journal*, London, v. 195, n. 2, p. 252-253, 2013.

SINGH, N.; MISHRA, J.; SINGH, R.; SINGH, S. **Animal reservoirs of visceral leishmaniasis in India.** *Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 99, n. 1, p. 64-67, 2013.

SISWANSYAH, D. D.; TARMADJI, I. **Prevalence of trypanosomiasis in cattle and buffaloes in south Kalimantan. Using the hematocrit method,** *Peryakit-Hewan*, v. 21, p. 118-122, 1989.

SHIMABUKURO P.H.F. E GALATI, E.A.B. **Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica.** *Biota Neotropica*, Campinas, v. 11, p. 1-20, 2010.

SHERLOCK, I. A. **Importância Médico-Veterinária.** In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). ***Flebotomíneos do Brasil***. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003. Cap. 1., p. 15-22.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. ***Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) a review.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 75, p. 303-330, 2003.

SOBRINHO, L. S. V.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; BRAGA, E. T.; GOMES, A. M. D.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; GENEROSO, D.; LANGONI, H.; LEUTENEGGER C.; BIONDO, A. W.; LAURENTI, M. D.; MARCONDE, M. **Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline ImmunodeficiencyVirus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area zoonotic visceral leishmaniasis.** *Vet Parasitol*, Amsterdam, v. 187, p. 302-306, 2012.

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

SHAW, J. J.; LAINSON, R. ***Trypanosoma vivax* in Brazil.** *Ann Trop Med Parasitol.*, London, v. 66, p. 25-32, 1972.

SOUZA, N. P.; ALMEIDA, A. B. P. F.; FREITAS, T. P. T. F.; PAZ, R. C. R.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. ***Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 43, n. 3, p. 333-335, 2 p. 2010.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALIK, M. S. M. **An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues.** *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

TÉLLEZ, M. B.; MELÉNDEZ, Y. A.; MARTINEZ, A. M.; FIGUERAS, N. B.; MENDONZA, M. M.; SÁNCHEZ, M. M. **Influencia de la época y región en algunos indicadores reproductivos del búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) en el territorio oriental de Cuba.** *Revista Electrónica de Veterinaria - REDVET*, [S. l.], v. 6, n. 9., p. 1-6, 2005.

TENÓRIO, M. S., OLIVEIRA E SOUSA, L.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. S.; RODRIGUES, M. V.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; LUCHEIS S. B. **Molecular identification of trypanosomatids in wild animals.** *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 203, p. 203–206,. 2014.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISE, R.G. ***Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*.** 2. ed. São Paulo: Roca, 2007. 582 p.

TRONCARELLI, M. Z. et al. ***Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis.** *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 164, n. 2-4, p. 118-123, 2009. 5 p.

VENTURA, R. M.; TAKATA, C. S.; SILVA, R. A.; NUNES, V. L.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. G. **Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals.** *J Parasitol.*, Lawrence, v. 86, p. 1289–98, 2000.

VERLOO, D.; BRANDT, J.; VAN MEIRVENNE, N.; BÜSCHER, P. **Comparative in vitro isolation of *Trypanosoma theileri* from cattle in Belgium.** *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v. 89, p. 129–132, 2000.

VENTURA, R. M.; PAIVA, F.; SILVA, R. A.; TAKEDA, G. F.; BUCK, G. A.; TEIXEIRA M. M. G. ***Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence.** *Exp Parasitol.*, San Diego, v. 99, p. 37–48, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lucha contra las leishmaniasis.** [S. l.], 1990. (Série Informe Técnico, 793)

ZANETTE, M. F, LIMA V. M. F. D, LAURENTI, MD, ROSSI, C. N, VIDES, J. P, VIEIRA, R. F. D. C, BIONDO, A. W, MARCONDES, M. **Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs.** *Rev Soc Bras Med Trop*; 47(1): 105 -107, 2014. 2 p.

ZWART, P. T. K. **The hematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood.** *Canadian Journal of Zoology*, Ottawa, v. 47, p. 921-923, 1969.

VILLA, A.; GUTIERREZ, C.; GRACIA, E.; MORENO, B.; CHACÓN, G.; SANZ, P. V.; BÜSCHER, P.; TOURATIER, L. **Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle.** *Ann. New York Acad. Sci.*, New York, v. 1149, p. 352–354, 2008.

WELLS, E. A. **Subgenus *Megatrypanum* In: biology of the kinetoplastida** (Lumsden, W. H. R. and Evans, D. A. (Ed.), London: Academic, p. 257–275. 1976.

WARD, W. H.; HILL, M. W.; MAZLIN, I. D.; FOSTER, C. K. **Anaemia associated with a high parasitaemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow.** *Vet. J.*, Amsterdam, v. 61, p. 324, 1984.

YOKOYAMAA, N.; SIVAKUMARA, T.; FUKUSHIA, S.; TATTIYAPONGA, M.; TUVSHINTULGAA, B.; KOTHALAWALA, H.; SEEKKUGE; SILVA, S. P.; NOBORU INOUE, N. I. I. Genetic diversity in ***Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes.** *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 207, p. 335–341, 2015.

APÊNDICE A – Exame hemograma dos búfalos

Tabela 7 - Exame hemograma dos búfalos (Fazenda São Francisco, Andradina, SP)

Animal	IA	VG	Erit. (x10 ⁶ /µL)	Hemog. (g/dL)	VCM	CHCM	Leuc. (x10 ³ /µL)	Neutróf	Linf.	Eosin.	Monoc.	Basof.	Proteína Plasmática Total (g/L)	Plaquetas (x10 ³ /µL)
01	M1618	32,1	7,82	13,3	41,0	41,4	19,5	6,2	12,4	2,3	0	0,0	68	51
02	M 1291	30,5	7,36	12,3	41,4	40,3	12,6	4,7	9,32	0,25	0	0,0	69	66
03	M 901	32,7	8,31	12,8	39,4	39,1	8,1	2,5	1,9	0,5	0,5	0,0	68	81
04	M 128	33,9	8,17	14,3	41,5	42,2	16,5	5,7	4,12	1,65	1,65	0,0	74	95
05	MF1087	30,5	7,92	12,5	38,5	41,0	12,5	5,8	7,5	1	0,25	0,0	72	127
06	F73	41,4	10,3	15,8	40,2	38,2	10,4	4,7	5,6	0,2	0	0,0	77	254
07	M271	32,8	7,68	13,8	42,7	42,1	12,1	4,0	7,2	0,24	1,2	0,0	78	332
08	F49	34,8	7,82	13,8	44,5	39,7	11,6	5,2	4,4	0,0	0,9	0,0	80	191
09	890029	31,4	7,67	13,4	40,9	42,7	13,6	5,5	9,5	0,2	0,2	0,0	75	274
10	02	33,0	7,60	13,2	43,4	40,0	13,0	7,3	6,84	0,7	0,13	0,0	76	218
11	M428	29,5	7,10	12,0	41,5	40,7	14,0	5,1	9,2	0,8	0	0,0	78	171
12	076	43,1	9,99	16,6	43,1	38,5	14,4	5,5	9,6	0,0	0	0,0	78	298
13	13	32,3	8,37	13,4	38,6	41,5	17,7	4,7	12	1	0,7	0,0	78	64
14	M10203	34,7	7,63	9,7	45,5	28,0	11,5	3,5	7,8	0,11	0,11	0,0	81	47
15	M1028	40,6	8,98	12,0	45,2	29,6	11,5	4,9	7,1	1,8	0	0,0	74	164
16	F236	42,3	9,52	12,0	44,4	28,4	13,3	6,5	8,2	0,39	0,13	0,0	78	131
17	F388	39,8	8,79	11,3	45,3	28,4	12,0	5,3	8,64	6,84	0	0,0	68	447
18	M1080	34,1	6,93	9,7	49,2	28,4	9,3	3,2	4,7	0,4	0	0,2	64	293
19	F169	33,3	8,04	13,4	41,4	40,2	13,6	4,7	8,16	0,54	0,54	0,0	76	75
20	F	29,0	7,33	12,3	39,8	42,1	11,8	3,3	5,6	1,4	0	0,2	20	70
21	FD	37,0	8,56	14,7	43,2	39,7	10,7	4,4	2,9	1	0	0,0	76	151
22	F542	39,0	8,50	14,9	45,9	38,2	11,2	6,0	5,6	1,1	0,4	0,0	76	152
23	M1093	32,4	7,86	13,3	41,2	41,0	12,4	4,5	8,9	0,0	0	0,0	67	218
24	F1052	33,8	8,18	13,3	40,5	40,2	14,1	5,1	9,8	0,28	0	0,08	67	440

25	M51	35,1	9,34	13,6	37,6	38,7	10,3	3,6	5,9	1	0,2	0,0	72	307
26	V14 (marca)	34,2	7,88	13,6	43,4	39,4	15,3	5,4	8,2	1,8	0,3	0,0	74	63
27	107	33,8	8,12	14,0	41,6	41,4	15,3	4,3	9,1	4,2	0,9	0,0	74	79
28	F901348	31,8	8,34	12,5	38,1	39,3	11,1	4,0	7,1	0;0	0,0	0,0	60	83
29	F901378	34,1	8,30	14,0	41,1	41,1	12,0	4,4	7,4	1,9	0,4	0,0	75	301
30	M463	36,6	9,41	14,5	38,9	39,6	14,8	5,4	10,9	0,8	0	0,0	73	171
31	1021	33,1	8,71	13,2	38,0	39,9	8,2	4,1	4,1	0,3	0	0,0	71	303
32	44	27,1	6,60	10,5	41,1	38,7	12,3	4,8	7,8	0	0	0,0	73	312
33	46	33,4	7,71	13,4	43,3	40,1	13,8	6,6	4,4	1,3	1,1	0,0	73	115
34	1282	32,4	8,08	13,4	40,1	41,4	12,8	5,8	7,1	0	0,5	0,0	72	177
35	F104012	35,6	8,39	14,0	42,4	39,3	13,7	6,6	6,57	0,82	0,82	0,0	70	184
36	M1085	34,9	8,24	14,0	42,4	40,1	10,6	3,8	4,6	0,4	0	0,0	72	134
37	F506	33,3	7,98	13,3	41,7	39,9	11,9	5,0	7,14	0,2	0,47	0,25	71	220
38	39	35,5	9,31	13,9	38,1	39,2	14,7	5,4	10,8	0,29	0	0,0	77	240
39	F81	42,1	10,24	17,0	41,1	40,4	15,0	5,8	10,2	0,9	1,5	0,0	80	204
40	623	37,0	8,67	14,8	42,7	40,0	15,5	7,5	10,5	0,3	0	0,0	70	246
41	M1475	32,0	7,73	13,2	41,4	41,3	10,3	4,8	3,5	0,4	0,4	0,0	68	202
42	60264	33,6	8,48	14,0	39,6	41,7	13,2	5,4	7,9	0,5	1	0,0	66	352
43	564	32,7	7,25	13,6	45,1	41,6	13,6	4,6	9,2	0	0,2	0,0	76	69
44	M06A	31,2	7,92	13,4	39,4	42,9	12,1	4,9	8,7	0,4	0	0,0	78	376
45	596	33,5	8,42	13,1	39,8	39,1	14,0	4,5	3,3	0	7,2	0,5	68	20
46	M5-1596	32,8	7,93	13,1	41,4	39,9	12,8	4,1	5,1	0,2	5,1	0,0	66	177
47	504	36,5	10,04	14,2	36,4	38,9	13,3	4,1	7,7	0	1	0,0	68	294
48	90554	33,9	8,20	12,8	41,3	37,8	14,9	6,0	9,5	0	6,8	0,0	65	102
49	F193	32,9	7,68	13,5	42,8	41,0	17,3	7,6	11,7	0,3	1,7	0,0	62	167
50	M901544	31,9	7,92	12,7	40,3	39,8	12,4	4,6	8,6	0,2	1,4	0,0	72	132
51	F014	31,1	7,84	12,0	39,7	38,6	11,2	5,8	8,5	0,2	0,2	0,0	74	369
52	40030	36,2	8,77	14,6	41,3	40,3	11,9	4,1	9,2	0,4	0,9	0,0	74	115
53	M90121	39,9	10,81	15,4	36,9	38,6	11,8	5,0	9,2	0,4	0,23	0,0	81	169

54	37	36,6	8,31	15,1	44,0	41,3	11,2	4,9	5,6	0,2	0	0,2,	77	164
55	1088	33,2	8,49	12,7	39,1	38,3	17,3	4,8	13,2	0	0,6	0,0	78	82
56	47	38,6	9,86	14,6	39,1	37,8	16,5	5,8	8,25	0	0,99	0,0	76	65
57	F1093	34,9	7,70	13,4	45,3	38,4	10,3	4,4	7	0	0	0,0	73	90
58	19	34,3	8,43	14,3	40,7	41,7	13,4	4,5	4,02	0,2	0,2	0,0	73	54
59	145	32,5	8,29	13,7	39,2	42,2	17,0	6,8	12,2	0	0	0,34	89	74
60	M4021	35,7	8,9	14,2	44,1	39,8	11,1	3,9	6,2	0,4	1,7	0,2	78	259
61	F1629	32,6	8,61	12,5	37,9	38,3	17,2	6,9	3,04	5,8	0	0,0	73	41
62	169	35,4	8,85	12,9	40,0	36,4	10,8	4,4	7,77	0,64	0	0,0	74	121
63	F530	36,2	8,35	14,5	43,4	40,1	12,6	4,3	6,5	0,5	2,5	0,0	80	139
64	M900270	32,4	7,97	13,0	40,7	40,1	16,2	6,4	6,4	0	0,9	0,3	70	175
65	MA64	36,2	8,95	14,8	40,4	40,9	16,6	4,6	11,8	0	1,24	0,0	78	98
66	V357	29,9	7,27	11,7	41,1	39,1	8,2	3,8	0,2	0	1,3	0,0	73	458
67	128	39,2	8,44	14,9	46,4	38,0	15,9	6,5	9,8	1,5	1,5	0,0	86	48
68	M574	30,2	7,50	11,7	40,3	38,7	13,6	3,5	11,6	0	0,8	0,0	77	73
69	M28	33,8	9,10	13,6	37,1	40,2	19,1	7,5	7,6	0	3,4	0,0	87	24
70	177	33,5	7,93	13,4	42,2	40,0	12,1	6,4	8,4	0	0	0,0	78	168
71	M854	32,9	8,30	12,8	39,6	38,9	17,3	7,3	8,3	0,3	1,7	0,0	72	101
72	M96	31,4	7,86	12,5	39,9	39,8	13,8	5,2	7,7	0,2	1,6	0,0	72	107
73	F193	35,1	9,12	13,9	39,1	38,9	11,4	5,2	3,4	0,2	2,9	0,2	77	145
74	M917	33,2	7,99	13,2	41,6	39,8	15,3	5,4	9,9	0	0	0,0	76	50
75	M20	36,7	9,23	14,3	39,8	39,0	14,6	3,8	2,79	2,04	4,38	0,0	74	24
76	F402	40,8	10,05	15,7	40,6	38,5	12,0	4,5	8,16	0,12	0	0,0	68	121
77	F2021	37,0	8,31	14,8	44,5	40,0	12,0	5,1	7,9	0,4	1,4	0,0	76	123
78	369	32,9	8,06	13,2	40,8	40,1	15,8	7,3	10,1	0	4,74	0,0	74	303
79	1478	38,7	8,88	14,7	43,6	38,0	13,5	6,0	8,6	0,5	0	0,0	74	330
80	015	31,7	8,04	12,2	39,4	38,5	18,2	10,01	10,5	0	0,3	0,0	80	233
81	B90125	33,3	7,90	12,7	42,2	38,1	12,9	5,2	6,1	0	0	0,0	80	186
82	F290	36,6	9,37	14,4	39,1	39,3	12,6	5,1	8,1	0,7	0,2	0,0	76	292
83	632	37,1	8,82	14,5	42,1	39,1	13,1	4,4	9,17	0	1,04	0,0	78	111

84	2-935	34,8	8,52	13,6	40,8	39,1	12,8	4,1	9,7	0,25	0,51	0,0	72	191
85	V436	35,7	8,98	14,0	39,8	39,2	12,6	5,2	3,7	0,05	5,04	0,0	72	223
86	M957	38,9	9,41	15,0	41,3	38,6	13,4	6,2	3,2	0	0	0,0	76	151
87	F182	35,8	7,76	14,9	46,1	41,6	16,2	8,3	10,04	0,64	0,47	0,0	84	141
88	36	39,6	9,47	15,8	41,8	39,9	16,3	8,3	3,9	0	0,4	0,0	76	83
89	P18	36,8	9,46	13,9	38,9	37,8	11,5	6,1	5,98	0,23	0,23	0,0	78	156
90	M144	33,8	8,36	14,2	40,4	42,0	13,2	6,1	3,9	0,5	2,3	0,0	74	306
91	98	38,3	9,46	15,2	40,5	39,7	17,2	7,8	11,3	0,3	0	0,0	70	539
92	10	31,9	7,62	13,2	41,9	41,4	16,4	6,6	9,8	12	0,65	00	82	157
93	027	32,9	8,08	12,5	40,7	38,0	11,0	4,2	4,4	0	3,3	0,0	72	174
94	M7	31,8	8,20	12,1	38,8	38,1	13,6	5,8	5,9	0	5,4	0,0	80	207
95	078	34,5	8,65	14,4	39,9	41,7	13,4	5,6	7,2	0,2	0,2	0,0	78	50
96	1090	36,0	8,46	14,1	42,6	39,2	14,3	4,6	11,1	0	0	0,0	77	161
97	M82	34,2	8,93	13,5	38,3	39,5	14,2	6,8	3,6	0	3,6	0,2	74	166
98	65	33,2	8,52	12,4	39,0	37,3	13,3	5,2	2,1	0	1,33	0,2	74	295
99	M13	36,8	9,60	14,8	38,3	40,2	17,6	6,6	12,3	0	0,2	0,3	73	94
100	M233	36,8	8,92	14,9	41,3	40,5	17,8	6,2	14,5	10,3	0	0,0	79	118

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 8 - Exame Hemograma dos búfalos (FEPE, Selvíria, MS)

	IA	VG	Erit. ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemog. (g/dL)	VCM	CHCM	Leuc. ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Segm.	Linf.	Eosinof.	Monoci.	Basof.	Proteína Plasmática Total (g/L)	Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
01	506	39,2	9,27	15,9	42,3	40,6	12,4	7,3	5,1	0,9	0,0	0,0	70	176
02	511	37,3	9,20	15,0	40,5	40,2	14,8	9,1	5,7	0,1	0,0	0,0	61	299
03	504	42,5	10,52	16,7	40,4	39,3	15,5	10,8	4,7	0,1	0,0	0,0	69	295
04	505	38,5	9,02	15,5	42,7	40,3	17,3	9,4	7,9	1,1	0,0	0,0	69	316
05	502	39,5	9,42	16,2	41,9	41,0	17,3	9,4	7,9	1,3	0,0	0,0	70	371
06	509	35,8	8,54	15,0	41,9	41,9	12,7	7,0	5,7	0,5	1,2	0,0	62	159
07	510	36,5	9,31	14,7	39,2	40,3	12,3	7,4	4,9	0,1	0,0	0,0	72	206
08	508	35,0	8,04	14,2	43,5	40,6	12,7	7,9	4,8	0,0	0,1	0,0	65	304
09	503	33,4	8,01	13,8	41,7	41,3	16,1	10,1	6,0	0,1	0,0	0,0	65	218
10	507	37,6	8,63	15,8	43,6	42,0	14,6	9,5	5,1	0,0	1,4	0,0	69	228

Fonte: Elaboração do autor.

APÊNDICE B – Exames bioquímicos dos búfalos

Tabela 9 - Exames bioquímicos dos búfalos (Fazenda São Franscisco, Andradina, SP.)

	IA	ALT	AST	Ureia	Albumina	Creatinina
01	M1618	57	131	80	2,9	1,37
02	M 1291	41	154	80	2,6	1,24
03	M 901	47	145	66	2,1	0,46
04	M 128	48	137	66	2,8	0,34
05	MF1087	43	264	67	3,4	0,83
06	F73	19	122	52	3,4	0,07
07	M271	58	194	42	2,8	1,91
08	F49	67	315	59	2,7	0,65
09	890029	46	187	36	2,5	1,41
10	02	44	156	32	2,5	0,89
11	M428	39	250	30	1,5	1,28
12	076	74	156	41	3,4	1,28
13	13	51	188	40	35	1,70
14	M10203	71	181	74	3,0	1,67
15	M1028	58	203	24	3,1	1,17
16	F236	53	165	47	2,7	0,34
17	F388	55	171	85	4,4	0,25
18	M1080	35	163	43	2,1	0,59
19	F169	60	199	73	3,0	0,68
20	F	53	203	2	2,7	1.15
21	FD	42	178	1	3,8	1,86
22	F542	66	191	38	3,4	1,72
23	M1093	55	213	58	3,0	0,94
24	F1052	67	208	33	2,8	0,71
25	M51	44	172	94	2,3	0,83
26	V14 (marca)	43	216	82	2,4	1,24
27	107	47	171	63	2,8	0,92
28	F901348	45	94	47	2,7	0,88
29	F901378	56	147	1	2,8	1,01
30	M463	59	214	104	3,2	1,42
31	1021	46	161	43	3,3	1,00
32	44	21	215	57	3,1	0,53
33	46	58	197	55	2,6	2,00
34	1282	50	234	63	2,7	0,77
35	F104012	61	203	2	3,2	0,92
36	M1085	67	202	1	2,9	1,75
37	F506	50	173	1	3,2	1,70
38	39	51	198	1	3,7	0,90
39	F81	47	180	79	3,3	1,19
40	623	44	196	75	3,0	1,15
41	M1475	46	230	72	2,6	1,73

42	60264	51	194	62	3,2	1,49
43	564	79	210	46	2,9	1,09
44	M06A	71	191	77	2,6	1,03
45	596	55	295	73	2,9	0,76
46	M5-1596	55	179	104	2,8	0,95
47	504	45	151	75	2,6	1,01
48	90554	51	190	91	3,4	1,20
49	F193	43	198	60	2,8	0,94
50	M901544	49	187	62	1,9	1,08
51	F014	27	217	66	2,0	0,41
52	40030	49	258	69	2,1	0,73
53	M90121	55	151	69	1,8	1,15
54	37	55	170	56	3,7	0,60
55	1088	54	217	87	3,1	1,12
56	47	28	190	75	3,0	0,90
57	F1093	33	41	37	3,1	1,3
58	19	32	279	71	4,5	0,99
59	145	53	160	65	4,3	1,14
60	M4021	69	234	81	2,4	1,13
61	F1629	53	244	76	1,9	0,55
62	169	50	210	63	1,7	0,72
63	F530	51	189	67	2,6	1,21
64	M900270	67	265	81	1,9	0,83
65	MA64	67	200	114	3,5	1,44
66	V357	50	194	113	1,7	0,58
67	128	62	228	74	2,3	0,90
68	M574	31	240	118	1,8	0,85
69	M28	64	217	58	2,4	0,68
70	177	57	151	58	3,1	0,65
71	M854	48	186	93	4,7	0,98
72	M96	34	217	46	1,6	0,42
73	F193	57	230	58	3,0	1,35
74	M917	50	280	54	2,8	1,20
75	M20	35	246	90	2,2	1,13
76	F402	54	202	61	2,4	0,72
77	F2021	55	204	90	9,7	0,92
78	369	63	239	89	2,6	0,74
79	1478	79	322	61	2,5	0,55
80	015	49	113	1	1,6	0,37
81	B90125	46	201	1	2,8	0,85
82	F290	51	203	159	3,4	0,73
83	632	65	198	54	2,9	0,69
84	2-935	49	199	186	2,8	0,46
85	V436	67	218	90	3,0	2,10
86	M957	51	222	87	3,0	1,44
87	F182	60	256	87	3,3	0,32
88	36	62	195	103	2,8	0,60

89	P18	45	158	39	2,8	1,04
90	M144	58	129	94	3,0	0,65
91	98	54	183	89	2,2	1,34
92	10	51	230	112	1,9	1,03
93	027	77	223	66	2,5	0,39
94	M7	46	211	109	2,1	0,99
95	078	58	270	91	2,7	1,24
96	1090	42	184	80	2,4	0,37
97	M82	36	192	74	1,9	0,53
98	65	30	163	50	1,3	1,38
99	M13	47	169	105	3,0	0,99
100	M233	44	242	74	2,7	2,25

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 10 - Exames bioquímicos dos búfalos (FEPE, Selvíria, MS)

	IA	ALT	AST	Ureia	Albumina	Creatinina
01	506	46	145	56	2,4	1,96
02	511	50	128	64	2,2	2,03
03	504	37	175	51	2,39	1,81
04	505	43	145	66	2,6	1,93
05	502	48	174	56	2,4	1,94
06	509	32	219	57	2,3	2,04
07	510	37	122	48	1,9	1,85
08	508	37	122	63	2,1	1,72
09	503	36	162	62	2,1	1,88
10	507	39	179	55	2,3	1,98

Fonte: Elaboração do autor.

APÊNDICE C – Valores hematológicos de búfalos (Andradina) POSITIVOS no PA e na PCR

Tabela 11 - Análise hematológica de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco de Andradina, SP, positivos na infecção por protozoários da família Trypanosomatidae pelo parasitológico direto ou pela PCR comparando média, desvio padrão e amplitude. Ilha Solteira, SP, 2018.

Valores hematológicos de búfalos (Andradina) POSITIVOS no PA e na PCR (N = 76)				
Parâmetros	Média ± DP	Amplitude	Referência (Fontes et al, 2014)	Referência (Alencar Filho et al., 1972)
Hematócrito	35,37 ± 5,62	27,1 - 43,1	25 – 45	19 - 41
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	8,44 ± 0,81	6,6 - 10,81	4,7 – 11,8	7,3 – 10,9
Hemoglobinas (g/dL)	13,60 ± 1,28	9,7 - 15,7	08 – 16	11,0 – 17,4
VCM	41,33 ± 2,37	36,4 - 49,2	37 – 66	18 - 50
CHCM	39,17 ± 3,14	28,4 - 42,9	27 – 36	31 - 97
Leucócitos (x10 ³ /μL)	13,46 ± 2,37	8,1 - 19,5	04 – 12	10,2 - 30
Neutrófilos	4,94 ± 4,04	0,94 - 11,1	0,6 – 4,0	3,4 – 11,2
Monócitos	0,74 ± 1,17	0 - 4,74	0,0 – 0,98	0 -1, 9
Basófilos	0,01 ± 0,06	0 - 0,34	0,18 – 0,37	0 – 12,9
Linfócitos	7,59 ± 2,48	2,9 - 12,4	8,1 – 9,2	3,5 – 19,7
Eosinófilos	0,50 ± 0,81	0 - 2,3	0,2 – 1,2	1,2 – 5,5
PPT (g/L)	74,30± 5,33	60 - 89	70 – 85	-
Plaquetas (x10 ³ /μL)	175 ± 105	24 - 539	101 – 775	-

Nota: VCM = volume corpuscular médio; CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média. PPT: Proteína Plasmática Total. PA = Parasitológico.

Fonte: Elaboração do autor.

**APÊNDICE D – Valores hematológicos de búfalos (Andradina)
NEGATIVOS no PA e na PCR**

Tabela 12 - Análise hematológica de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco de Andradina, SP, negativos na infecção por protozoários da família Trypanosomatidae pelo exame parasitológico direto ou pela PCR, comparando media, desvio padrão e amplitude. Ilha Solteira, SP, 2018.

Valores hematológicos de búfalos (Andradina) NEGATIVOS no PA e na PCR (N = 24)				
Parâmetros	Média ± DP	Amplitude	Referência (Fontes et al, 2014)	Referência (Alencar Filho et al., 1972)
Hematócrito	34,21 ± 2,84	29 - 39,6	25 – 45	19 - 41
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	8,40 ± 0,72	7,5 - 9,86	4,7 - 11,8	7,3 – 10,9
Hemoglobinas (g/dL)	13,49 ± 1,16	11,7 - 15,8	08 – 16	11,0 – 17,4
VCM	40,74 ± 2,18	37,6 - 46,1	37 - 66	18 - 50
CHCM	39,47 ± 1,24	37,3 - 42,1	27 – 36	31 - 97
Leucócitos (x10 ³ /μL)	13,60 ± 2,57	8,2 - 17,8	04 – 12	10,2 - 30
Neutrófilos	4,12 ± 2,31	1,41 - 1,4	0,6 - 4,0	3,4 – 11,2
Monócitos	1,99 ± 2,85	0 - 5,04	0,0 - 0,98	0 -1, 9
Basófilos	0,07 ± 0,17	0 - 0,7	0,18 - 0,37	0 – 12,9
Linfócitos	7,06 ± 3,69	0,5 - 14,5	8,1 - 9,2	3,5 – 19,7
Eosinófilos	0,24 ± 0,39	0 - 0,64	0,2 - 1,2	1,2 – 5,5
PPT (g/L)	72,32 ± 11,60	20 - 84	70 - 85	-
Plaquetas (x10 ³ /μL)	176,52 ± 116,60	20 - 458	101 - 775	-

Nota: VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. PPT: Proteína Plasmática Total, PA = Parasitológico.

Fonte: Dados do próprio autor.

APÊNDICE E – Valores hematológicos dos búfalos da FEPE (positivos e negativos)

Tabela 13 - Análise hematológica de búfalos provenientes da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão – FEPE / UNESP, Selvíria, MS, tanto positivos quanto negativos para a infecção por protozoários da família Trypanosomatidae no parasitológico direto ou na PCR comparando média, desvio padrão e amplitude. Ilha Solteira, SP, 2018.

Valores hematológicos dos búfalos da FEPE (positivos e negativos) (N = 10)				
Parâmetros	Média ± DP	Amplitude	Referência (Fontes et al, 2014)	Referência (Alencar Filho et al., 1972)
Hematócrito	37,34 ± 2,66	33,4 - 42,5	25 – 45	19 - 41
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	8,96 ± 0,77	8,01 - 10,52	4,7 - 11,8	7,3 – 10,9
Hemoglobinas (g/dL)	15,21 ± 0,93	13,8 - 16,7	08 – 16	11,0 – 17,4
VCM	41,71 ± 1,47	39,2 - 43,6	37 - 66	18 - 50
CHCM	40,76 ± 0,87	39,3 - 42	27 – 36	31 - 97
Leucócitos (x10 ³ /μL)	14,81 ± 1,92	12,4 - 17,3	04 – 12	10,2 - 30
Neutrófilos	5,13 ± 1,57	3,3 - 8,3	0,6 - 4,0	3,4 – 11,2
Monócitos	0,3 ± 0,57	0 - 1,4	0,0 - 0,98	0 -1, 9
Basófilos	0	0	0,18 - 0,37	0 – 12,9
Linfócitos	8,54 ± 2,72	5,3 - 11,9	8,1 - 9,2	3,5 – 19,7
Eosinófilos	0,36 ± 0,49	0 - 1,3	0,2 - 1,2	1,2 – 5,5
PPT (g/L)	66,88 ± 3,78	61 - 72	70 - 85	-
Plaquetas (x10 ³ /μL)	266,22 ± 66,79	159 - 316	101 - 775	-

Nota: VCM = volume corpuscular médio; CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média. PPT: Proteína Plasmática Total. PA = Parasitológico.

Fonte: Elaboração do autor.

APÊNDICE F – Valores bioquímicos de búfalos (Andradina) POSITIVOS no PA e na PCR

Tabela 14 - Análise de valores médios do exame bioquímico do sangue de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco, Andradina, SP, **positivos** para a infecção por protozoários da família Trypanosomatidae pelo parasitológico direto ou pela PCR comparando média, desvio padrão e amplitude. Ilha Solteira, SP, 2018.

Valores bioquímicos de búfalos (Andradina) POSITIVOS no PA e na PCR (N = 76)			
Parâmetros	Média ± DP	Amplitude	Referência (Fontes et al, 2014)
ALT	51,64 ± 12,19	19 - 79	22,9 – 40,97
AST	190,16 ± 36,47	131 - 250	174,8 – 386,6
Ureia	49,28 ± 28,13	1 - 104	28,7 – 61,56
Creatinina	1,09 ± 0,49	1 - 1,75	2,1 – 2,36
Albumina	3,70 ± 5,03	1,5 - 4,4	1,3 – 2,39

Nota: ALT: alanina aminotransferase. AST aspartato aminotransferase. PA

Fonte: Elaboração do autor.

APÊNDICE G – Valores bioquímicos de búfalos (Andradina) NEGATIVOS no PA e na PCR

Tabela 15 - Análise de valores médios do exame bioquímico do sangue de búfalos provenientes da Fazenda São Francisco, Andradina, SP, **negativos** para a infecção por protozoários da família Trypanosomatidae pelo parasitológico direto ou pela PCR. Ilha Solteira, SP, 2017.

Valores bioquímicos de búfalos (Andradina) NEGATIVOS no PA e na PCR (N = 24)			
Parâmetros	Média ± DP	Amplitude	Referência (Fontes et al, 2014)
ALT	51,44 ± 11,73	77 – 28	22,9 – 40,97
AST	203,87 ± 48,03	280 – 41	174,8 – 386,6
Ureia	77,24 ± 29,95	186 – 1	28,7 – 61,56
Creatinina	0,92 ± 0,38	2,25 – 0,37	2,1 – 2,36
Albumina	2,76 ± 1,15	9,7 – 1,6	1,3 – 2,39

Fonte: Dados do próprio autor. ALT: alanina aminotransferase. AST aspartato aminotransferase. PA = Parasitológico.

APÊNDICE H – Valores bioquímicos de búfalos da FEPE (positivos e negativos) no PA e na PCR

Tabela 16 - Análise bioquímica de búfalos provenientes da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão – FEPE / UNESP, Selvíria, MS, para a infecção por protozoários da família Trypanosomatidae pelo parasitológico direto ou pela PCR. Ilha Solteira, SP, 2017.

Valores bioquímicos de búfalos da FEPE (positivos e negativos) no PA e na PCR (N = 10)			
Parâmetros	Média ± DP	Amplitude	Referência (Fontes et al, 2014)
ALT	39,88 ± 5,92	32 – 50	22,9 – 40,97
AST	158 ± 32,36	122 - 219	174,8 – 386,6
Ureia	58 ± 6,16	48 - 66	28,7 – 61,56
Creatinina	1,9 ± 0,10	1,72 - 2,04	2,1 – 2,36
Albumina	2,25 ± 0,20	1,9 - 2,6	1,3 – 2,39

ALT: alanina aminotransferase. AST aspartato aminotransferas. PA = Parasitológico.
Fonte: Elaboração do autor.