



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA  
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais**

**MIRIAN DOS SANTOS PAIXAO**

**Análise Espacial e Detecção de Tripanosomatídeos em  
Animais de Produção de Região Endêmica para  
Leishmaniose Visceral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Doutora em Doenças  
Tropicais

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Simone Baldini Lucheis

Botucatu

2017

**MIRIAN DOS SANTOS PAIXÃO**

**Análise Espacial e Detecção de Tripanosomatídeos em  
Animais de Produção de Região Endêmica para  
Leishmaniose Visceral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para  
obtenção do título de Doutora em Doenças  
Tropicais

**Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis**

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Paixão, Mirian dos Santos.

Análise espacial e detecção de tripanosomatídeos em animais de produção de região endêmica para leishmaniose visceral / Mirian dos Santos Paixão. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Simone Baldini Lucheis  
Capes: 50502042

1. Bovino - Doenças - Diagnóstico. 2. Equídeo. 3. Leishmaniose visceral. 4. Tripanossomose.

Palavras-chave: bovinos; diagnóstico; equídeos; leishmanioses; tripanossomíases.

# *Dedicatória*

Aos meus pais, José Augusto da Paixão e Marisa Paixão, meus maiores incentivadores, exemplos de seres humanos, pais, amigos e profissionais. Sempre me ensinando que entregando nossos sonhos nas mãos de Deus e indo à luta, independente das circunstâncias, ELE sempre fará muito além daquilo que pedimos ou pensamos. Ainda que eu usasse um grande número de palavras para descrevê-los, não conseguiria expressar tudo o que representam para mim.

Amo Vocês!!!!

# *Agradecimentos*

Á Deus, por me conceder saúde, força, sabedoria, me direcionar e colocar as pessoas certas no meu caminho. Por ser o meu pastor e nada ter me deixado faltar, durante essa etapa da vida. Sou grata a ELE todos os dias, e nunca me esquecerei de todos os benefícios que tem feito a mim. “ Tu és o meu Deus; graças te darei! Ó meu Deus, eu te exaltarei! Dou graças ao Senhor, porque ELE é bom; o seu amor dura para sempre”. Salmos 118: 28-29.

Aos meus irmãos, Josiane e Jessé, obrigada por todo carinho, incentivo e orações. Me sinto privilegiada por ter sido presenteada com irmãos tão especiais.

A minhas avós, que com toda simplicidade, mesmo sem entenderem o que estava acontecendo, sempre torceram pelo meu sucesso e sempre me ofereceram a mais valiosa ajuda: suas orações.

As famílias Paixão, Santos e todos agregados, talvez vocês não tenham noção o que cada palavra de incentivo recebida de cada um, representou para mim, mas saibam que me deram forças para acreditar e ir em busca dos meus sonhos.

Ao meu namorado Hederson Marques, agora tenho certeza que Deus me trouxe você de volta no momento certo. Obrigada por toda paciência, carinho e compreensão.

As minhas queridas amigas, Tamiris Desidério e Francilene Capel, vocês sempre serão uma das melhores lembranças dos presentes que a pós graduação me permitiu conquistar.

Para continuar os agradecimentos preciso usar as sábias palavras do apóstolo Paulo “Dou graças ao meu Deus todas as vezes que me lembro de vós” (Filipenses: 1:3), as pessoas que irei mencionar a partir de agora, foram fundamentais para que o trabalho fosse realizado .

À minha orientadora, Simone Baldini Lucheis, obrigada pela confiança, apoio, compreensão e todo incentivo durante os seis anos de pós-graduação .

À minha amiga-irmã Maria Fernanda, como é difícil te agradecer, me faltam palavras. Uma parceria de 10 anos e que nunca será esquecida, são tantas aventuras que precisamos escrever um livro...rs... Além de te agradecer por toda ajuda acadêmica, preciso muito agradecer por toda cumplicidade, risadas, conversas e conselhos.

À Lívia Maísa Guiraldi, a pessoa mais fofa que tive o prazer de conviver durante os últimos quatro anos, obrigada por cada mensagem, por estar sempre disposta a ajudar quando precisei.

Ao amigo nerd Wesley José dos Santos, obrigada por ajudar sempre que o “mundo” da tecnologia não conseguia me compreender...rs

Ao veterinário Fábio Lemos, que abriu mão do seu precioso tempo para realização das coletas, agradeço pelo apoio

A Daniela Barbosa, pelo auxílio na realização da RIFI, obrigada por não medir esforços para me ajudar quando precisei.

A doutoranda Eloiza Teles Caldart da UEL, pela imensa ajuda na padronização do ELISA, não tenho palavras para agradecer.

Ao prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro da UEL, por abrir as portas do seu laboratório e me acolher tão bem.

A prof. Dra. Virginia Bodelão Richini-Pereira, por estar sempre disposta a ajudar, abrindo as portas do laboratório todas as vezes que precisei, independente do dia e hora. Agradeço também a todas as suas orientadas : Débora, Agatha, Barbara e Natássia, que sempre me receberam muito bem e me auxiliaram em tudo que precisei.

A doutoranda Cláudia Zurekan Kanda e ao prof Dr. Milton Cezar Ribeiro, da UNESP- Rio Claro, por toda contribuição e auxílio na análise espacial, com certeza essa parceria foi valiosa. Não me esquecerei de toda dedicação da Cláudia para que obtermos os melhores resultados possíveis.

Ao biólogo Rodrigo Salgueiro, pelo auxílio na fase inicial da análise espacial, obrigada por toda paciência e tempo dispensado para me ajudar

A todos funcionários do Centro de Controle de Zoonose de Bauru, sem a ajuda de vocês seria impossível realizar esse trabalho. Serei eternamente grata.

Aos funcionários da Secretaria de Saúde e Secretaria de Planejamento de Bauru, sempre dispostos a ajudar.

Aos proprietários dos animais das áreas periurbanas: Antônio, Pires e Marcos, pela confiança e por permitirem as coletas.

Aos mais novos amigos da pós graduação, Amanda Bezerra e Marcelo Augusto, obrigada pelas conversas, companhia e momentos de boas risadas.

Aos pesquisadores da APTA- Bauru, pelo apoio, conversas, incentivo. Aos demais funcionários Luizão, Jeremias, Simone, Mirian Filetti e Silmara, sempre vou me lembrar das risadas, almoços, café, na companhia agradável de vocês.

A Michely Tenório, mesmo distante, sempre presente quando precisei. Obrigada pelo incentivo e apoio desde a iniciação científica.

A prof. Dra. Wilma Starke Buzetti, obrigada pelo incentivo, companhia nos congressos e amizade.

Aos docentes, funcionários e alunos do programa de pós-graduação em Doenças Tropicais

À FAPESP/CAPES (Processo FAPESP – 2014/15808-6), pela concessão de bolsa e auxílio para realização do trabalho.

“ Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

(Martin Luther King)

## RESUMO

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

A família Trypanosomatidae é composta por protozoários flagelados da ordem Kinetoplastidae. Os protozoários do gênero *Trypanosoma*, causadores das tripanossomíases e gênero *Leishmania*, causadores das leishmanioses, são os parasitos de maior interesse médico e veterinário. As tripanossomíases são causadas por diferentes espécies, dentre elas: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*, sendo os três últimos de maior importância para os animais de produção, causando prejuízos econômicos para o setor agropecuário. Com o objetivo de avaliar a ocorrência de tripanosomatídeos no município de Bauru-SP, região endêmica para leishmaniose, foram avaliados 200 animais, sendo 100 bovinos (*Bos taurus*) e 100 equídeos (*Equus spp.*), procedentes de áreas urbanas e periurbanas do município. Para entender a distribuição de fatores de riscos na análise espacial, avaliou-se fatores epidemiológicos das leishmanioses, relacionados a seu diagnóstico nos animais de produção avaliados e também em cães e em humanos em diferentes bairros do município de Bauru, visando sua compreensão e integrá-las a estratégias de controle da doença. O diagnóstico dos animais foi baseado em técnicas parasitológicas: esfregaço sanguíneo e hemocultura; sorológicas: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e moleculares: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e seqüenciamento. Não foram encontradas formas sugestivas de protozoários em esfregaço sanguíneo, mas a análise de hemocultura de sete animais permitiu a visualização desses protozoários. Às técnicas sorológicas para *Leishmania spp.*, 25% dos bovinos e 16% dos equídeos foram reagentes à RIFI e 24% dos equídeos e 6% dos bovinos reagentes ao ELISA. A PCR foi realizada a partir de amostras de sangue, hemocultura, suabes conjuntivais e ectoparasitos, com *primers* que amplificam a região ITS e HSP70. A partir de amostras de sangue, 23% dos bovinos e 6% dos equídeos foram positivos e sete amostras de hemocultura de bovinos foram positivas, com pelo menos um dos *primers*. As amostras de ectoparasitos e suabes não apresentaram positividade à PCR. Em amostras de bovinos positivas à PCR foram identificadas espécies do gênero *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani* e *Trypanosoma theileri* e em amostras de equídeos, foram identificadas espécie do gênero *Leishmania*: *Leishmania donovani*. Os resultados obtidos às provas parasitológicas, sorológicas e/ou moleculares sugerem a presença de tripanosomatídeos em animais de produção do município no Bauru-SP. No presente

estudo, pela análise espacial, sugere-se o papel de proteção dos animais de produção para a ocorrência de leishmaniose em humanos.

**Palavras-chave:** tripanossomíases, leishmanioses, bovinos, equídeos, diagnóstico

## ABSTRACT

**PAIXÃO, MIRIAN DOS SANTOS.** Spatial analysis and detection of trypanosomatids in production animals from region endemic for visceral leishmaniasis. 151p. Thesis (Doctorate). Botucatu Medical School, São Paulo State University, 2017.

The family Trypanosomatidae is composed of flagellate protozoa of the order Kinetoplastida, divided into 10 genera. The Trypanosoma protozoa, which cause trypanosomiasis and *Leishmania* genus, which cause leishmaniosis, are the parasites of major medical and veterinary interest. Trypanosomiasis is caused by different species, among them: *Trypanosoma cruzi*, *T. theileri*, *T. equiperdum*, *T. evansi* and *T. vivax*, which affect production animals, causing economic damages to the agricultural sector. In order to evaluate the occurrence of trypanosomatids in the municipality of Bauru-SP, a region endemic for leishmaniosis, the present study evaluated 200 animals, 100 cattle (*Bos taurus*) and 100 equidae (*Equus* spp.) from urban and peri-urban areas of the municipality. In the spatial analysis, in order to understand the distribution of risk factors, we evaluated the epidemiological factors of leishmaniosis, related to its diagnosis in the studied animals, in dogs and in humans as well, from different districts of Bauru city, aiming a better comprehension and the strategies for the control of this disease. The diagnosis was based on parasitological techniques: blood smear and blood culture; serological tests: Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA); and molecular: Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequencing. No suggestive forms of protozoa were found in blood smears, but the blood culture analysis of seven animals allowed visualization of these protozoa. To the serological techniques for *Leishmania* spp., 25% of the cattle and 16% of the equines were reactive to IFAT and 24% of the equines and 6% of the cattle reactive to ELISA. PCR was performed from blood samples, blood cultures, conjunctival swabs and ectoparasites, with *primers* from the ITS and HSP70 region. From blood samples, 23% of cattle and 6% of equines were positive and seven samples of bovine blood culture were positive, with at least one of the *primers*. Samples of ectoparasites and swabs showed no PCR positivity. Specimens of the genus *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma theileri* were identified in specimens of PCR positive bovines, and species of the genus *Leishmania*: *Leishmania donovani* were identified in equine samples. The results obtained for the parasitological, serological and / or molecular tests suggest the presence of trypanosomatids in animals of the municipality of Bauru-SP. In this study, by the spatial analysis, the role of protection of the production animals for the occurrence of leishmaniosis in humans is suggested.

**Key-words:** trypanosomiasis, leishmaniosis, bovines, equines, diagnosis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização do município de Bauru no Estado de São Paulo.....	38
Figura 2: Número de equídeos ( <i>Equus spp.</i> ) e bovinos ( <i>Bos taurus</i> ) avaliados, de acordo com o sexo.....	40
Figura 3: Número de animais avaliados de procedência urbana e periurbana de equídeos ( <i>Equus spp</i> ) e bovinos ( <i>Bos taurus</i> ) do município de Bauru-SP.....	40
Figura 4: Delineamento experimental do estudo.....	42
Figura 5: A- Área periurbana do município de Bauru, sendo possível visualizar a proximidade com a área urbana. B, C e D- Presença de diferentes espécies animais junto aos bovinos e eqüídeos da pesquisa.Fonte: Arquivo pessoal .....	50
Figura 6: Bezerros holandês e girolando de área periurbana comprometidos nutricionalmente, com baixo peso, um dos sintomas das tripanossomíases, observado no estudo.....	51
Figura 7: Hemocultura positiva de bovino em meio LIT ( Liver Infusion Tryptose). Visualização de protozoários flagelados. Microscopia óptica, aumento 1000X. Fonte: Arquivo pessoal .....	53
Figura 8: Lâmina de hemocultura positiva de bovino com formas flagelares de protozoários corada com Giemsa. Microscopia óptica, aumento 1000X. Fonte: Arquivo pessoal.....	54
Figura 9: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) positiva para <i>Leishmania infantum</i> de bovino procedente do município de Bauru-SP. Fonte: Arquivo pessoal.....	55
Figura 10: Equídeo reagente para <i>Leishmania braziliensis</i> pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Fonte: Arquivo pessoal .....	57
Figura 11: Resposta sorológica de bovinos procedentes de Bauru-SP, para a técnica de ELISA para <i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania braziliensis</i> e para ambas espécies. ....	59
Figura 12: Resposta sorológica de equídeos procedentes de Bauru-SP para a técnica de ELISA para <i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania braziliensis</i> e para ambas espécies. ....	61
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose (2%) de produtos amplificados a partir de PCR-ITS1; L – marcador de peso molecular GE Healthcare Life Sciences ®(100 pb); números 8,	

18, 51, 56 e 64 animais positivos; + controle positivo ( <i>Leishmania infantum</i> ) e os demais controles negativos (água ultra-pura). Fonte: Arquivo pessoal.....	64
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de produtos amplificados a partir de PCR-ITS2; L – marcador de peso molecular GE Healthcare Life Sciences ®(100 pb); números 89 e 92 animais positivos; + controle positivo ( <i>Leishmania infantum</i> ) – controle negativo (água ultra-pura). Fonte: Arquivo pessoal.....	64
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de produtos amplificados a partir de PCR-ITS2; L – marcador de peso molecular GE Healthcare Life Sciences ®(100 pb); 1- controle positivo ( <i>Leishmania infantum</i> ), 2 – controle negativo (água ultra-pura).; números 3 a 18 amostras positivas. Fonte: arquivo pessoal .....	65
Figura 16: Amostras de sangue positivas de bovinos procedentes de Bauru-SP a partir do primer ITS2; HSP70 e para ambos os primers .....	65
Figura 17: Resposta sorológica dos equídeos procedentes de Bauru-SP, para as técnicas de RIFI e ELISA para <i>Leishmania</i> spp. ....	71
Figura 18: Resposta sorológica de bovinos procedentes de Bauru-SP, para as técnicas RIFI e ELISA para <i>Leishmania</i> spp.....	71
Figura 19: Distribuição de flebotomíneos no ano de 2014 em áreas de cobertura florestal de bairros do município de Bauru-SP. ....	77
Figura 20: Mapa dos bairros do município de Bauru – SP com divisão dos tipos de áreas de cobertura.....	78
Figura 21: Mapa dos bairros com casos de LV em humanos no município de Bauru- SP.....	82
Figura 22: Mapa dos bairros com casos de LV canina no município de Bauru- SP.....	84
Figura 23: Mapa dos bairros com casos de leishmaniose em equídeos no município de Bauru- SP.....	86

Figura 24: Mapa dos bairros com casos de leishmaniose em bovinos no município de Bauru-SP.....88

Figura 25: Coeficientes de regressão padronizado dos fatores em função da ocorrência da doença em humanos nos anos de 2013 a 2015.....89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de animais avaliados de acordo com a espécie.....	39
Tabela 2: Número de animais reagentes e títulos de anticorpos para <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania braziliensis</i> pela técnica de RIFI em bovinos de área urbana e periurbana do município de Bauru-SP.....	56
Tabela 3: Número de animais reagentes e títulos de anticorpos para <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania braziliensis</i> pela técnica de RIFI em equídeos de área urbana e periurbana do município de Bauru-SP.....	57
Tabela 4: Resultados sorológicos de bovinos procedentes de Bauru-SP para a técnica de ELISA para <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania braziliensis</i> . ....	59
Tabela 5: Resultados sorológicos de equídeos procedentes de Bauru-SP para a técnica de ELISA para <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania braziliensis</i> . ....	60
Tabela 6: Número de bovinos positivos e negativos à técnica de PCR para tripanosomatídeos, a partir de amostras de hemocultura, sangue, ectoparasitos e suabes.....	63
Tabela 7: Número de bovinos positivos à técnica de PCR com os primers LITSR/L5-8S, LITSV/L5-8S.R, HSP70F/HSP70R para tripanosomatídeos a partir de amostras de sangue, hemocultura, ectoparasitos e suabes conjuntivais. ....	63
Tabela 8: Número de equídeos positivos e negativos à técnica de PCR para <i>Leishmania</i> spp., a partir de amostras de hemocultura, sangue, ectoparasitos e suabes conjuntivais .....	66
Tabela 9: Número de equídeos positivos à técnica de PCR com os primers LITSR/L5-8S, LITSV/L5-8S.R, HSP70F/HSP70R para tripanosomatídeos a partir de amostras de sangue, hemocultura, ectoparasitos e suabes conjuntivais .....	67
Tabela 10: Resultado do seqüenciamento de amostras de sangue de equídeos procedentes de Bauru-SP.....	68
Tabela 11: Resultados do seqüenciamento de amostras de hemocultura de bovinos procedentes de Bauru-SP.....	68

Tabela 12: Resultados do seqüenciamento de amostras de sangue de bovinos procedentes de Bauru-SP.....	69
Tabela 13: Resultados das provas moleculares e sorológicas de equídeos a partir de amostras de sangue. ....	73
Tabela 14: Resultados das provas moleculares e sorológicas de bovinos a partir de amostra de hemocultura .....	73
Tabela 15: Resultados das provas moleculares e sorológicas de bovinos a partir de amostra de sangue. ....	74
Tabela 16: Apresentação geral dos resultados obtidos frente a diferentes técnicas diagnósticas para <i>Leishmania</i> spp. em bovinos ( <i>Bos taurus</i> ) e equídeos ( <i>Eqqus</i> spp) procedentes de Bauru-SP.....	76
Tabela 17: Tipo de cobertura observado em bairros com casos positivos de leishmaniose visceral canina e humana do município de Bauru- SP .....	79

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1.1 Gênero <i>Trypanosoma</i> .....	21
1.2. Gênero <i>Leishmania</i> .....	23
1.2.1 <i>Leishmaniose Visceral</i> .....	23
1.2.2. <i>Leishmaniose Tegumentar</i> .....	25
1.2.3. <i>Ciclo de Transmissão</i> .....	26
1.2.4. <i>Reservatórios</i> .....	27
1.2.4.1. Animais domésticos.....	27
1.2.4.2. Animais Silvestres .....	28
1.2.4.3. Animais de produção .....	28
1.2.5. <i>Diagnóstico</i> .....	30
1.2.5.1 Sistemas de Informação Geográfica (SIG).....	31
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
3.1. Objetivo Geral .....	36
3.2. Objetivos Específicos .....	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
4.1. Local de Estudo .....	38
4.2. Aspectos éticos.....	38
4.3. Espécies avaliadas .....	38
4.3.1. <i>Características epidemiológicas das espécies avaliadas</i> .....	39
4.3.1.1. Espécie .....	39
4.3.2 . <i>Sexo</i> .....	39
4.3.3 <i>Procedência</i> .....	39
4.4. Identificação dos animais e avaliação clínica.....	40
4.5. Coleta de amostras biológicas .....	41
4.5.1 <i>Sangue</i> .....	41
4.5.2 <i>Ectoparasitos</i> .....	41
4.5.3. <i>Secreção conjuntival</i> .....	42
4.6. Provas Diagnósticas .....	42
4.6.1. <i>Hemocultura</i> .....	42
4.6.2- <i>Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para tripanosomatídeos</i> .....	43
4.6.2.1- Preparo das amostras para extração de DNA .....	43
4.6.2.2. Controles.....	44
4.6.2.3. Eletroforese em gel de agarose .....	44
4.6.2.4. Sequenciamento .....	45
4.7. Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	45
4.8. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....	46
4.9. Análise espacial.....	47
5. Análise Estatística .....	48

<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
6.1 Análise Epidemiológica.....	50
6.1.1. Avaliação de Sinais Clínicos .....	51
6.2. Diagnósticos Parasitológicos .....	51
6.2.1 Esfregaços sanguíneos .....	51
6.2.2. Hemocultura.....	52
6.3. Diagnósticos Sorológicos .....	54
6.3.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	54
6.3.1.1. Bovinos.....	55
6.3.1.2 Equídeos .....	56
6.4. Ensaio Imunoenzimático ( Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA).....	58
6.4.1. Bovinos .....	58
6.4.2. Equídeos .....	60
6.5. Diagnóstico Molecular.....	62
6.5.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	62
6.5.1.1. Bovinos.....	62
6.5.1.2. Equídeos .....	66
6.6. Sequenciamento .....	67
6.6.1. Equídeos.....	68
6.6.2. Bovinos.....	68
6.7 Resultados Gerais das Provas Diagnósticas .....	70
6.7.1. Parasitológicos .....	70
6.7.2. Sorológicos .....	70
6.7.3. Avaliação Molecular.....	72
6.7.4. Comparação entre os resultados moleculares e de sequenciamento e respectivas respostas sorológicas observadas .....	72
6.8. Comparação entre todas as provas diagnósticas.....	75
6.9. Análise Espacial.....	76
6.9.1. Flebotomíneos.....	76
6.9.2. Tipo de Cobertura da área .....	77
6.9.3. Mapas dos bairros do município de Bauru com destaque para casos positivos de Leishmaniose .....	81
6.9.3.1. Humanos.....	81
6.9.3.2. Cães .....	83
6.9.3.3. Equídeos .....	85
6.9.3.4. Bovinos.....	87
6.9.4. Análise do coeficiente geral de todos os fatores.....	89
6.9.4.1. Área .....	89
6.9.4.2. Cães .....	89
6.9.4.3. Equídeos e Bovinos .....	90
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>92</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>94</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>113</b>
<b>10. APÊNDICES</b> .....	<b>115</b>

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados pertencentes a família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*. Esses parasitos estão divididos em 10 gêneros, sendo eles: *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Wallaceina*, *Sergeia*, *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma*, sendo os dois últimos capazes parasitar o homem e diferentes espécies animais vertebrados, causando doenças, conhecidas como leishmanioses e tripanossomíases (1)

### 1.1 Gênero *Trypanosoma*

Possui diferentes espécies que podem provocar prejuízos a saúde humana e animal, causando as tripanossomíases. No homem as espécies *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* spp., são consideradas de maior importância (2, 3). Em animais domésticos são descritas cinco espécies causadoras das tripanossomíases, sendo elas: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*, sendo os três últimos conhecidos como mais patogênicos e de maior importância veterinária, (4). Porém, na América do Sul as espécies de maior importância econômica e médica são: *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma cruzi* (5). As tripanossomíases que afetam os animais de produção causam inúmeros prejuízos, dentre eles perdas econômicas, pois podem levar a mortalidade dos animais, afetando também a agricultura devido a perda de animais de tração e ainda pode causar indiretamente prejuízos a saúde humana, levando a diminuição da produção de carne e leite pela debilidade dos animais (6, 7).

*T. cruzi* é o agente etiológico da Tripanosomíase Americana ou doença de Chagas, tendo como vetor insetos triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiros (8). É considerada um problema de saúde pública, já que, no Brasil, há uma média de 112, 1 registro de casos da doença por ano (9). A doença pode apresentar-se na forma assintomática até formas sintomáticas mais graves com comprometimento cardiodigestivo (10).

Várias espécies de animais silvestres e domésticos são considerados possíveis reservatórios do parasito, tais como: tatus, gambás, tamanduás, morcegos, cachorro-do-mato, cães e gatos, dentre outras (11, 12, 3, 13, 14). Sangue de bovinos foi identificado no conteúdo

intestinal dos triatomíneos, indicando o contato do parasito também com espécies de animais de produção (15).

*T. brucei* é o agente etiológico da doença do sono , com duas subespécies causando doenças em humanos: *Trypanosoma bruceigambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (16). Esses protozoários que tem como vetor moscas tsé-tsé, causam significativa morbidade e mortalidade em humanos e afetam também bovinos, causando prejuízos à pecuária (17, 18).

*T. vivax*, comum no oeste da África, é considerado o mais importante e mais patogênico tripanosoma de bovinos, mas também há registro da ocorrência em ovinos e caprinos, responsável por gerar grandes perdas na produtividade animal causando abortos, queda na produção de leite e infertilidade (19, 20, 21). No continente africano o vetor da doença são moscas tsé-tsé e na América do Sul os tabanídeos são considerados vetores dessa tripanossomíase (22). O primeiro caso da doença no Brasil foi descrita em búfalos em 1972 na região de Pará, mas atualmente há relatos de caso em várias regiões do país (5, 19, 23, 24, 25).

*T. evansi* tem como vetor moscas hematófagas; a doença causada por esse parasito é conhecida como “mal das cadeiras” ou “surra”, afetando várias espécies de mamíferos na Ásia, África e América Latina ( 26). A doença no Brasil é descrita apresentando duas formas, sendo uma delas caracterizada como uma síndrome aguda levando rapidamente a morte, que acomete principalmente equinos e cães; a outra, uma forma crônica, que pode afetar diversos animais silvestres (27, 28). No Brasil, há relatos de casos de surtos da doença em equinos (29, 30), bovinos (31), cães (32, 33) e animais silvestres (27).

*T. equiperdum*, parasito comum em equídeos , causando o “mal do coito” ou “durina” , é transmitido via coito por um animal infectado e está listada pela Organização Mundial da Saúde como uma das doenças importantes entre animais dessa espécie (34). É a única tripanossomíase que não é transmitida por um vetor invertebrado e já foi amplamente difundida em várias partes do mundo, mas atualmente encontra-se erradicada em muitos países (35). Os sinais clínicos da doença variam desde inchaço e edema nos órgãos genitais até sintomas mais graves, tais como aborto e sinais neurológicos (36).

*T. theileri* é considerado não patogênico, cosmopolita, comum em bovinos (37). No Brasil há relatos de casos nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Pará e Rio Grande do Sul (38). Apesar de ser considerado um parasito não patogênico, Sood

et al. (39) relataram o encontro do protozoário em cavidade peritoneal, ocasionando peritonite ativa crônica em uma vaca.

## 1.2. Gênero *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* e *Viannia*, são protozoários causadores das leishmanioses, doença que pode atingir o homem e diversas espécies de animais domésticos, silvestres e de produção (40, 41, 42, 43, 44, 45). A doença pode apresentar-se na forma visceral – Leishmaniose Visceral (LV) ou forma tegumentar - Leishmaniose Tegumentar (LT).

### 1.2.1 *Leishmaniose Visceral*

A LV é considerada a forma mais grave da doença e, depois da malária, é responsável por causar o maior número de mortes no mundo (46, 47). São consideradas doenças tropicais negligenciadas, que afetam principalmente regiões mais pobres (49).

A prevalência mundial da LV é de cerca de 12 milhões de indivíduos infectados (50). Fatores como condições ambientais, socioeconômico, migração, desmatamento, imunossupressão e desnutrição estão ligados a casos da doença e possível aparecimento de novos casos (51, 52). Tem se verificado uma mudança na epidemiologia da doença, já que a LV está se tornando urbanizada, devido a mudanças antrópicas causadas pelo homem, levando a adaptação dos vetores às áreas suburbanas e urbanas (53).

No Estado de São Paulo, no período de 2011 a 2015 foram confirmados 978 casos de LV e registraram-se 26 óbitos (54). No município de Bauru, segundo dados da Secretaria Municipal de Saúde e do Centro de Vigilância Epidemiológica (55), durante os anos de 2011 a 2015, foram confirmados 146 casos humanos de LV com registro de quatro óbitos no mesmo período. No ano de 2016 foram registrados oito (8) novos casos da doença, com um óbito (56). Em Bauru, também há um grande registro de casos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC), sendo registrado nos anos de 2014 a 2015 um total de 1484 casos da doença (57). Em estudo realizado por Cardim e colaboradores (58), avaliou-se a ocorrência espaço-temporal de leishmaniose visceral em humanos, tendo se verificado que Bauru está entre os municípios de maior incidência da doença. O município está classificado como área de transmissão canina e humana para LV (55)

A afecção pode manifestar-se na forma visceral em humanos e em outras espécies animais, sendo que em humanos apresenta três formas clínicas distintas: assintomática, somente diagnosticada quando da realização de inquéritos sorológicos em áreas de transmissão; oligossintomática, caracterizada pela presença de alguns sinais ou sintomas da doença tais como: febre, hepatomegalia, diarreia e anemia discreta, que podem persistir por cerca de três a seis meses, podendo evoluir para cura clínica espontânea ou para doença plenamente manifesta em cerca de dois a 15 meses; e clássica, que é plenamente manifesta. Nesta forma, as manifestações clínicas são bastante exacerbadas, caracterizadas por hepatoesplenomegalia volumosa, febre e comprometimento do estado geral, perda de peso progressiva, anorexia e astenia (53).

Em cães, a LV também é classificada em quatro categorias, de acordo com os sinais apresentados (53): assintomáticos; oligossintomáticos, com presença de adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pêlo opaco, sintomáticos com alguns sinais ou polissintomáticos com todos sinais da doença, como as alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores.

Em estudos com *Didelphis albiventris* e *Felis catus*, infectados com o agente etiológico da LV, os animais estavam assintomáticos ou apresentavam sinais clínicos semelhantes aos apresentados por cães sintomáticos (59, 60).

Os vetores são insetos dípteros, pertencentes à família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*. São insetos pequenos, corpo bastante piloso e mantêm as asas sempre eretas sobre o corpo. As espécies vetoras de maior importância epidemiológica no país pertencem ao gênero *Lutzomyia*. Atualmente há oitocentas espécies de flebotomíneos identificadas no mundo, sendo 60% localizadas em regiões neotropicais. No Brasil, até o momento, foram identificadas 229 espécies (61) e a maioria dos casos de LV está relacionada à transmissão *Lutzomyia longipalpis* e, a espécie *Lutzomyia cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (62).

O agente etiológico da LV nas Américas pertence à espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (53, 63). Na Índia e na África Oriental, as espécies causadoras da doença pertencem ao complexo donovani: *Leishmania donovani* (64).

### *1.2.2. Leishmaniose Tegumentar*

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, há registros da LT em humanos em todas regiões do país (65) e um grande número de LV em diversas regiões (66). A LT apresenta três perfis epidemiológicos: silvestre, com a transmissão ocorrendo em áreas de vegetação primária, ambiente propício para proliferação do vetor; ocupacional ou lazer esse, cujo padrão de transmissão está associado à exploração desordenada das florestas e derrubada de matas para construção, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias e o ecoturismo, caracterizando uma antropozoonose; e rural ou periurbano, em áreas de colonização ou periurbano, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (67).

Desde a antiguidade, a LTA já era conhecida como um grupo de doenças dermatológicas semelhantes entre si, com clínica associada a lesões cutâneas, geralmente ulcerosas e com comprometimento da mucosa oro-nasal em humanos (68). A doença pode manifestar-se de diversas maneiras, variando de acordo com o indivíduo. Os sintomas podem variar desde uma infecção inaparente, uma leishmaniose linfonodal que precede a lesão tegumentar até a leishmaniose cutânea propriamente dita com suas variações (69).

Dentre as formas cutâneas, a doença pode apresentar-se nas seguintes manifestações clínicas : cutânea localizada: lesão do tipo úlcera com tendência a cura espontânea; cutânea disseminada: apresenta múltiplas lesões papulares e cutânea difusa: há formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas (69).

Em cães, gatos, bovinos e equinos, pode apresentar-se como uma enfermidade crônica, com manifestações semelhantes as da doença humana, ou seja, o parasitismo ocorre preferencialmente em mucosas das vias aerodigestivas superiores (70).

No estado de São Paulo, a transmissão é caracterizada por dois perfis: o primeiro, envolvendo o ser humano quando em contato com o ciclo enzoótico silvestre e o segundo, relacionado com a transmissão domiciliar, em áreas onde ocorreram profundas modificações do ambiente natural, envolvendo além da população humana os animais sinantrópicos e espécies de flebotomíneos, que vêm se adaptando aos ambientes rurais e periurbanos (54).

No período de 2011 a 2015 foram confirmados 1571 casos humanos de LT, onde dois vieram a óbito no estado de São Paulo. Em Bauru durante esse período houve o registro de 23 casos da doença (54).

A LTA apresenta diversas espécies de flebotomíneos como vetores, e dependendo da região, no Brasil, as espécies transmissoras identificadas são: *Lutzomyia (Nyssomyia) antunesi*, *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* e *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* (71).

Já foram identificadas sete espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes a dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (72,73), como agentes etiológicos da LTA no Brasil sendo três classificadas como principais, duas pertencentes ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* – distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-oeste (Goiás); *Leishmania (Viannia) guyanensis* – aparentemente limitada ao norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e estendendo-se pelas Guianas e *Leishmania (Viannia) braziliensis* – tem ampla distribuição, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro-sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental. Há outras espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* descritas no Brasil, porém com poucos casos humanos: *L. (V) lainsoni*, *L.(V) naiffi*, no Pará; *L. (V) shawi* e *L. (V.) lindenberg* (70).

Importante destacar que a doença vem ocorrendo em áreas onde não há presença de flebotomíneos, atribuindo o possível papel de vetor a ectoparasito pois, quando presentes nos animais, também podem transmitir diversos patógenos, tais como bactérias, vírus e protozoários (74). Apesar de não estar bem esclarecido o papel dos ectoparasitos no ciclo epidemiológico das leishmanioses, estudos discutem a possibilidade da transmissão vetorial mecânica rápida (75, 76, 77, 78, 79), necessitando-se portanto mais trabalhos para investigar a possível transmissão vetorial da doença.

### 1.2.3. Ciclo de Transmissão

A fêmea do vetor necessita alimentar-se de sangue para maturação dos ovos, assim quando o flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em mamíferos, inocula formas promastigotas de *Leishmania* spp. na junção derme-epiderme. As promastigotas metaciclícas penetram nos macrófagos ou outras células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), transformam-se em amastigotas por fissão binária, formas responsáveis pela infecção, após intensa multiplicação o macrófago se rompe liberando as amastigotas para o meio

extracelular. Para continuidade do ciclo de transmissão, o vetor ingere sangue contaminado com amastigotas do hospedeiro infectado, as amastigotas transformam-se no intestino do vetor em promastigotas metaciclícas que se dividem por fissão binária e migram para probóscide, a qual irá transmitir o protozoário para um novo hospedeiro durante o repasto sanguíneo (80, 81).

#### 1.2.4. Reservatórios

Nas últimas décadas ocorreram intensas transformações ambientais favorecendo a adaptação de novas espécies de hospedeiros e vetores, de tal modo que permitiu-se a expansão da zoonose e o aumento significativo no número de casos, sendo então considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das prioridades dentre as doenças tropicais (8, 40). Em locais onde há freqüente ocorrência da doença, há estudos em diversas espécies de animais, com o objetivo de identificar a participação desses no ciclo epidemiológico e elaborar estratégias para o controle da enfermidade. Entretanto, estudos realizados no Brasil indicam que os reservatórios da doença ainda não estão bem definidos (41).

##### 1.2.4.1. Animais domésticos

Segundo nota divulgada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), a doença acomete principalmente o cão, considerado o reservatório principal da LV. Entretanto, marsupiais, roedores, bovinos, equinos e felinos, dentre outros, também podem ser infectados, assim como secundariamente o homem, constituindo-se portanto as leishmanioses zoonoses de grande importância em saúde pública (82). Por ser o principal reservatório da LV, o cão doméstico (*Canis familiaris*), sendo um dos alvos das estratégias de controle, pois possui grande importância na transmissão da enfermidade, provavelmente devido ao seu maior parasitismo cutâneo e por apresentar-se infectado em quase todos os focos brasileiros de leishmaniose visceral (calazar) humano (83). Os casos da doença em cães tem sido considerado fator determinante dos casos em humanos, pois nesses animais precedem o aparecimento da zoonose nos indivíduos de uma população (53). Os cães também podem ser hospedeiros do agente etiológico das LV (84).

Os gatos (*Felis catus*) também vêm sendo avaliados quanto a participação no ciclo epidemiológico da doença em região endêmica para LV canina, indicando esses animais também como possíveis reservatórios do agente etiológico da leishmaniose (85; 86, 87, 88, 89)

#### 1.2.4.2. Animais Silvestres

Há relatos também de espécies de canídeos silvestres, como raposas das espécies *Lycalopex vetulus*, cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), Lobo Guará (*Speotus venaticus*), encontrados naturalmente infectados por *L.infantum*, (41, 42, 43). Felinos silvestres também já foram diagnosticados com infecção por *Leishmania infantum* (90). Outros mamíferos silvestres como marsupiais do gênero *Didelphis*, primatas não-humanos *Allouata carayae* e roedores (91, 92)

#### 1.2.4.3. Animais de produção

Animais de produção, tais como equinos e bovinos, são capazes de atrair os flebotomíneos e algumas espécies são capazes de manter o parasito em seus organismos, contribuindo para a continuidade do ciclo do protozoário (93,44). Em diversos estudos a variedade de animais como fonte alimentar para vetores do gênero *Lutzomyia*, incluindo ruminantes e eqüídeos e a positividade em testes moleculares, sugere o potencial destes animais como reservatórios para esta zoonose (94, 95, 96, 97, 98, 99).

Corroborando com esta afirmação, em pesquisa realizada por Ximenes e colaboradores no Rio Grande do Norte verificou-se que os flebotomíneos apresentaram uma preferência alimentar particularmente em equinos (100).

Em áreas endêmicas de LV, estudos mostram que os bovinos também são frequentemente picados por flebotomíneos (101). No entanto, existe escassez no conhecimento sobre a susceptibilidade destes animais à infecção, atribuindo apenas o papel de atração ao vetor e aumento de risco de ocorrer a infecção em humanos (102, 103, 104). Porém, Bern et al. (105) relataram que, no Nepal, devido a preferência alimentar do vetor por bovinos e bubalinos, a presença destes animais nos peridomicílios constituía-se em um fator protetor para LV às pessoas.

Lobsiger et al. (106), descreveram um caso autóctone de leishmaniose cutânea em uma vaca, com identificação da espécie do parasito como *Leishmania siamensis*.

Alguns estudos recentes confirmam o potencial desses animais como fontes de alimentação para flebotomíneos no Brasil e em outras partes do mundo. Baum et al. (120), no Paraná, verificaram que alguns flebotomíneos capturados em peridomicílios haviam realizado repasto sanguíneo em equinos. Na Colômbia, Paternina et al. (99) também verificaram o repasto sanguíneo dos vetores em bovinos e equinos.

Relata-se na literatura equinos infectados por *Leishmania infantum* na Europa (107-110). No ano de 2005, em Portugal, Rolão e colaboradores descreveram o primeiro caso de infecção por *Leishmania* em um equino que apresentava uma lesão ulcerada de pele, sendo o diagnóstico baseado em teste sorológico e detecção do DNA do parasita por PCR Real-Time usando uma sonda específica para *L.infantum* (94). Gama e colaboradores, em 2014, realizaram estudo também em Portugal, mas dessa vez na região Norte do país, onde foi possível a partir de amostra de lesão em um cavalo encontrar uma similaridade de 98% com *Leishmania infantum* (111).

Há também relato de leishmaniose tegumentar equina nas Américas. Ramos-Vara, em 1996, descreve os primeiros casos da doença na América do Norte e Porto Rico, tendo-se dois cavalos apresentado sinais clínicos, tais como lesões nodulares no pavilhão auricular e pescoço, tendo-se confirmado posteriormente tratar-se de leishmaniose tegumentar por testes diagnósticos; na Flórida há descrito também um caso em equino (112)

No Brasil também foram descritos casos de *Leishmania* spp., em equinos. Em estudo realizado na Bahia por Follador et al. (113), avaliou-se um surto de LT em humanos, sendo observada também a ocorrência em cães e cavalos. Encontram-se descritos também estudos em Pernambuco (114), em Minas Gerais (115), Rio Grande do Sul (116) e Maranhão (117) com animais sororreativos ao método de ELISA e/ou positivos à PCR.

No estado de São Paulo, foi descrito pela primeira em 1988 por Yoshida e colaboradores o encontro de um cavalo infectado por *Leishmania* spp.; a partir de então, alguns estudos vem sendo realizados com o objetivo de tentar esclarecer o papel dessa espécie na epidemiologia da doença (118). No ano de 2013, Benvença realizou um estudo no município de Ilha Solteira- SP e Bragança Paulista- SP, consideradas região endêmica e não endêmica respectivamente, a fim de verificar a ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos, tendo-se confirmado casos de *Leishmania* spp. em equinos nas duas regiões. No município de Ilha Solteira, de 40 animais avaliados, um (01) animal (2,5%) foi reagente à técnica sorológica de RIFI, 100% (40/40) foram positivos à PCR de sangue e 90% (36/40) foram positivos à PCR a partir de amostras de suabe conjuntival. No município de Bragança Paulista, foram avaliados 14 equinos, com 100% não reagentes à técnica sorológica de RIFI e negativos à PCR de suabe, porém à PCR de sangue 100% dos animais foram positivos, utilizando-se os *primers* 13A e 13B (119). Dando continuidade ao estudo dos mesmos animais, Benassi (120) avaliou as amostras dos equinos a partir de técnica de real time-PCR e posterior seqüenciamento, com identificação de *Leishmania infantum*. Feitosa et al. (121)

avaliaram equinos procedentes de Araçatuba-SP, pela técnica de ELISA, encontrando positividade em 14,6% dos animais.

#### *1.2.5. Diagnóstico*

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses pode ser efetuado por técnicas parasitológicas, para identificação morfológica do agente; imunológicas, que objetiva identificação de anticorpos específicos contra o parasito e moleculares, amplificando fragmentos específicos do DNA. Um método seguro no diagnóstico da LV é a documentação de formas amastigotas (122), associado à epidemiologia e clínica do animal.

A pesquisa indireta é representada pela demonstração de anticorpos nos testes sorológicos. As técnicas imunológicas mais utilizadas são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A RIFI foi utilizada durante bastante tempo como prova diagnóstica confirmatória em inquéritos epidemiológicos caninos e apesar de não ser mais recomendada pelo Ministério da Saúde desde 2011, continua sendo utilizada na pesquisa. Atualmente o teste de ELISA tem sido o teste confirmatório recomendado pelo Ministério da Saúde e, como triagem, o teste rápido imunocromatográfico DPP (Dual Path Platform) com antígenos recombinantes k26 e k39 (123).

A técnica de biologia molecular de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) possui habilidade de detectar o DNA parasitário, podendo ser utilizada em ampla variedade de amostras biológicas, tanto de humanos como de espécies domésticas e silvestres e de animais de produção (119, 124, 125, 126).

Estudos tem avaliado a eficácia da PCR a partir de amostras de suabes conjuntivais, demonstrando resultados satisfatórios em amostras de cães, gatos e equinos (127, 128, 120, 129). A técnica da PCR, independente do tipo de amostra utilizada, apresenta alta sensibilidade e especificidade; no entanto, é uma técnica complexa e laboriosa, não sendo adequada para o uso a campo (40, 130). Entretanto, a combinação de técnicas sorológicas e moleculares tem auxiliado na demonstração de maior número de animais positivos para LV em diferentes áreas endêmicas (131).

A pesquisa direta tem como objetivo a visualização sob microscopia óptica das formas amastigotas em material obtido da borda da lesão por escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa. Após a realização do esfregaço ou *imprint*, as lâminas devem ser coradas por Giemsa, Leishman ou Panótico. A especificidade desse método é de 100%, mas a sensibilidade depende do grau de parasitismo, do tipo de material biológico coletado, do seu processamento e coloração, além do observador(132).

#### 1.2.5.1 Sistemas de Informação Geográfica (SIG)

O diagnóstico das doenças é de fundamental importância, a fim de tratar casos positivos e evitar a ocorrência de novos casos; porém, outras estratégias precisam ser integradas ao controle das zoonoses. Já considera-se que o planejamento e a qualidade ambiental de determinada região tenha influência direta na população, quer seja animal, vegetal ou humana, que habita tal região. O planejamento ambiental é um conjunto de procedimentos para avaliar as aptidões e restrições de um ambiente em relação a uma determinada ação, avaliando as consequências ambientais e as possíveis alternativas para minimização dos possíveis impactos (133).

Entre as ferramentas de diagnóstico e planejamento ambiental estão os Sistemas de Informação Geográfica (SIG), que podem ser empregados como ferramenta para produção de mapas e como suporte para análise espacial de fenômenos, tais como a variância e dependência espacial de variáveis de saúde pública, e como um banco de dados geográficos, com diversificados enfoques e aplicações (134).

O uso da tecnologia de SIG pode ser associada às provas diagnósticas, utilizada para verificar o papel de animais domésticos como reservatório para LV, bem como em humanos (135,136). Na área da Saúde, os SIG têm se tornado ferramenta de grande utilidade. Estudos que envolveram análise utilizando os SIG, começaram a ser conduzidos na década de 80 e, atualmente, representam uma importante ferramenta em investigações epidemiológicas (137).

Alguns estudos visando compreender a análise espacial e integrá-las a estratégias de controle da doença vêm sendo realizados em cidades do estado de São Paulo. Fonseca, no ano de 2013, utilizou o geoprocessamento para entender a distribuição de fatores de riscos associados a doença no município de Teodoro Sampaio-SP (138). Matsumoto (139), também analisou a evolução espacial e temporal dos casos de LVC no município de Presidente Prudente-SP. No município de Bauru, no ano de 2012, Souza et al., realizaram

um análise espacial dos casos de leishmaniose humana (140). Em Três Lagoas – MS, Zuque (141) verificou, com o uso do georreferenciamento para LVC e LV humana no município, subsídios para identificação de áreas com prioridade de intervenção para o controle da doença.

*Justificativa*

## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos têm sido realizados no município de Bauru a fim de verificar a ocorrência de tripanosomatídeos em animais silvestres e domésticos. Por ser uma área endêmica para protozoários do gênero *Leishmania*, trabalhos têm sido direcionados para pesquisa desse parasito, encontrando animais reagentes à provas sorológicas para *Leishmania* spp, e/ou positivos a técnicas moleculares para protozoários da família Trypanosomatidae (142, 143, 144, 145, 146).

Conceição-Silva e Alves (80) destacam no livro que organizaram sobre as leishmanioses do continente americano, que ainda hoje as leishmanioses permanecem como uma das doenças parasitárias de grande impacto para humanidade, ainda com muitas questões não respondidas e pensar sobre elas é uma necessidade. Sendo assim, considerando o município de Bauru-SP, como região endêmica para LV canina e com casos humanos, verificando-se os estudos já realizados sobre essa zoonose na cidade, encontramos pesquisas para avaliarem a ocorrência de leishmaniose em diversas espécies animais, na tentativa de conhecer os possíveis reservatórios e adotar medidas para o controle da expansão da doença; porém, a ocorrência de leishmaniose em animais de produção, procedentes de área urbana e periurbana, ainda não foi avaliada no município. Verificam-se animais de grande porte transitando em bairros periféricos do município de Bauru, os quais são utilizados como meio de transporte pelos moradores, e muitas vezes constituindo-se em meio de subsistência para os mesmos; tais animais percorrem vários bairros do município, sendo muitas vezes encontrados soltos em vias públicas.

Tendo em vista relatos da literatura da ocorrência de tripanosomatídeos, entre eles *Leishmania* e *Trypanosoma*, em eqüídeos e bovinos em diferentes regiões do mundo e a possibilidade de atração de flebotomíneos por estas espécies, propusemo-nos a verificar a participação destas espécies e o seu envolvimento no ciclo epidemiológico destas zoonoses, em particular em município de área endêmica como Bauru-SP, de forma a auxiliar nas medidas de controle da doença, e para se alertar da necessidade de vigilância e continuidade de pesquisas para se verificar o envolvimento destas espécies nestas zoonoses de fundamental importância na saúde pública.

# *Objetivos*

### 3.OBJETIVOS

#### 3.1.Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de tripanosomatídeos em animais de produção capturados em vias públicas pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Bauru-SP, bem como em animais procedentes de área periurbana do município, relacionando os casos positivos para tripanosomatídeos nestes animais com os casos de LV humanos e caninos, em diferentes bairros do município.

#### 3.2.Objetivos Específicos

1. Observar os animais do estudo, a fim de identificar sinais clínicos comuns nas tripanossomíases;
2. Pesquisar a presença de anticorpos anti-*L. infantum* e *L. braziliensis* em equídeos e bovinos pela RIFI e ELISA;
3. Avaliar a presença de formas evolutivas de tripanosomatídeos nos esfregaços sanguíneos;
4. Realizar hemocultura em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) para isolamento de tripanosomatídeos;
5. Realizar a PCR para pesquisa de DNA de tripanosomatídeos, a partir de amostra de sangue, hemocultura, ectoparasitos e secreção conjuntival de equídeos e bovinos;
6. Sequenciamento genético das amostras positivas à PCR, para identificação da espécie de tripanosomatídeo;
7. Pela análise espacial dos bairros do município de Bauru-SP, avaliar a influência do tipo de área de cobertura, presença de cães com LVC, animais de produção e presença de flebotomíneos na ocorrência de casos humanos de leishmaniose.

# *Material e métodos*

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local de Estudo

O município de Bauru está situado no interior do Estado de São Paulo, localizando-se a noroeste da capital (22°18'54"S,49°03'39"W). Ocupa uma área de 673,49km<sup>2</sup>. A cidade apresenta temperatura média anual de 26,3°C e a vegetação do município é composta de Mata Atlântica e Cerrado(Figura 1).



**Figura 1:** Localização do município de Bauru no Estado de São Paulo

**Fonte:** <https://pt.wikipedia.org/wiki/Bauru>, com adaptações.

### 4.2. Aspectos éticos

O trabalho foi realizado mediante prévia autorização do Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu-FMB- UNESP, sob o número de protocolo 1095/2014, com aprovação em 31/07/2014 (Anexo 1).

### 4.3. Espécies avaliadas

Foram avaliados 100 equídeos (*Equus spp*) e 100 bovinos (*Bos taurus*), procedentes de diferentes bairros do município de Bauru.

#### 4.3.1. Características epidemiológicas das espécies avaliadas

##### 4.3.1.1. Espécie

Todos os bovinos avaliados pertenciam à espécie *Bos taurus*. Já entre os equídeos foram avaliadas três espécies: 89 % dos animais eram equinos da espécie *Eqqus caballus*, 2% asininos (*Eqqus asinus*) e 9 % muares (*Eqqus caballus x Eqqus asinus*), como podemos verificar na Tabela 1.

**Tabela 1:** Número de animais avaliados de acordo com a espécie

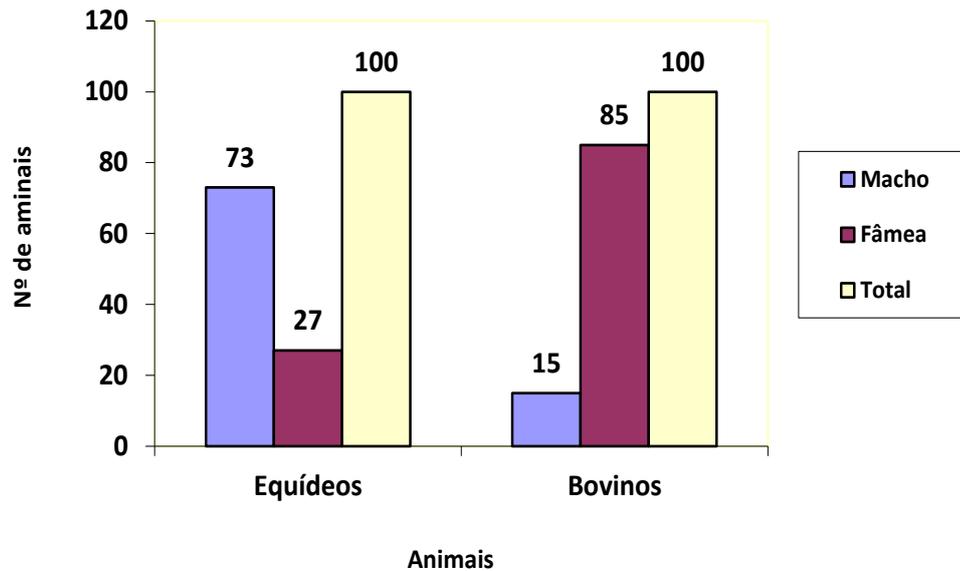
<b>Espécie</b>	<b>Quantidade</b>
<i>Bos taurus</i>	100
<i>Eqqus caballus</i>	89
<i>Eqqus asinus</i>	2
<i>Eqqus caballus x Eqqus asinus</i>	9
<b>Total</b>	<b>200</b>

##### 4.3.2. Sexo

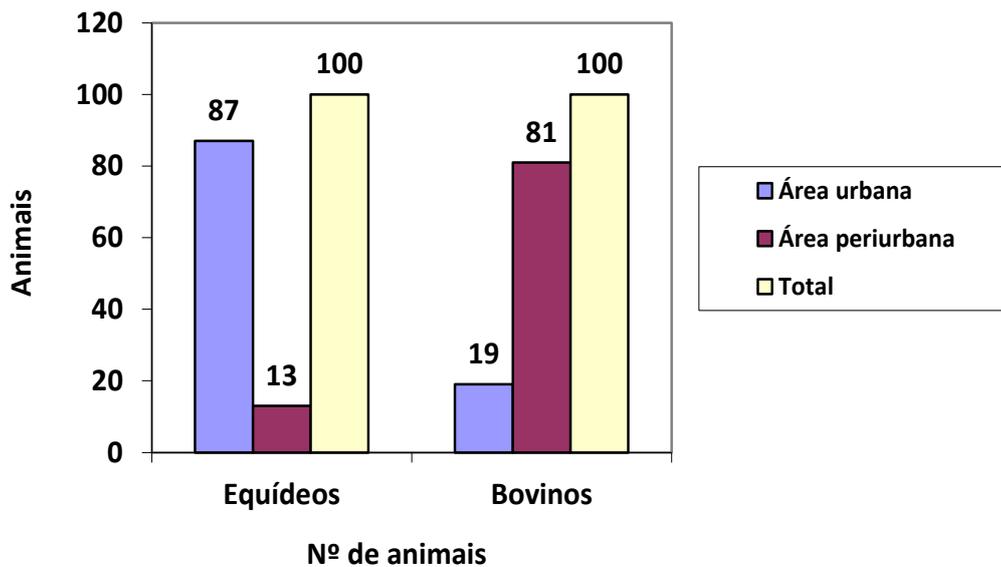
Dos 100 equídeos avaliados no estudo os machos foram predominantes, representando 73% do total de animais avaliados. Já dos 100 bovinos, 85% dos animais eram fêmeas e 15% machos (Figura 2).

##### 4.3.3. Procedência

Os animais foram classificados em duas categorias de acordo com o local de procedência, sendo de área urbana ou periurbana, tendo-se 87% dos equídeos pertencentes à área urbana e apenas 13 % da área periurbana . Já 81 % dos bovinos foram provenientes de área periurbana e 19% de área urbana (Figura 3) .



**Figura 2:** Número de equídeos (*Equus spp.*) e bovinos (*Bos taurus*) avaliados, de acordo com o sexo.



**Figura 3:** Número de animais avaliados de procedência urbana e periurbana de equídeos (*Equus spp.*) e bovinos (*Bos taurus*) do município de Bauru-SP.

#### 4.4. Identificação dos animais e avaliação clínica

Os animais capturados pelo CCZ eram identificados por um registro, em uma ficha com seu número de identificação contendo dados relativos a local de captura e endereço de procedência. Aspectos clínicos do animal, como higidez (grau de hidratação) e condição corpórea, bem como a presença de lesões na pele e ectoparasitos (pulgas e carrapatos) foram

verificados. Tais procedimentos foram realizados da mesma forma, para os animais que se encontravam em áreas periféricas do município, tendo seu local de origem devidamente anotado, para avaliação posterior pelo georreferenciamento.

#### **4.5. Coleta de amostras biológicas**

Para realização das provas diagnósticas parasitológicas, sorológicas e moleculares foram realizadas colheitas de sangue, ectoparasitos e secreção conjuntival, conforme ilustrado na Figura 4.

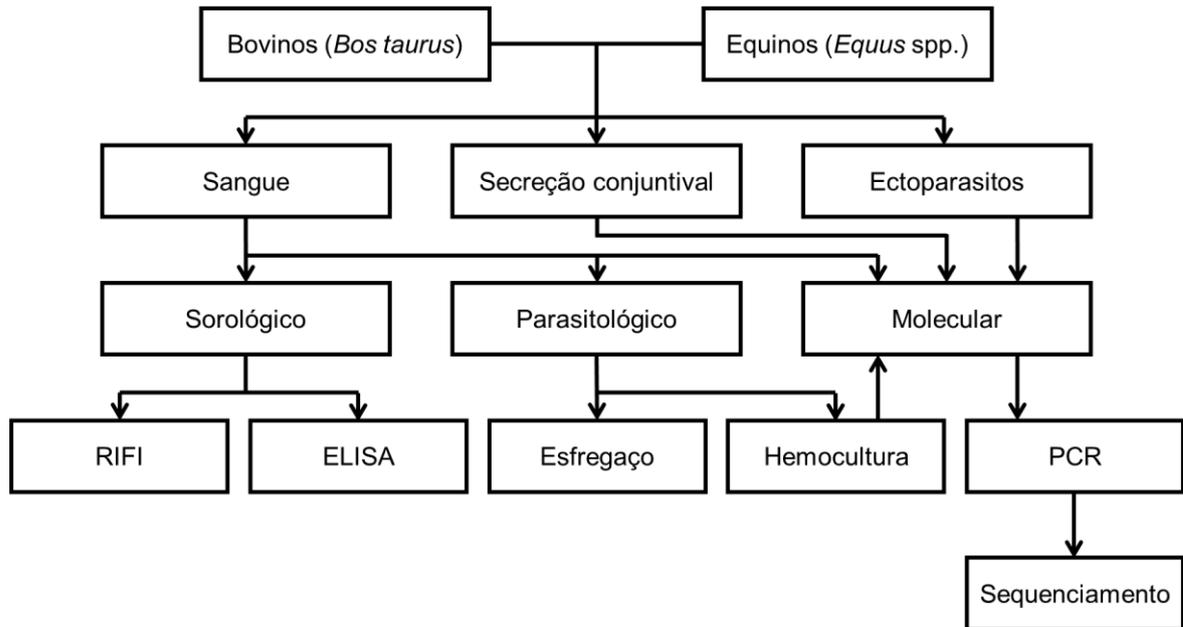
##### *4.5.1 Sangue*

A coleta de sangue nos equídeos foi realizada a partir da veia jugular externa e nos bovinos na veia caudal. Uma alíquota desse material foi acondicionada em tubos vacutainer contendo EDTA, para a realização de hemocultura e da técnica da PCR para tripanosomatídeos. Outra alíquota da amostra foi armazenada em tubo seco, para obtenção do soro e realização das técnicas sorológicas de RIFI e ELISA.

Tão logo o sangue era coletado, foram realizados esfregaços sanguíneos em lâminas e identificadas com o número do animal. No laboratório, as lâminas eram fixadas em metanol 5 minutos e coradas com Giemsa por 30 minutos. Após esse período, eram lavadas em água corrente. As lâminas eram visualizadas em microscopia óptica no aumento de 1000X para pesquisa de formas amastigotas.

##### *4.5.2 Ectoparasitos*

Durante o exame clínico, avaliou-se a presença de ectoparasitos e, quando presentes, os mesmos foram coletados com o auxílio de pinça anatômica, acondicionados em microtubos contendo Solução Salina Tamponada (PBS) estéril (pH 7,2) e identificados de acordo com o número do animal. Tais ectoparasitos foram macerados em cadinho de porcelana e, a partir do macerado, foi realizada a extração de DNA e acondicionados em microtubos livres de DNase e RNase em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior exame de PCR para tripanosomatídeos. A partir do macerado também realizou-se um esfregaço e tais lâminas foram coradas em Giemsa para possível observação de formas flagelares.



**Figura 4:** Delineamento experimental do estudo.

#### 4.5.3. Secreção conjuntival

Com auxílio de suabes estéreis foram coletados material de secreção ocular da conjuntiva inferior dos animais, os quais foram imediatamente acondicionados em microtubos livres de DNases e RNases, armazenados em geladeira a 4°C até o momento do uso, para extração do DNA e realização da PCR para tripanosomatídeos.

### 4.6. Provas Diagnósticas

#### 4.6.1. Hemocultura

Em capela de fluxo laminar, a partir de cada amostra de sangue, foram separados três tubos rosqueados contendo, em cada um, 5mL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) estéril, sendo que em cada um dos tubos foram inoculados plasma, camada leucocitária e sedimento de hemácias. Todas as culturas foram mantidas em estufa a 28-30°C. Após 15 dias da inoculação iniciou-se a primeira leitura, retirando-se de cada tubo, uma alíquota de cinco microlitros, entre lâmina e lamínula. A observação foi realizada em microscopia óptica no aumento de 400X. Alíquotas foram observadas quinzenalmente, durante quatro meses, sendo uma alíquota retirada para diagnóstico molecular pela técnica de Reação em Cadeia da

Polimerase(PCR) para tripanosomatídeos, segundo LUZ et al.(147), com algumas modificações.

#### 4.6.2.Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para tripanosomatídeos

##### 4.6.2.1.Preparo das amostras para extração de DNA

- Sangue e Hemocultura

Para a extração de DNA foram utilizados Kit comercial Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®), conforme recomendações do fabricante.

Todas as porções sanguíneas da hemocultura (camada leucocitária, plasma e sedimento de hemácias) foram adicionadas em um único tubo, centrifugadas e realizado várias lavagens com PBS pH 7,2, a fim de concentrar os parasitos (148). Após este procedimento, realizou-se a extração do DNA de cada amostra.

- Ectoparasitos

A extração do DNA dos ectoparasitos foi realizada utilizando-se o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®), conforme recomendações do fabricante.

- Suabe Conjuntival

Para a extração do DNA a partir de amostras de suabe conjuntival foi utilizado o método de *salting out* descrito por Lahiri Nurnberger(149), com modificações realizadas por Benvença (119).

- Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) de sangue, ectoparasitos, suabes e cultura em meio LIT

As reações de PCR-MIX foram realizadas com o reagente Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) e as concentrações de amplificação foram as seguintes: 5 µL de tampão de PCR (50 mmol KCl, 10 mmol de Tris-HCl, pH 8,0), 1,5U de *Taq*-polimerase (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 10 µM de cada oligonucleotídeo, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DNTPs, 10 ng da amostra testada e 17,5 µL de água ultra pura (MIX-PCR), em cada tubo de reação de 0,2 mL. As amplificações foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 9600), com perfil de ciclagem variando de acordo com os *primers* utilizados, como demonstrado no quadro abaixo.

**Quadro 1:** Relação de *primers* e perfis de ciclagem utilizados no estudo.

<i>Primers</i>	Região	Perfil de Ciclagem
<b>LITSR/L5.8S</b> 5'- CTGGATCATTTTCCGATG - 3' 5' - TGATACCACTTATCGCACTT – 3'	ITS1 (150)	95°C --- 2 minutos 95°C --- 20 segundos 55°C-----30 segundos 72°C-----1 minuto 72°C-----6 minutos <span style="float: right;">} 35x</span>
<b>LITSV/L5.8SR</b> 5' -AAGTGCG-ATAAGTGGTA-3' 5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3'	ITS2 (150)	95°C --- 2 minutos 95°C --- 20 segundos 55°C-----30 segundos 72°C-----1 minuto 72°C-----6 minutos <span style="float: right;">} 30x</span>
<b>HSP70F/HSP70R</b> 5'AGGTGAAGGCGACGAACG3' 5'CGCTTGTCATCTTTGCGTC3'	Gene HSP70 (151)	94°C --- 4 minutos 94°C --- 30 segundos 59°C-----30 segundos 72°C-----30segundos 72°C-----6 minutos <span style="float: right;">} 40x</span>

#### 4.6.2.2. Controles

Como controles positivos foram utilizados DNA de cepas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/IOC/2906) e *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/IOC/0566), mantidas sob cultivo em meio NNN-LIT. Como controle negativo foi utilizada água ultra pura.

#### 4.6.2.3. Eletroforese em gel de agarose

A identificação dos produtos amplificados foi pela eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, corado com SyberSafe® (Invitrogen®) a 10%, e submetido a corrida eletroforética em cuba horizontal HE99(AmershanBiosciences®) contendo TBE1X (0,1M Tris,0,09m de ácido bórico e 0,001M de EDTA) e a voltagemde 80V por 90 minutos,utilizando-se a fonte Electrophoresis Power Supply Mode IEPS301(GE-Healthcare®). Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o DNA Ladder, 100pb (Invitrogen®) e o tamanho dos fragmentos amplificados, foram verificados a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com DNA de cepas padrão utilizadas como controles positivos.

#### 4.6.2.4. Sequenciamento

As amostras de PCR foram purificadas com Agencourt AMPure XP® (Beckman Coulter, Inc.). A quantificação dos produtos purificados foi realizada utilizando um Nanodrop (ThermoFisher Scientific®). A reação de seqüenciamento foi realizada pelo programa BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio. O sequenciamento automático foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

As seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW pelo software MEGA( Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 7.0 para Windows® (152), submetidas ao BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados.

#### 4.7. Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA))

O teste ELISA foi realizado segundo Szargiki (153), com adaptações. Para determinação da diluição ótima do soro, antígeno e conjugado foram realizados testes com diferentes concentrações para padronização da técnica. A partir das densidades ópticas (D.O) obtidas nas diferentes concentrações foram feitos cálculos com as médias dos controles positivos e negativos, sendo a concentração escolhida a que apresentou maior diferença entre os controles (154). Desta forma, para eqüídeos as diluições adequadas foram: antígeno 2,5 µg, soro 1:25 e conjugado 1:500 (proteína A), e para bovinos foram utilizados as seguintes concentrações: antígeno 2,5 µg, soro 1:25 e conjugado 1:10000(IgG anti-bovino). Os resultados da padronização estão descritos nos Apêndices 1 e 2. O ponto de corte estabelecido foi de duas vezes e meia o valor das densidades ópticas dos controles negativos (155). Para determinação dos controles positivos das duas espécies foram testados animais do próprio estudo reagentes à RIFI, e aqueles que apresentaram D.O significativa foram então determinados como controles. Já os controles negativos foram soros de animais procedentes de área não endêmica.

As placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µl de antígeno bruto de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* diluídos em solução tampão (*coating buffer*) pH 9,6, na concentração definida na padronização, e incubadas overnight a 4°C. Após esse período foram realizadas três lavagens com PBS-Tween e as placas foram bloqueadas com

200µl de solução salina tamponada acrescida de 2% albumina bovina (BSA) e incubadas a 37°C por uma hora.

Após as lavagens adicionou-se 100 µl do soro do animal, diluídos em tampão de incubação a 37°C por 1 hora e uma nova série de lavagens.

Em seguida, 100µL do conjugado (anti-IgGbovine e proteína A para equídeos), ligado à peroxidase na diluição pré determinada diluídos em tampão de incubação, foi adicionado a cada cavidade da placa, seguindo-se de uma nova incubação em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Após as lavagens, foram adicionados 100µL da solução de ortofenilenediamina (OPD) diluído em tampão citrato com peróxido de hidrogênio em cada cavidade da placa, com posterior incubação da placa por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço, 50µL de ácido sulfúrico 2% e a densidade óptica (D.O) foi determinada em leitor ELISA (Universal Microplate Reader – EL 800 – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC), utilizando-se filtro de 490nm.

#### **4.8.Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

Formas promastigotas de *L.infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV–IOC2906) e de *L.braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903 -IOC/0566) são mantidas em estufa B.O.D. a 25°C, em tubos contendo: meio sólido NNN (Novy, McNeal, Nicolle) acrescido de meio LIT. Para o preparo das lâminas, as mesmas foram sensibilizadas utilizando-se 10 µL da suspensão de promastigotas. A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (156), com a utilização do conjugado espécie-específico (anti-equino e anti-bovino IgG FITC, Sigma®, USA), diluído a 1:150 para bovinos e a 1:450 para equídeos em solução de Azul de Evans a 20%. Depois da leitura dos controles, foi procedida a leitura das amostras dos soros dos animais do estudo, considerando-se reagentes as amostras com titulação igual ou maior a 40.

Como controle positivo dos equídeos foi utilizado soro de equino proveniente de área endêmica, sabidamente positivo para leishmaniose visceral; como controle negativo utilizou-se soro de equinos provenientes de região não endêmica para doença. Como controle positivo para os bovinos utilizou-se os soros de animais reagentes à RIFI; animais de área não endêmica foram utilizados como controle negativo.

#### 4.9. Análise espacial

Para realização da análise espacial utilizou-se informações dos bairros com casos positivos para cães, humanos, equídeos e bovinos. O mapa da paisagem pela classificação supervisionada foi gerado pelo classificador de máxima verossimilhança com extração de 20 amostras por classe de uso e cobertura de terra no ArcGis 10.2 (Environmental Systems Research Instituto - ESRI, 2012- ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute). Três classes de uso e cobertura foram definidos para a classificação supervisionada com base nas características reprodutivas dos flebotomídeos e contexto do ciclo urbano da doença, sendo elas: a) campo úmido e campo seco, b) floresta/eucalipto e c) área urbana. Para o processamento das imagens foi utilizado quatro imagens de satélite RapidEye (2228722; 2228723; 2228822; 2228823, todas de julho de 2014) adquiridas junto ao Geocatálogo do Ministério do Meio Ambiente (MMA).

A área de mapeamento foi definida estabelecendo um buffer circular de 3 km a partir dos limites dos bairros da cidade de Bauru, fornecido pela Secretaria de Planejamento (SEPLAN). Posteriormente, realizou-se a análise de coeficiente de regressão, padronizado com o auxílio do programa R, utilizando a função *standart regression coefficient (src)* do pacote *sensivity*, no qual avaliou-se a importância de cada fator (ocorrência da doença em cães, equídeos, bovinos e presença de flebotomíneos) para explicar a incidência de casos positivos humanos em cada ano (2013, 2014 e 2015) e também, a incidência de casos totais positivos em humanos nos três anos avaliados. Os valores dos coeficientes de regressão padronizados variam entre -1 e 1, sendo que valores positivos próximos a 1 indicam alto efeito positivo e valores próximos a -1 indicam alto efeito negativo na ocorrência da doença em humanos; para valores nulos, indicam a ausência de relação entre eles.

Os dados de casos da doença em cães foram fornecidos pelo CCZ do município, os casos em humanos pela Secretaria Municipal de Saúde e os casos positivos de bovinos e equídeos foram estabelecidos de acordo com os resultados das provas diagnósticas do presente estudo.

Foi realizada também uma análise apenas para o vetor, sendo que, a partir de dados sobre a quantidade de flebotomíneos capturados no ano de 2014 em alguns bairros do município de Bauru, fornecidos pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN),

realizou-se uma regressão linear (função lm) no R, para verificar se existe relação entre a quantidade de flebotomíneos em função da cobertura florestal.

### **5. Análise Estatística**

Foi realizada uma análise descritiva dos resultados a partir da construção de um banco de dados no Microsoft Office Excel® 2007, sendo depositados todos os resultados das provas diagnósticas, assim como características epidemiológicas dos animais do estudo e uma análise analítica calculando o coeficiente de concordância Kappa e seus respectivos intervalos com 95% de confiança.

*Resultados e  
Discussão*

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Análise Epidemiológica

Os animais capturados em área urbana procediam de regiões periféricas do município, com condições precárias de higiene e acúmulo de matéria orgânica, propiciando à ocorrência de várias doenças e ambiente favorável para a proliferação de mosquitos. Os animais das áreas periurbanas, eram de locais muito próximos à cidade e que compartilhavam o mesmo ambiente com outros animais (Figura 5), considerados também fonte de alimentação para os vetores (157; 99).

Oliveira e colaboradores (158), avaliando fatores de risco para ocorrência da leishmaniose destacaram a presença de várias espécies animais com o aumento dos casos, fato que pode ser explicado por esses animais atuarem como reservatórios e/ou fonte de alimentação para os vetores.



**Figura 2:** A- Área periurbana do município de Bauru, sendo possível visualizar a proximidade com a área urbana. B, C e D- Presença de diferentes espécies animais junto aos bovinos e eqüídeos da pesquisa. **Fonte:** Arquivo pessoal

### 6.1.1. Avaliação de Sinais Clínicos

Alguns dos animais apresentavam-se comprometidos a nível nutricional (Figura 6), sendo o emagrecimento o único sinal clínico visível compatível com a tripanossomíase observado nesses animais (29). Porém, em humanos e em outras espécies animais, também é comum a ocorrência da infecção por *Trypanosoma* spp. e o indivíduo permanecer assintomático por um período de tempo. O aparecimento dos sintomas estão relacionados à espécie do parasito, estado nutricional do hospedeiro/reservatório e relação do parasito com seu hospedeiro (40, 159). A tripanotolerância, ou seja, a resistência de animais de produção aos tripanosomatídeos, principalmente em bovinos, os quais, mesmo infectados, conseguem controlar a proliferação do parasito e limitar os efeitos patológicos da enfermidade deve ser considerada (160). Entretanto, a tripanotolerância ocorre em animais que ainda apresentem uma resposta imunológica ativa.



**Figura 3:** Bezerros holandês e girolando de área periurbana comprometidos nutricionalmente, com baixo peso, um dos sintomas das tripanossomíases, observado no estudo.

**Fonte:** Arquivo pessoal

## 6.2. Diagnósticos Parasitológicos

### 6.2.1. Esfregaços sanguíneos

Nas leituras dos esfregaços sanguíneos de todos os animais, porém não foram observadas formas evolutivas de tripanosomatídeos. Para bovinos não foram encontrados trabalhos que relatem esse método diagnóstico. Já em equídeos, Cerqueira et al. (161) realizaram a infecção experimental de *Equus asinus* com *Leishmania* spp. e, depois de algum tempo, investigaram a presença de forma amastigotas em esfregaço sanguíneo, porém como

observado em nosso estudo não foi possível a visualização de formas amastigotas no material.

O diagnóstico parasitológico apresenta 100% de sensibilidade, porém o grau de parasitismo, fase de infecção e tipo de amostra devem ser levados em consideração, pois a especificidade pode variar e levar a resultados falso-negativos. (62, 29). Em cães o exame parasitológico é feito a partir de amostras dos órgãos de eleição, como fígado, baço e linfonodos, os quais podem apresentar intenso parasitismo, sendo possível visualizar com facilidade formas amastigotas do parasito (162).

Apesar do diagnóstico parasitológico ser considerado padrão ouro para outras espécies animais, como cães e gatos, em se tratando de animais de grande porte, torna-se inviável, sendo portanto realizado o exame parasitológico a partir de sangue; entretanto, acredita-se que estes animais podem apresentar uma carga parasitária escassa na circulação periférica (161).

#### 6.2.2. *Hemocultura*

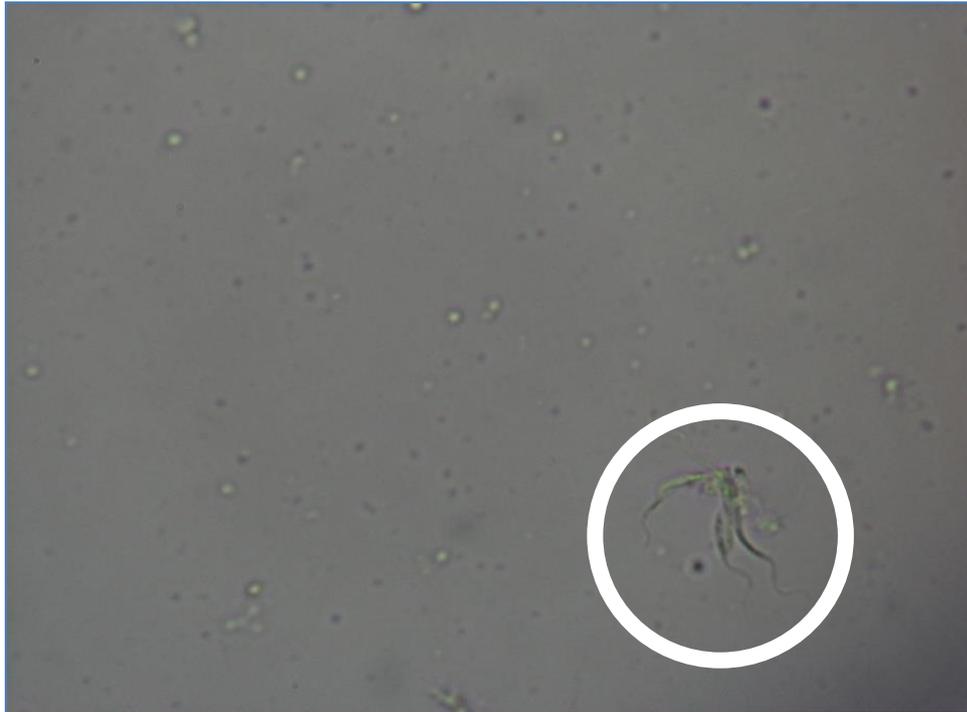
Dos 200 animais avaliados, sete bovinos apresentaram formas flagelares, sendo que, em apenas um animal, a visualização foi a partir da camada leucocitária e os demais na porção sanguínea. As culturas em que foram observadas formas flagelares foram repicadas em meio NNN-LIT para manutenção dos parasitos e para a realização das demais provas diagnósticas (Figuras 7 e 8). Dessas culturas, apenas uma foi de um bovino capturado pelo CCZ e as demais foram de animais de área periurbana. Foi separado uma alíquota da cultura para extração de DNA.

Apenas a hemocultura de um bovino apresentou crescimento intenso de parasitos em meio NNN-LIT, sendo que, desta cultura, foram realizados repiques quinzenais; nas demais culturas o desenvolvimento foi menor e por um curto período. Essa diferença de crescimento pode ser explicada pelo fato de possivelmente tratar-se de espécies diferentes de protozoários, que apresentam diferentes padrões de adaptação para crescimento em meio de cultura.

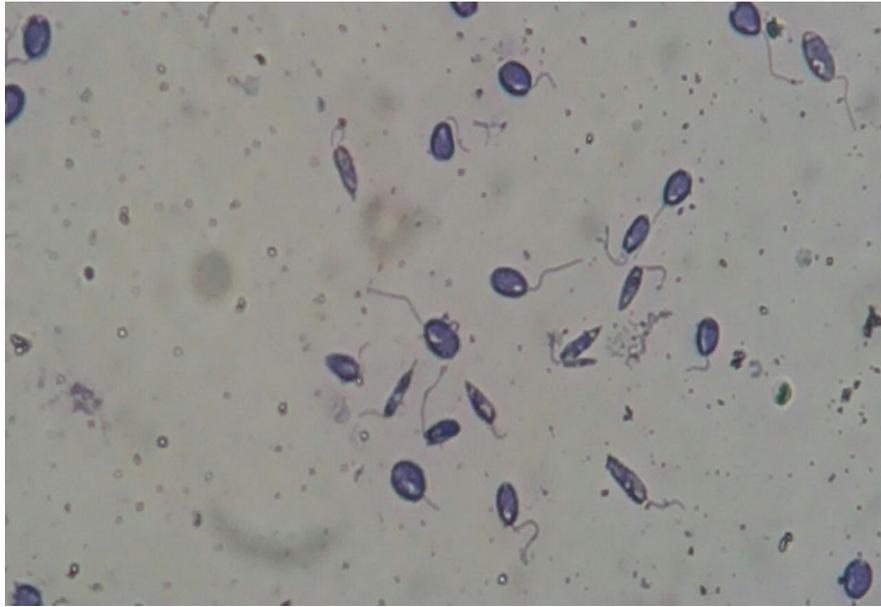
A técnica de hemocultura não é de predileção dos pesquisadores, pois apresenta algumas limitações como a possível contaminação por bactérias e fungos, além do tempo dispendioso para obtenção de resultados (163, 164). Porém, em humanos, um dos critérios

clínico/ laboratorial para confirmação de caso positivo da doença é a visualização do parasito em cultura (162).

Apesar de visualizarmos protozoários flagelados nas culturas em nosso estudo e sabendo tratarem-se de animais provenientes de área endêmica para a ocorrência de leishmaniose visceral, buscamos associar a hemocultura à técnicas moleculares que permitissem caracterizar a espécie do parasito observado, visto que, em animais das espécies avaliadas pode também haver o crescimento de outras espécies de parasitos (30,34, 35).



**Figura 4:** Hemocultura positiva de bovino em meio LIT ( Liver Infusion Tryptose). Visualização de protozoários flagelados. Microscopia óptica, aumento 1000X. **Fonte:** Arquivo pessoal



**Figura 5:** Lâmina de hemocultura positiva de bovino com formas flagelares de protozoários corada com Giemsa. Microscopia óptica, aumento 1000X. **Fonte:** Arquivo pessoal

Pôde-se constatar o êxito no isolamento de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* em bovinos e eqüídeos em nosso estudo, porém o contato de animais com o parasito deve ser considerado mesmo naqueles com culturas negativas, visto que, para o animal ser positivo em hemocultura, o contato com o patógeno deve ter sido recente ao momento da coleta, caracterizando uma fase aguda da infecção e, portanto, com o parasito presente no sangue.

### 6.3. Diagnósticos Sorológicos

Apesar de comum a ocorrência de diferentes tripanosomatídeos em animais de produção, para as provas sorológicas realizadas no presente estudo optou-se pela utilização de antígenos de protozoários de *Leishmania* spp, visto que os animais são procedentes de região endêmica para LV canina e com casos de humanos de LTA e LV.

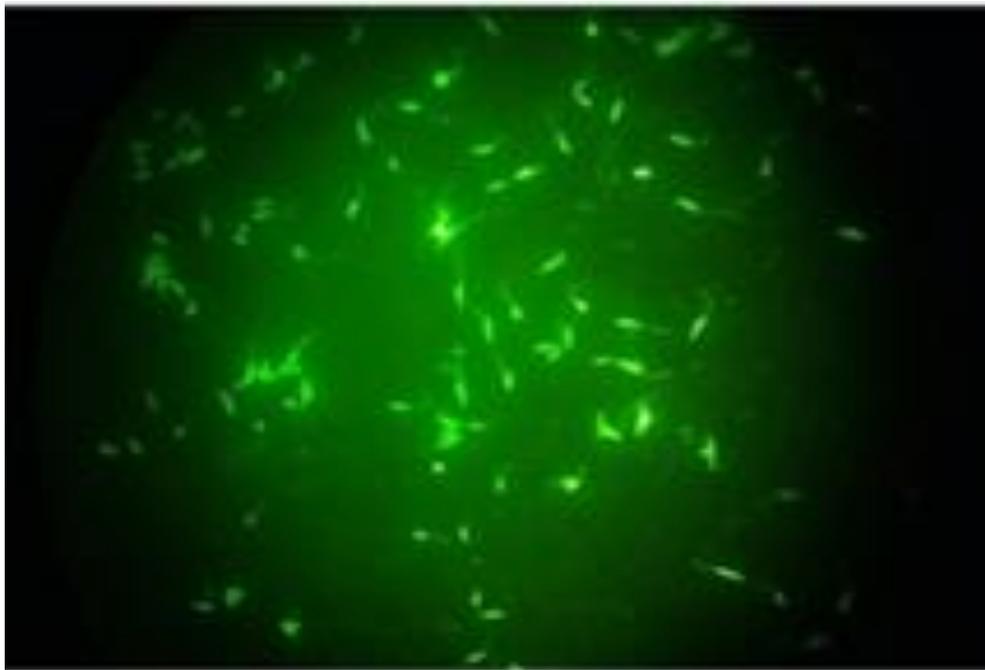
#### 6.3.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A interpretação dos testes sorológicos na prova de RIFI deve ser criteriosa, visto que, como observado em outras espécies de animais e em humanos, pode haver a ocorrência de reações cruzadas entre espécies de leishmanias e outras espécies da família *Trypanosomatidae* (50,143, 165). Nas duas espécies de animais avaliadas, a concordância entre os dois antígenos utilizados foi fraca, utilizando antígeno de *Leishmania infantum* e

*Leishmania braziliensis*. A fraca concordância da técnica pode estar relacionada a natureza dos antígenos, pois a sensibilidade e especificidade da RIFI pode variar de acordo com a espécie de antígeno utilizada (40, 166)

#### 6.3.1.1. Bovinos

Dos 100 bovinos (*Bos taurus*) avaliados pela RIFI para *Leishmania infantum* 25% (25/100) foram reagentes e para *Leishmania braziliensis* não houve animais reagentes a partir dessa técnica (Figura 9). Dos animais reagentes para *L.infantum* 12% (12/100) apresentaram título 40, 10% (10/100) título 80, 3% (3/100) título 160 e para o título 320 não houve animais reagentes (Tabela 2).



**Figura 6:** Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) positiva para *Leishmania infantum* de bovino procedente do município de Bauru-SP. **Fonte:** Arquivo pessoal

A maioria dos animais reagentes apresentou títulos 40 e 80 (Apêndice 3), e sabe-se que em bovinos é comum a ocorrência de outros tripanosomatídeos (*T. vivax*, *T. evansi*, *T. congolense* e *T. theileri*) como relatado nos trabalhos de Verloo et al. (167), Eyford et al. (168), Sivajothi et al. (169) e Uzcanga et al. (170). Porém, os animais do estudo localizam-se em área endêmica para LV e o fator epidemiológico deve ser considerado.

No diagnóstico de LV em humanos, quando o título apresentado é menor que 80 há necessidade da confirmação por outras técnicas e em cães deve-se realizar a sorologia pareada em 15 a 30 dias (62, 39, 40). No entanto, em nosso estudo não houve possibilidade da repetição da sorologia, e não há casos descritos na literatura de uma avaliação por sorologia pareada para *Leishmania* spp. em animais dessa espécie, para uma comparação da resposta imunológica desses animais frente a técnica de RIFI.

#### 6.3.1.2 Equídeos

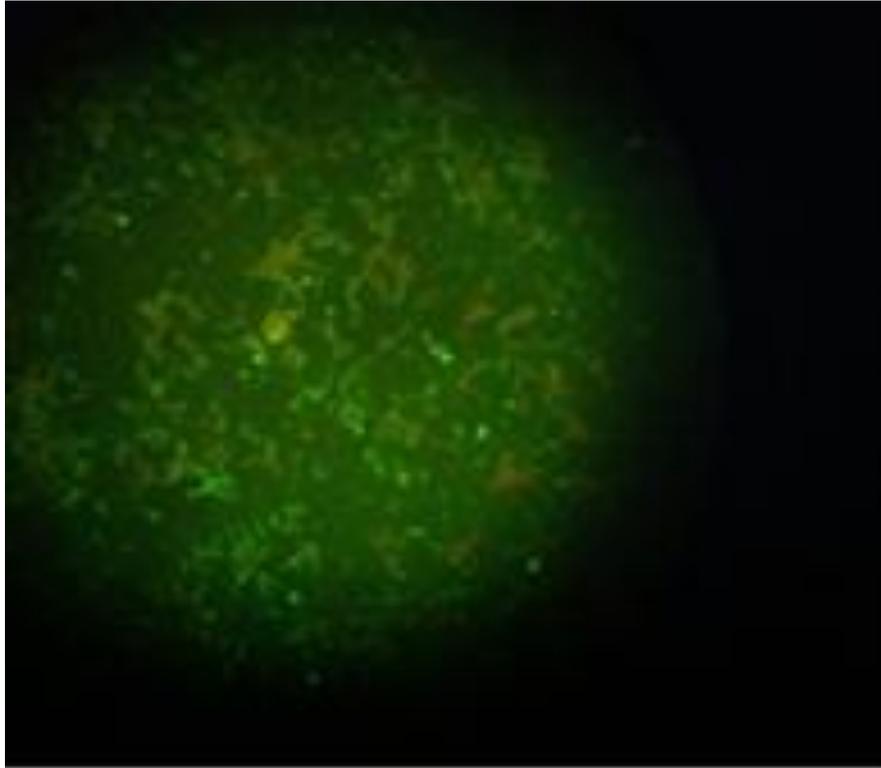
**Tabela 2:** Número de animais reagentes e títulos de anticorpos para *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* pela técnica de RIFI em bovinos de área urbana e periurbana do município de Bauru-SP.

Espécie	Títulos				Total
	40	80	160	320	
<i>Leishmania infantum</i>	12	10	3	0	25
<i>Leishmania braziliensis</i>	0	0	0	0	0

Foram avaliados 100 equídeos (*Equus* spp.) tendo-se 16% (16/100) sido reagentes para *Leishmania infantum* e 2% (2/100) para *Leishmania braziliensis* (Figura 10). Dos animais reagentes para *L. infantum*, nove (56,2%) apresentaram título 40; cinco (31,2%) título 80, dois (12,5%) título 160 e nenhum animal apresentou título 320 (Tabela 3). Para *L. braziliensis* um animal foi reagente (50%) com título 40 e um outro (50%) com título 160. Os dois animais reagentes a *L. braziliensis* foram também reagentes à *L. infantum* e um animal apresentou o mesmo título para as duas espécies de *Leishmania* (Apêndice 4).

**Tabela 3:** Número de animais reagentes e títulos de anticorpos para *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* pela técnica de RIFI em equídeos de área urbana e periurbana do município de Bauru-SP.

Espécie	Títulos				Total
	40	80	160	320	
<i>Leishmania infantum</i>	9	5	2	0	16
<i>Leishmania braziliensis</i>	1	0	1	0	2



**Figura 7:** Equídeo reagente para *Leishmania braziliensis* pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). **Fonte:** Arquivo pessoal

Analisando outros trabalhos com equinos, a titulação apresentada por essa espécie animal não foi maior que 160 (119, 171). Uma hipótese para não ocorrência do título 320 pode ser a fase da infecção, podendo-se aventar a possibilidade do período inicial da soroconversão, no momento da coleta.

Em estudo realizado por Villalobos et al., (172), em equinos procedentes de áreas rurais da região de Bauru-SP, relatam-se animais reagentes à RIFI, sugerindo a infecção por *Leishmania infantum*, porém os autores não descrevem na metodologia o antígeno utilizado para prova sorológica e como há casos de leishmaniose tegumentar na região, não se pode descartar o contato dos animais com outras espécies de leishmanias.

A ocorrência de dois animais reagentes para as duas espécies de *Leishmania* spp. avaliadas nos leva a acreditar na possibilidade de coinfeção entre as mesmas já que, um dos animais positivos para as duas espécies apresentou título 160 em ambas, indicando quantidade semelhante de anticorpos com afinidade para as duas frações antigênicas (166). A ocorrência de coinfeção para *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* em equinos já foi descrita em trabalho realizado por Soares e colaboradores (115).

#### **6.4. Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA))**

##### *6.4.1. Bovinos*

Os controles positivos para o teste de ELISA foram de animais procedentes de região endêmica para a doença e previamente testados pela mesma técnica; os controles negativos foram de animais provenientes de área livre da doença. Foram calculados o ponto de corte, os níveis de ELISA (NE) e os valores da amostra em relação ao positivo (A/P). Para *Leishmania braziliensis*, a densidade óptica (D.O) média dos bovinos negativos foi de  $0,0925 \pm 0,023$  com um ponto de corte de  $D.O. \geq 0,231$  e nível de ELISA (N.E)  $\geq 2$  e os bovinos reagentes apresentaram uma D.O média igual a  $0,308 \pm 0,1$ . Já para *Leishmania infantum* a média da densidade óptica dos bovinos não reagentes foi de  $0,033 \pm 0,007$  com um ponto de corte  $\geq 0,082$  e nível de ELISA (N.E)  $\geq 2$ ; os bovinos positivos apresentaram uma D.O. média igual a  $0,239 \pm 0,099$  (Apêndices 5 e 7).

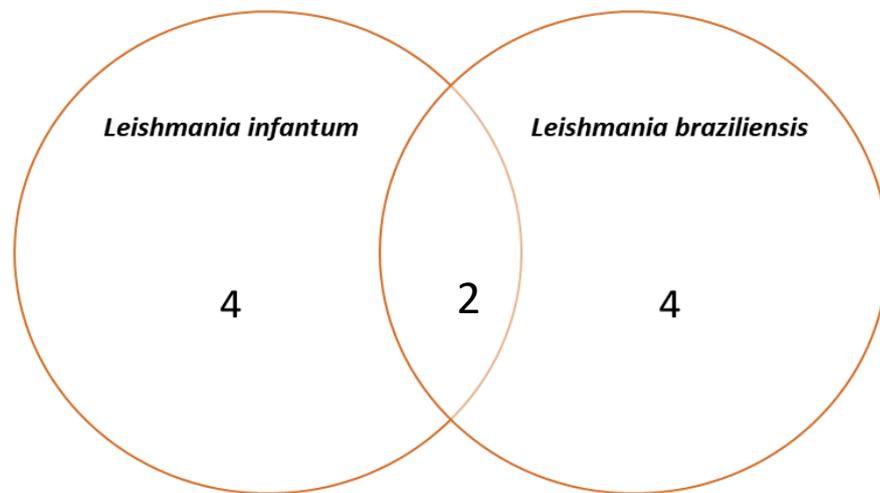
Para determinação dos resultados de todos animais, foram consideradas médias de absorbância dos controles (negativo e positivo) e valores de A/P para as amostras testadas. Foram determinados também os níveis de ELISA (NE) que podem ser visualizados nos apêndices 6 e 8.

Os bovinos apresentaram 6% de animais reagentes para *Leishmania* spp., sendo 4% (4/100) para *Leishmania infantum* e 4% (4/100) para *Leishmania braziliensis* (Tabela 4), tendo-se dois dos animais sido reagentes a ambas espécies (Figura 11).

Pela análise estatística o índice kappa apresentou um valor de 0,48, indicando uma concordância moderada para o teste de ELISA utilizando antígeno de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*.

**Tabela 4:** Resultados sorológicos de bovinos procedentes de Bauru-SP para a técnica de ELISA para *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*.

ELISA	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
Reagente	4	4
Não reagente	96	96
Total	100	100



**Figura 8:** Resposta sorológica de bovinos procedentes de Bauru-SP, para a técnica de ELISA para *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e para ambas espécies.

O presente estudo apresentou uma baixa taxa de animais sororreagentes pela técnica do ELISA, corroborando com resultados obtidos em outros estudos: Singh e colaboradores, na Índia, avaliando-se humanos e várias espécies de animais, dentre elas 161 bovinos, utilizando-se de antígeno recombinante rK39, verificaram apenas um bovino reagente (103). Akter et al., em 2012, em Bangladesh, avaliando-se pacientes suspeitos de LV e animais domésticos, dentre eles bovinos, constataram que, pelo teste de ELISA com rK39, dos 50 animais avaliados, somente dois foram reagentes (42). Já trabalho de Mukhtar et al. (173), no Sudão, verificaram 47,6% dos animais pesquisados reagentes pela técnica de ELISA. Em nosso estudo a baixa porcentagem de animais reagentes pode estar relacionada à especificidade do teste.

#### 6.4.2. Equídeos

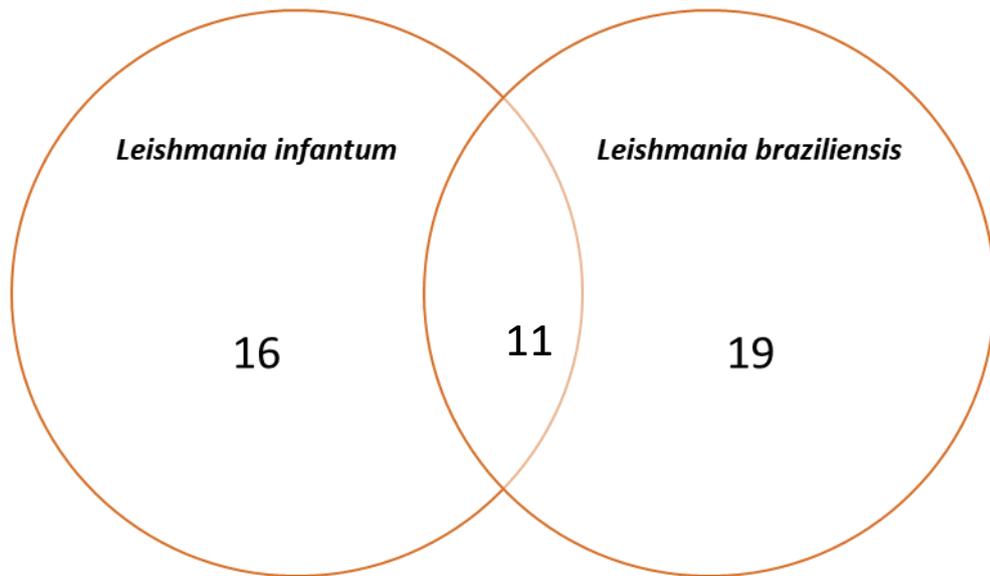
Os controles positivos foram de animais procedentes de região endêmica para a doença e testados anteriormente pelo ELISA; os controles negativos foram de animais de área livre da doença. Foram calculados o ponto de corte, os níveis de ELISA (NE) e os valores da amostra em relação ao positivo (A/P). Para *Leishmania braziliensis*, a densidade óptica (D.O) média dos equídeos não reagentes foi de  $0,149 \pm 0,026$  com um ponto de corte de  $D.O. \geq 0,372$  e nível de ELISA (N.E)  $\geq 3$  e os equídeos reagentes apresentaram uma D.O média igual a  $0,458 \pm 0,087$ . Já para *Leishmania infantum* a média da densidade óptica dos equídeos não reagentes foi de  $0,148 \pm 0,030$  com um ponto de corte  $\geq 0,370$  e nível de ELISA(N.E)  $\geq 2$ ; os equídeos reagentes apresentaram uma D.O. média igual a  $0,457 \pm 0,052$  (Apêndices 9 e 11).

Para determinação dos resultados de todos animais, foram consideradas médias de absorvância dos controles (negativo e positivo) e valores de A/P para as amostras testadas. Foram determinados também os níveis de ELISA (NE) que podem ser visualizados nos apêndices 10 e 12.

Dos 100 equídeos avaliados pela técnica de ELISA, 24 % (24/100) foram reagentes para *Leishmania* spp, sendo que 16% (16/100) foram reagentes para *Leishmania infantum* e 19% (19/100) para *Leishmania braziliensis* (Tabela 5). Analisando-se os animais que foram reagentes às duas espécies de *Leishmania* (Figura 12), a soropositividade apresentada foi de 11% (11/100). Pela análise estatística o índice kappa apresentou um valor de 0,55, indicando uma concordância moderada para o teste de ELISA utilizando antígeno de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*.

**Tabela 5:** Resultados sorológicos de equídeos procedentes de Bauru-SP para a técnica de ELISA para *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*.

ELISA	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
Reagente	16	19
Não reagente	84	81
Total	100	100



**Figura 9:** Resposta sorológica de equídeos procedentes de Bauru-SP para a técnica de ELISA para *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* e para ambas espécies.

O protocolo da técnica de ELISA como ferramenta diagnóstica para equídeos tem variado em relação ao antígeno e conjugado, sendo que, em nosso estudo, optamos por usar a proteína A como conjugado, devido aos melhores resultados na padronização da técnica. Foram feitas tentativas para padronização com IgG, porém não obtivemos sucesso. Nossos resultados corroboram com aqueles obtidos por Fernández- Bellon e colaboradores (109), os quais avaliaram a resposta imune para *Leishmania infantum* em equinos da Espanha, utilizando-se como conjugado a proteína A e IgG, tendo-se 16 animais reagentes quando foi usado a proteína A, porém nenhum animal reagente quando utilizado IgG, considerando-se a hipótese de que a resposta imune humoral para *Leishmania infantum* em equinos seja menor quando comparado à espécie canina, que apresenta uma maior reatividade quando se faz o uso da IgG.

Estudo realizado por Ferreira e colaboradores(174), em canídeos silvestres, com o objetivo de comparar diferentes conjugados usando métodos já padronizados utilizando-se da proteína A e IgG, observou-se maior capacidade de discernimento entre reagentes e não reagentes com a proteína A, pois esta pode se ligar a diferentes subclasses de IgG, o que pode aumentar a reatividade, quando comparada à IgG. Porém, não se descarta o uso de conjugados IgG para animais dessas espécies, considerando-se que em outros estudos a IgG foi utilizada como conjugado para a técnica, tendo-se obtido resultados satisfatórios(93,120,175);

portanto há necessidade de uma padronização para a técnica de ELISA a ser realizada em equídeos.

## 6.5. Diagnóstico Molecular

### 6.5.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do sangue , culturas em meio LIT , ectoparasitos e suabes conjuntivais ,foi realizada com os *primers* LITSR/ L5-8S da região ITS-1, LITSV/ L5-8S.R da região ITS-2, ambos descritos por El Tai et al. (150) eHSP70F/HSP70R, descrito por Hernandez et al. (151),os quais amplificam sequências de tripanosomatídeos, com produtos resultantes de peso molecular variável , dependendo da espécie do parasito.

A sensibilidade da PCR pode ser aumentada, quando, como alvo de detecção do parasito, utiliza-se sequências representadas em múltiplas cópias do genoma.A escolha dos *primers* que irão amplificar regiões alvos, permite adaptar a especificidade da técnica (176). Nos resultados descritos a seguir para os animais do estudo ,é possível verificar variação de positividade no tipo de amostra e ainda diferença entre os primers utilizados. Em estudo realizado por Koltas (177), avaliando-se a sensibilidade e especificidade de *primers* para diagnóstico de LT e LV em diferentes espécies, observou-se que os *primers* ITS1 e ITS2 apresentaram 100% de sensibilidade tanto no diagnóstico de LT quanto para LV e o HSP70 apresentou sensibilidade de 86,6 % e 60% para LT e LV, respectivamente. Já a especificidade do ITS1 e ITS2 variou entre 85% e 97% nas duas formas eo HSP70 apresentou uma especificidade de 100% em ambas as formas. Os resultados dos animais reagentes a diferentes *primers* podem ser visualizados nos Apêndices13 e 14.

#### 6.5.1.1. Bovinos

Os bovinos apresentaram 23% de positividade (23/100) a partir de amostras de sangue e 7% (7/100) a partir de amostras de hemoculturas. Não houve positividade a partir de amostras de suabes conjuntivais e ectoparasitos ( Tabela 6).

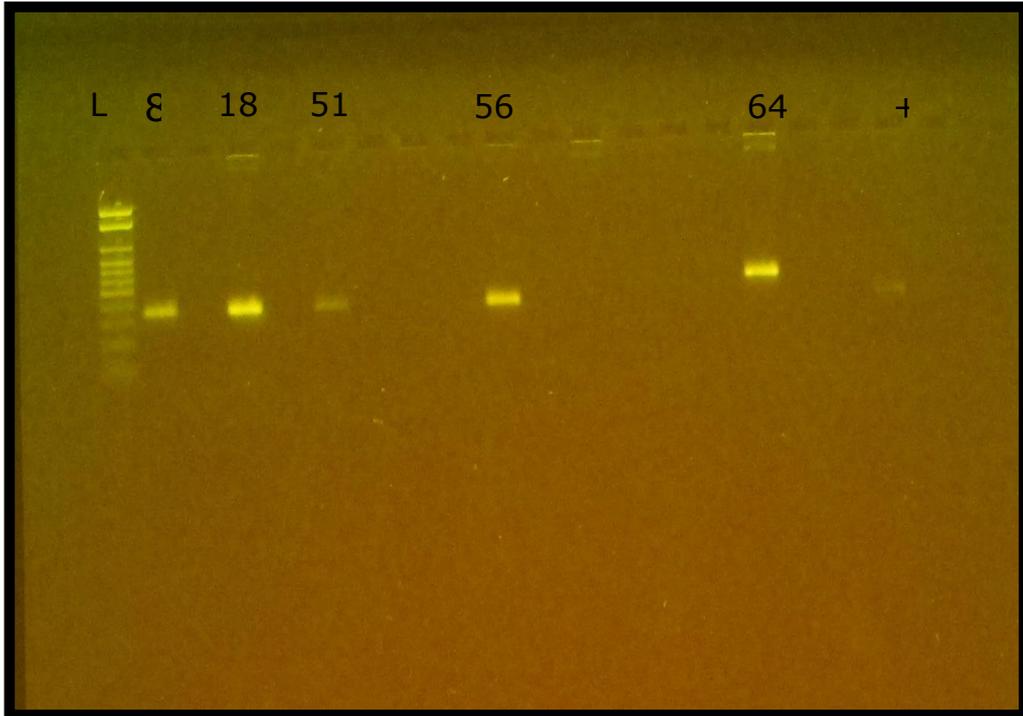
**Tabela 6:** Número de bovinos positivos e negativos à técnica de PCR para tripanosomatídeos, a partir de amostras de hemocultura, sangue, ectoparasitos e suabes.

Amostras	Bovinos	
	Positivos	Negativos
Hemocultura	7	93
Sangue	23	77
Ectoparasitos	0	100
Suabes	0	100

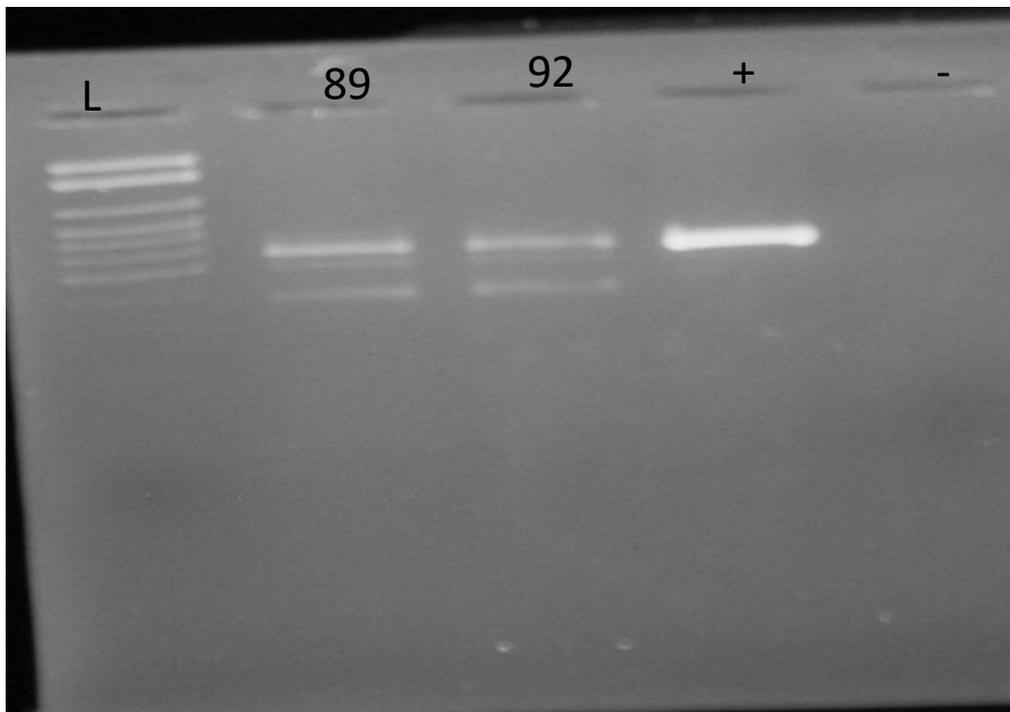
Tanto as amostras de sangue como as de hemoculturas, apresentaram diferenças nos resultados positivos obtidos, dependendo do *primer* utilizado (Tabela 7); assim, verificou-se cinco hemoculturas positivas ao *primer* ITS1 e duas hemoculturas positivas ao *primer* ITS2 (Figuras 13 e 14), bem como amostras de sangue positivas com o uso do *primer* ITS2 (Figura 15) e HSP70.

**Tabela 7:** Número de bovinos positivos à técnica de PCR com os primers LITSR/L5-8S, LITSV/L5-8S.R, HSP70F/HSP70R para tripanosomatídeos a partir de amostras de sangue, hemocultura, ectoparasitos e suabes conjuntivais.

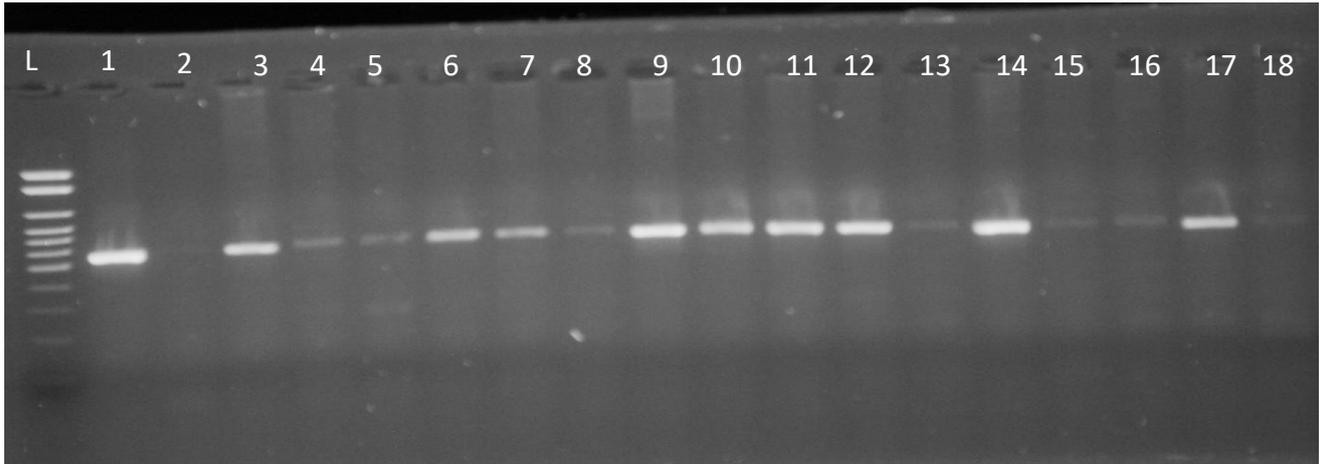
Amostras	Primer		
	ITS 1	ITS2	HSP70
Sangue	0	16	12
Hemocultura	5	2	0
Ectoparasitos	0	0	0
Suabesconjuntivais	0	0	0



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose (2%) de produtos amplificados a partir de PCR-ITS1; L – marcador de peso molecular GE Healthcare Life Sciences ®(100 pb); números 8, 18, 51, 56 e 64 animais positivos; + controle positivo (*Leishmania infantum*) e os demais controles negativos (água ultra-pura). **Fonte:** Arquivo pessoal.

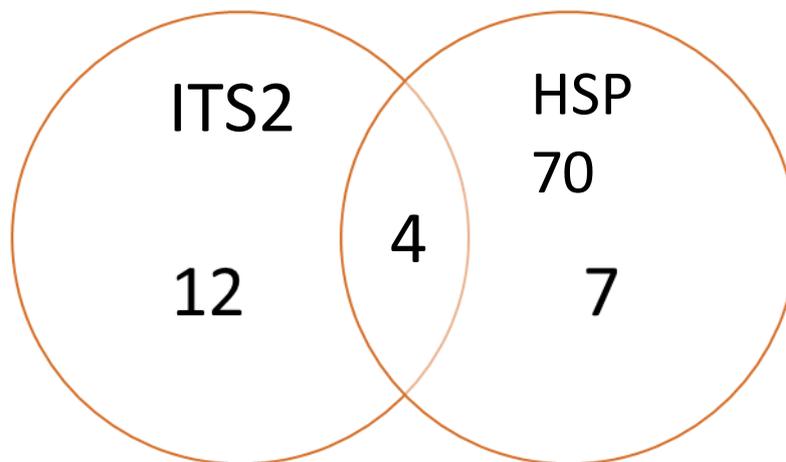


**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de produtos amplificados a partir de PCR-ITS2; L – marcador de peso molecular GE Healthcare Life Sciences ®(100 pb); números 89 e 92 animais positivos; + controle positivo (*Leishmania infantum*) – controle negativo (água ultra-pura). **Fonte:** Arquivo pessoal



**Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de produtos amplificados a partir de PCR-ITS2; L – marcador de peso molecular GE Healthcare Life Sciences ®(100 pb); 1- controle positivo (*Leishmania infantum*), 2 – controle negativo (água ultra-pura).; números 3 a 18 amostras positivas. **Fonte:** arquivo pessoal

Quando comparamos amostras de sangue positivas aos diferentes *primers* utilizados, obtivemos 12 amostras positivas para o *primer* ITS2 e sete amostras positivas para o *primer* HSP70; quatro amostras foram positivas para ambos os *primers* (Figura 16).



**Figura 13:** Amostras de sangue positivas de bovinos procedentes de Bauru-SP a partir do primer ITS2; HSP70 e para ambos os *primers*

Em relação às hemoculturas positivas aos *primers* ITS1 e ITS2, duas amostras amplificaram apenas no ITS2 e cinco amplificaram em ambos os *primers*.

No ano de 2010, Bhattarai et al. realizaram um estudo no Nepal, avaliando-se a ocorrência de Leishmaniose Visceral em humanos e animais de várias espécies, dentre elas em bovinos, tendo-se verificado 5% de positividade entre esses animais a partir da PCR do sangue, resultado este que difere daqueles encontrados em nosso estudo (97). Porém, em trabalho realizado por Alam et al. (178), em Bangladesh, avaliando a ocorrência de *Leishmania* spp. em bovinos que viviam próximos a áreas residenciais, todos os animais foram negativos à PCR.

A positividade em amostras de hemocultura pode estar ligada ao fato de que a multiplicação dos parasitos seja facilitada devido ao enriquecimento de compostos nutrientes presentes no meio de cultura, tendo-se observado que a cultura do animal que apresentou intenso crescimento, o produto da PCR foi de excelente visualização; entretanto, em algumas culturas em que o crescimento do protozoário não foi bem sucedido em NNN-LIT foi possível a visualização de uma banda mais fraca e em duas amostras nem ocorreu a amplificação com o uso do *primer* ITS1.

#### 6.5.1.2. Equídeos

Para os equídeos houve amplificação em seis amostras de sangue (Tabela 8), com o uso dos *primers* ITS2 e HSP70 (Tabela 9). Não houve positividade a partir de amostras de hemocultura, suabe conjuntival e ectoparasitos (carrapatos).

**Tabela 8:** Número de equídeos positivos e negativos à técnica de PCR para *Leishmania* spp., a partir de amostras de hemocultura, sangue, ectoparasitos e suabes conjuntivais

Amostras	Equídeos	
	Positivos	Negativos
Hemocultura	0	100
Sangue	6	94
Ectoparasitos	0	100
Suabesconjuntivais	0	100

**Tabela 9:** Número de equídeos positivos à técnica de PCR com os primers LITSR/L5-8S, LITSV/L5-8S.R, HSP70F/HSP70R para tripanosomatídeos a partir de amostras de sangue, hemocultura, ectoparasitos e suabes conjuntivais

Amostras	Primer		
	ITS 1	ITS2	HSP70
Sangue	0	4	2
Hemocultura	0	0	0
Ectoparasitos	0	0	0
Suabes conjuntivais	0	0	0

Os resultados obtidos à PCR em nosso estudo, corroboram com os resultados encontrados para a investigação da ocorrência de *Leishmania* spp. realizado por Escobar (116) no Rio Grande do Sul, tendo-se verificado equinos apresentando positividade a partir de amostras de sangue. Em seu trabalho foram utilizados quatro *primers* diferentes da região ITS (LITSV/L5.8SR, LITSV/LITSR, RV1/RV2 e LITSR/L5.8S), tendo-se LITSV/L5.8SR apresentado maior porcentagem de animais positivos, assim como em nosso estudo. Apesar de optarmos pela utilização de *primers* da região ITS, outros *primers* vem sendo utilizados no estudo de *Leishmania* spp. em equinos, revelando resultados positivos. Benvenga, avaliando-se 54 equinos, sendo 40 de área endêmica para LV e 14 de região onde não há ocorrência da doença, 100% dos animais foram positivos à PCR para *Leishmania* spp., utilizando-se dos *primers* 13A e 13B, os quais são direcionados à região kDNA do minicírculo (119). O baixo número de animais positivos à PCR em nosso estudo, pode estar relacionado à fase da infecção em que os animais se encontravam, já que, muito provavelmente, os mesmos estavam em fase crônica, não se tendo portanto os parasitos presentes na circulação.

Apesar de não obtermos amostras de suabes conjuntivais positivas nesta pesquisa, estudos afirmam a eficácia desse método diagnóstico em equinos (119, 120)

## 6.6. Sequenciamento

Os *primers* da região ITS e HSP70, podem amplificar sequências de outros tripanosomatídeos produzindo bandas de tamanho similar aos amplificados por protozoários

do gênero *Leishmania*; portanto, o sequenciamento é uma ferramenta importante na identificação e confirmação da espécie do parasito(115).

#### 6.6.1. Equídeos

Das amostras positivas à PCR, foi possível o seqüenciamento de duas amostras , ambas apresentando similaridade de 97% com *Leishmania donovani* (Tabela 10).

**Tabela 10:** Resultado do seqüenciamento de amostras de sangue de equídeos procedentes de Bauru-SP

Nº do Animal	Genbank	Nº de acesso
51	97% <i>Leishmania donovani</i>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 385300862 JQ780821.1">gi 385300862 JQ780821.1</a>
96	97% <i>Leishmania donovani</i>	

Na literatura há o relato de seqüenciamento de amostra de pele de equinos, apresentando similaridade de 98% com *Leishmania infantum* e 98% com *Leishmania siamensis* (110, 111). Porém não há relatos de *Leishmania donovani* em sangue nessa espécie animal, sendo este um resultado de extrema importância tendo em vista tratar-se de animal utilizado para tração e que se encontrava em circulação em áreas urbanas do município de Bauru-SP.

#### 6.6.2. Bovinos

A partir das sete amostras de hemocultura positivas à PCR, cinco apresentaram seqüenciamento considerado satisfatório, com similaridade em duas espécies da família *Trypanosomatidae* (Tabela 11).

**Tabela 11:** Resultados do seqüenciamento de amostras de hemocultura de bovinos procedentes de Bauru-SP

Nº do Animal	Genbank	Nº de acesso
8	97% <i>Trypanosoma theileri</i>	
18	99% <i>Trypanosoma theileri</i>	
56	98% <i>Trypanosoma theileri</i>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 480326742 JX178187.1">gi 480326742 JX178187.1</a>
89	98% <i>Trypanosoma theileri</i>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gi 148833435 EF653268.1">gi 148833435 EF653268.1</a>
64	100% <i>Leishmania infantum</i>	

O presente estudo documenta o primeiro caso descrito do sequenciamento com 100% de similaridade para *Leishmania infantum* em bovino do estado de São Paulo.

Como observado nos resultados da nossa pesquisa, quatro animais apresentaram similaridade para *Trypanosoma theileri*, a partir de amostras de hemocultura, corroborando com resultados obtidos por Rodrigues et al., (179), que avaliaram bovinos da região sudeste do Brasil e também obtiveram isolamento de *Trypanosoma theileri* em hemocultura. Apesar desta espécie de tripanosoma ser considerada não patogênica para bovinos, ocorre com frequência, e é causa de perdas econômicas para os produtores, devido à anemia e consequente fraqueza nos animais.

Das 16 amostras de sangue positivas à PCR, nove apresentaram resultados satisfatórios ao sequenciamento, retornando com alta similaridade para *Leishmania donovani* (Tabela 12).

**Tabela 12:** Resultados do sequenciamento de amostras de sangue de bovinos procedentes de Bauru-SP

Nº do Animal	Genbank	Nº de acesso
1	98% <i>Leishmania donovani</i>	
4	98% <i>Leishmania donovani</i>	
8	98% <i>Leishmania donovani</i>	
10	99% <i>Leishmania donovani</i>	
13	98% <i>Leishmania donovani</i>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/385300862 JQ780821.1">gi 385300862 JQ780821.1</a>
45	98% <i>Leishmania donovani</i>	
54	98% <i>Leishmania donovani</i>	
88	97% <i>Leishmania donovani</i>	
96	98% <i>Leishmania donovani</i>	

Verificamos que um mesmo animal apresentou sequência similar a *Trypanosoma theileri* (97%) a partir da hemocultura e, a partir de amostra de sangue, sequência similar a *Leishmania donovani* (98%), indicando uma possível coinfeção, visto que o *primer* utilizado amplifica seqüências de DNA de protozoários da família *Trypanosomatidae*.

Até o momento, não se tem registro na literatura de casos de *Leishmania donovani* em sangue de bovinos e equídeos procedentes da América do Sul, por se tratar de uma espécie

causadora de LV em outras regiões do mundo. Porém, *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* são espécies com uma grande proximidade filogenética, pois ambas pertencem ao complexo Donovanii (180), também observado em estudo realizado por Koltas et al (177), tendo-se verificado que, pela técnica de RFLP, o uso do primer ITS2 não permite discriminar as espécies de *L. infantum* e *L. donovani*, como observado em nosso estudo.

A partir desses resultados pode-se reafirmar que o seqüenciamento é uma ferramenta complementar à técnica de PCR e extremamente importante, permitindo caracterizar com maior segurança as espécies positivas em outras análises moleculares.

## 6.7 Resultados Gerais das Provas Diagnósticas

### 6.7.1. Parasitológicos

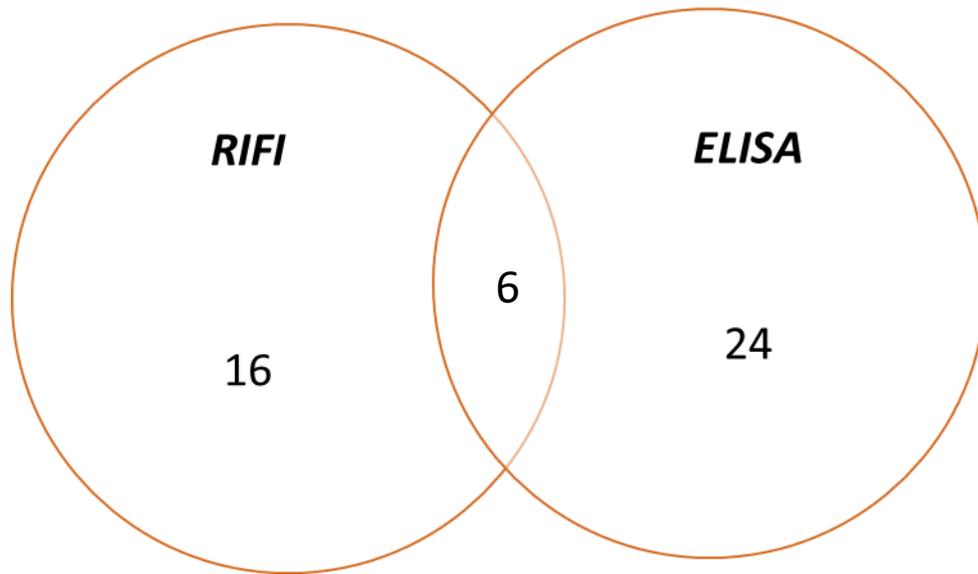
De acordo com os resultados parasitológicos obtidos em nosso estudo, não foi possível estabelecer-se uma comparação entre hemocultura e esfregaço sanguíneo, já que não obtivemos animais positivos a partir do esfregaço.

A constatação de esfregaços positivos quando se tem hemocultura positiva nem sempre ocorre, visto que a carga parasitária pode estar insuficiente no momento da coleta do sangue; já a utilização de meios de cultura favorecem a multiplicação dos parasitos, o que possibilita a sua visualização, como foi observado em nosso estudo.

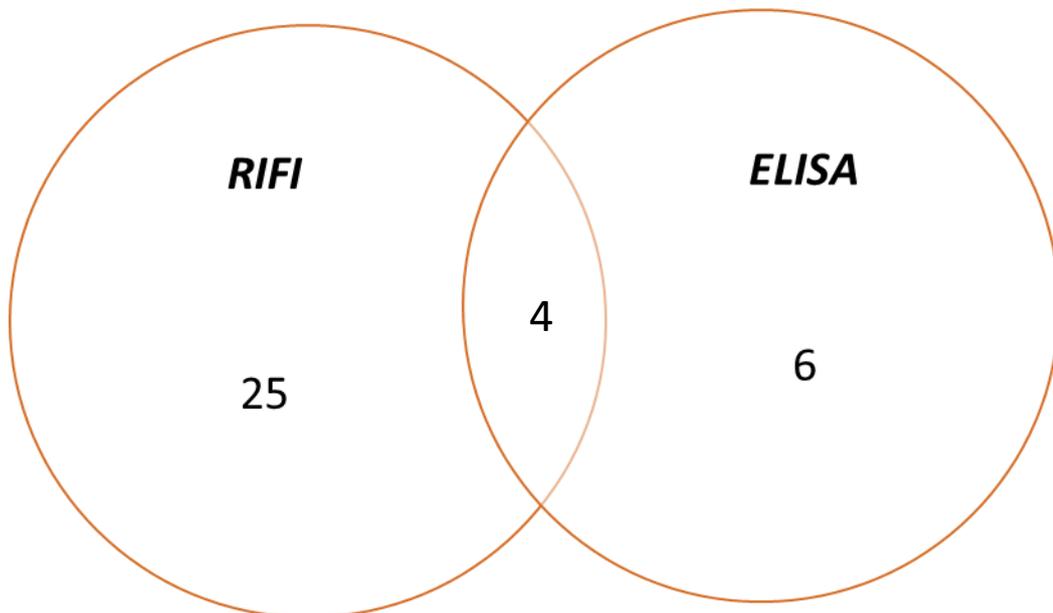
### 6.7.2. Sorológicos

Os exames sorológicos indicam que o animal apresentou contato com o parasita, podendo desenvolver a doença ou não. Em nosso estudo comparamos as técnicas de RIFI e ELISA, porém as técnicas sorológicas podem apresentar reações cruzadas. Essa complexidade apresentada na interpretação das provas sorológicas se deve à dinâmica e individualidade do sistema imune (115). A Figura 17 mostra a relação entre as duas técnicas para equídeos, tendo-se obtido prevalência de 16% à RIFI para *Leishmania* spp. e 24 % ao ELISA para *Leishmania* spp. Apenas 6% dos animais foram positivos em ambas as técnicas. Este fato pode estar relacionado à sensibilidade e especificidade dos testes. A RIFI é considerada bastante sensível, sendo assim pode ocorrer reação cruzada com outros tripanosomatídeos (143, 165, 181)

Os bovinos apresentaram reatividade de 25% à RIFI e 6% ao ELISA, sendo que 4% foram positivos em ambas as técnicas (Figura 18). Em trabalho realizado por Lobsiger et al. (106) avaliando-se estas duas técnicas, um bovino apresentou positividade para ambas, denotando o possível contato do animal com *Leishmania* spp.



**Figura 14:** Resposta sorológica dos equídeos procedentes de Bauru-SP, para as técnicas de RIFI e ELISA para *Leishmania* spp.



**Figura 15:** Resposta sorológica de bovinos procedentes de Bauru-SP, para as técnicas RIFI e ELISA para *Leishmania* spp.

A análise estatística a partir das provas sorológicas apresentou índice Kappa < 0,2 indicando fraca concordância entre os testes. As técnicas sorológicas apresentam diferença quanto a sensibilidade e especificidade; enquanto a RIFI é apresentada como uma técnica com boa sensibilidade, o ELISA apresenta além de boa sensibilidade, também uma boa especificidade (182), o que pode resultar nas diferenças de resultados quando comparamos as duas técnicas.

### *6.7.3. Avaliação Molecular*

Quando comparamos os animais reagentes às provas sorológicas, com positivos à técnica molecular, a concordância entre os testes é fraca, independente do tipo de amostra comparado. A diferença nos resultados das provas sorológicas e diagnóstico molecular, podem estar relacionada a alguns fatores, como: reações cruzadas na sorologia entre diversos tripanosomatídeos, permanência de anticorpos na corrente sanguínea mesmo após o animal ter eliminado o parasito e baixa quantidade do parasito no tecido, dificultando sua detecção à PCR (130).

Em estudo realizado por Truppel et al. (175), em equídeos do estado do Paraná, comparando as técnicas de PCR e ELISA, os autores destacam as hipóteses de que a presença do parasito no sangue com sorologia negativa pode caracterizar uma fase aguda da infecção, porém relacionada à deficiência imunitária, com baixa ou inexistente resposta sorológica; já animais sororreagentes com PCR negativa, indicam apenas que houve exposição ao parasito e os mesmos se encontram em fase crônica da infecção, portanto, sem a presença do protozoário na circulação.

### *6.7.4. Comparação entre os resultados moleculares e de sequenciamento e respectivas respostas sorológicas observadas*

Como discutido anteriormente nem sempre os resultados das provas moleculares apresentam uniformidade com as provas sorológicas, devido a diversos fatores já relatados.

Em nosso estudo, verificamos dois equinos com 97% de similaridade para *L.donovani*, porém apenas um dos animais foi reagente a RIFI com título de 40 para *L.infantum* (Tabela 13).

**Tabela 13:** Resultados das provas moleculares e sorológicas de equídeos a partir de amostras de sangue.

Nº do Animal	Sequenciamento	RIFI	RIFI	ELISA	ELISA
		<i>L.infantum</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.infantum</i>
51	97% <i>Leishmania donovani</i>	40	NR	R	R
96	97% <i>Leishmania donovani</i>	NR	NR	NR	NR

Legenda: R= reagente; NR= não reagente

Podemos verificar na Tabela 14 que o animal com 97% de similaridade com *Leishmania donovani* apresentou título 40 para *L. infantum* à RIFI, tendo-se verificado ao sequenciamento tratar-se de *Trypanosoma theileri*, o que pode ser uma reação cruzada ao teste. Verificamos também que um outro animal com 100% de similaridade com *Leishmania infantum* foi reagente ao teste de ELISA para *L. braziliensis* e *L. infantum* e não reagente à prova de RIFI, demonstrando a baixa sensibilidade do teste e a importância da combinação das duas provas sorológicas .

**Tabela 14:** Resultados das provas moleculares e sorológicas de bovinos a partir de amostra de hemocultura

Nº do Animal	Sequenciamento	RIFI	RIFI	ELISA	ELISA
		<i>L.infantum</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.infantum</i>
8	97% <i>Trypanosoma theileri</i>	40	NR	NR	NR
18	99% <i>Trypanosoma theileri</i>	NR	NR	NR	NR
56	98% <i>Trypanosoma theileri</i>	NR	NR	NR	NR
89	98% <i>Trypanosoma theileri</i>	NR	NR	NR	NR
64	100% <i>Leishmania infantum</i>	NR	NR	R	R

Legenda: R= reagente; NR= não reagente

A tabela 15 demonstra os resultados obtidos a partir de amostras de sangue nas técnicas sorológicas e moleculares. Das nove amostras de sangue de bovinos que apresentaram similaridade com *L.donovani*, três foram reagentes apenas a RIFI para *L.infantum* e uma amostra além de ser reagente a *L.infantum* com título de 80 foi reagente também ao ELISA, o que demonstra a diferença entre a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos avaliados, bem como a possibilidade de reações cruzadas com tripanosomatídeos ao teste de RIFI.

**Tabela 15:** Resultados das provas moleculares e sorológicas de bovinos a partir de amostra de sangue.

Nº do Animal	Sequenciamento	RIFI	RIFI	ELISA	ELISA
		<i>L.infantum</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.infantum</i>
1	98% <i>Leishmania donovani</i>	NR	NR	NR	NR
4	98% <i>Leishmania donovani</i>	NR	NR	NR	NR
8	98% <i>Leishmania donovani</i>	40	NR	NR	NR
10	99% <i>Leishmania donovani</i>	80	NR	NR	NR
13	98% <i>Leishmania donovani</i>	NR	NR	NR	NR
45	98% <i>Leishmania donovani</i>	40	NR	NR	NR
54	98% <i>Leishmania donovani</i>	80	NR	R	R
88	99% <i>Leishmania donovani</i>	NR	NR	NR	NR
96	98% <i>Leishmania donovani</i>	NR	NR	NR	NR

Legenda: R= reagente; NR= não reagente

### **6.8. Comparação entre todas provas diagnósticas**

A tabela 16 apresenta os resultados gerais de todas as provas diagnósticas realizadas no estudo. O valor do coeficiente kappa, quando comparou-se aos resultados de todas as provas diagnósticas, tanto para bovinos quanto para eqüídeos, apresentou valores < 0,2, indicando baixa concordância. Fato que pode se explicado, devido a nenhum animal, de todos avaliados em nosso estudo pelas diferentes provas diagnósticas, ter sido positivo a todas as técnicas. Quando observamos os resultados de todas os testes, nos deparamos com diversas situações de animais positivos e/ou negativos. Sendo assim, pudemos observar animais positivos à hemocultura e/ou PCR, caracterizando fase aguda, porém negativos às técnicas sorológicas, fato que pode ser explicado pelo tempo de soroconversão. Animais reagentes apenas às técnicas sorológicas podem indicar o contato do animal com o parasito e tempo hábil para soroconversão, fato que evidencia mais uma vez que, independente da espécie animal do estudo, as técnicas diagnósticas devem ser avaliadas em conjunto. Estudo realizado por Soares et al. (115) em equinos, atribuiu a discordância entre as técnicas diagnósticas à prováveis fases distintas de infecção e/ou doença, fato que também deve ser levado em consideração nos animais do nosso estudo.

**Tabela 16:** Apresentação geral dos resultados obtidos frente a diferentes técnicas diagnósticas para *Leishmania* spp. em bovinos (*Bos taurus*) e equídeos (*Eqqus* spp) procedentes de Bauru-SP

	<b>Espécie</b>	<b>Positivos</b>
<b>Esfregaço</b>	Bovinos	0%
	Equídeos	0%
<b>Hemocultura</b>	Bovinos	7% (7/100)
	Equídeos	0%
<b>RIFI</b>	Bovinos	25% (25/100)
	Equídeos	16% (16/100)
<b>ELISA</b>	Bovinos	6% (6/100)
	Equídeos	24% (24/100)
<b>PCR Hemocultura</b>	Bovinos	7% (7/100)
	Equídeos	0%
<b>PCR Sangue</b>	Bovinos	23% (23/100)
	Equídeos	6% (6/100)
<b>PCR Ectoparasitos</b>	Bovinos	0%
	Equídeos	0%
<b>PCR Suabes</b>	Bovinos	0%
	Equídeos	0%

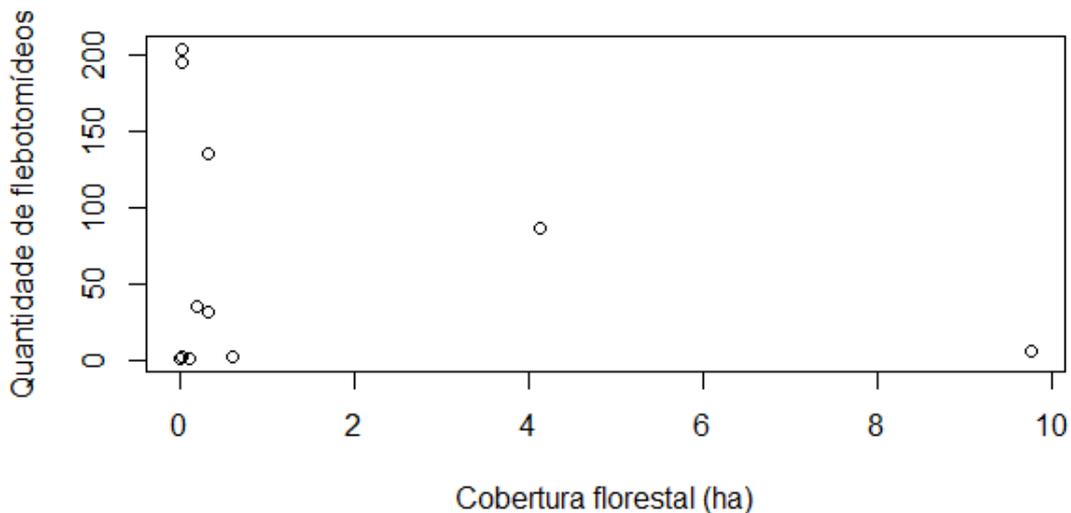
A apresentação geral dos resultados de todas as provas diagnósticas para cada animal do estudo encontra-se nos Apêndices 15 e 16.

## **6.9. Análise Espacial**

### *6.9.1. Flebotomíneos*

Os flebotomíneos são vetores que estão preferencialmente em locais ricos em matéria orgânica, com pouca luz e úmidos (62); assim, esperava-se encontrar maior quantidade em áreas com cobertura florestal dos bairros em que foram capturados os vetores, porém a partir da análise de regressão, pode-se observar que não há relação entre quantidade de flebotomíneos e áreas de cobertura florestal (Figura19). Em nosso estudo, esse resultado pode estar relacionado ao tamanho da amostragem, que foi realizada em poucos domicílios e

em um curto período, apenas um ano. Porém, estudos têm mostrado que, devido a intensas ações antrópicas, tem se observado uma modificação no habitat desses insetos, adaptando-se ao ambiente urbano, sendo frequentemente encontrados em área peri e intradomicilar (183, 184, 185). Segundo D' Andrea (186), observou-se que a expansão e a adaptação do vetor aos ecótopos urbanos vêm ocorrendo de forma lenta, inicialmente sendo registrado em municípios contíguos à Araçatuba e depois naqueles que estabeleceram fluxo migratório de pessoas e mercadorias com os municípios da região de Araçatuba. Posteriormente, foi detectada em outras regiões administrativas como a de Bauru (SP), Marília (SP) e Presidente Prudente (SP), seguido pelos grandes eixos rodoviários e ferroviários.



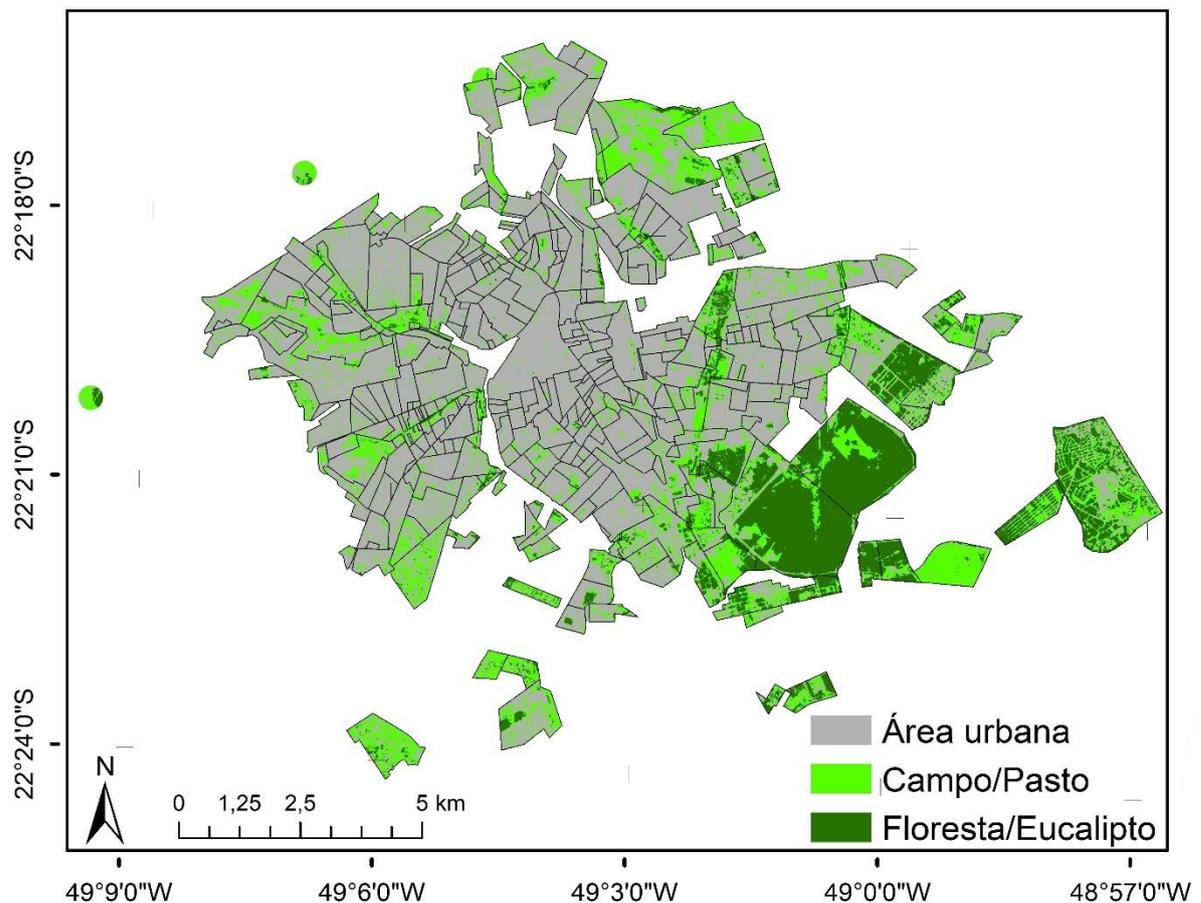
**Figura 16:** Distribuição de flebotomíneos no ano de 2014 em áreas de cobertura florestal de bairros do município de Bauru-SP.

### 6.9.2. Tipo de Cobertura da área

A partir da análise do mapa da paisagem dos bairros do município de Bauru, com casos positivos de leishmaniose visceral em humanos, cães, bovinos e/ou equinos, foram separadas três classes de uso e cobertura das terras: floresta/eucalipto, campo e área urbana. Pode-se observar que a maioria da extensão dos bairros é de área urbana, mas todos possuem área de campo e a maioria área de floresta/eucalipto (Figura 20 e Tabela 17).

Quando observamos os coeficientes de regressão obtidos a partir da extensão da área total dos bairros, há um efeito negativo sobre os casos da doença em humanos, com

valores de coeficientes de regressão de -0.14, -0.026 e -0.149 nos anos de 2013, 2014 e 2015, respectivamente, ou seja, quanto maior a extensão do bairro, menos casos positivos em humanos. Este fato pode ser explicado pelo raio de voo dos vetores, que é pequeno, aproximadamente 250 metros, sendo assim, uma área com maior extensão a população de vetores pode estar mais espalhada. e realizando o repasto sanguíneo em outras espécies animais . Porém, os dados sobre a densidade populacional dos bairros devem ser levados em consideração para essa análise, informação que não conseguimos obter em nosso estudo. (187)



**Elaboração:** Kanda, C.Z (2017)

**Fonte:** Secretaria de Planejamento de Bauru – SP

**Figura 20:** Mapa dos bairros do município de Bauru – SP com divisão dos tipos de áreas de cobertura

**Tabela 17:** Tipo de cobertura observado em bairros com casos positivos de leishmaniose visceral canina e humana do município de Bauru- SP

Bairros	Tipo de Cobertura			Bairros	Tipo de Cobertura		
	Floresta/eucalipto	Área urbana	Campo		Floresta/eucalipto	Área urbana	Campo
<b>Centro</b>	0.1271	189.4087	5.66	Nucl. Fortunato Rocha Lima	0.0034	21.0277	6.0645
Presidente Eurico Gaspar Dutra	0.0221	28.5204	5.1932	Nucl. Hab. Joaquim Guilherme de Oliveira	0.103	17.2689	4.5292
Conj. Hab. Isaura Pitta Garmes	2.7077	27.692	9.4021	Nucl. Hab. Beija Flor	3.7417	42.125	7.7082
Distrito Industrial Domingos Biancardi I	2.8633	113.8658	34.3088	Nucl. Hab. Edison Bastos Gasparini	0.977	38.4189	11.628
Distrito Industrial II	2.5978	28.9927	9.2038	Nucl. Hab. Jose Regino	0.9639	29.5057	5.5042
Jardim Bela Vista	0.3241	41.2046	2.2038	Nucl. Hab. Mary Dota	2.1245	107.4069	11.6495
Jardim Carolina	0.3042	73.5974	5.7545	Nucl. Hab. Vanuire	0.5217	9.7807	4.2678
Jardim Estoril IV	0	7.474	0.4896	Nuc. Hab. Presidente Ernesto Geisel	1.5879	92.7348	15.8635
Jardim Eugenia	0.0083	25.5191	5.775	Parque Industrial Manchester	9.7568	24.8164	22.1075
Jardim Europa	0.1751	59.8991	6.3899	Parque Jaragua	0.1752	105.7015	9.3374
Jardim Florida	1.0494	27.6115	8.2767	Parque Paulista	0.094	45.654	8.2138
Jardim Fonte doCastelo	0.0017	2.3879	1.4161	Parque Primavera	0	11.2299	3.6972
Jardim Gerson França	0.5867	28.7874	5.2709	Parque Residencial Pousada da Esperanca	4.1169	107.5815	36.6591
Jardim Godoy	0.0219	8.8086	0.8345	Parque Santa Candida	0.0081	22.1807	5.3898
Jardim Guadalajara	0.0454	3.3197	1.0994	Parque Santa Edwirges	0.2272	107.2926	10.9214
Jardim Maria Celia	0	2.7298	0.1908	Parque Santa Terezinha	0.3146	11.7342	3.4254
Jardim Nova Bauru	0	22.3636	1.6055	Parque São Geraldo	0.0017	22.6751	0.6033
Jardim Petropolis	0.0235	33.8034	2.4904	Parque Viaduto	0.0017	45.713	4.3915
Jardim Redentor	0.0033	4.6917	0.1004	Vila Cidade Universitária	0.0205	41.2362	1.6013
Jardim Rosa Branca	0.0368	9.9167	0.9551	Vila Falcao	1.0637	24.0839	3.8759
Jardim Silvestre	0.4862	18.3667	1.4433	Vila Ipiranga	0	26.2756	1.1993
Jardim Solange	0	51.1267	7.8182	Vila Niponica	0.0016	6.2139	0.3651
Jardim Terra Branca	0.0017	31.6415	2.5145	Vila Nova Niponica	0	4.4767	0.2361
Jardim Vitoria	0	11.8975	1.3335	Vila Paraiso	0.0025	29.4645	0.8723

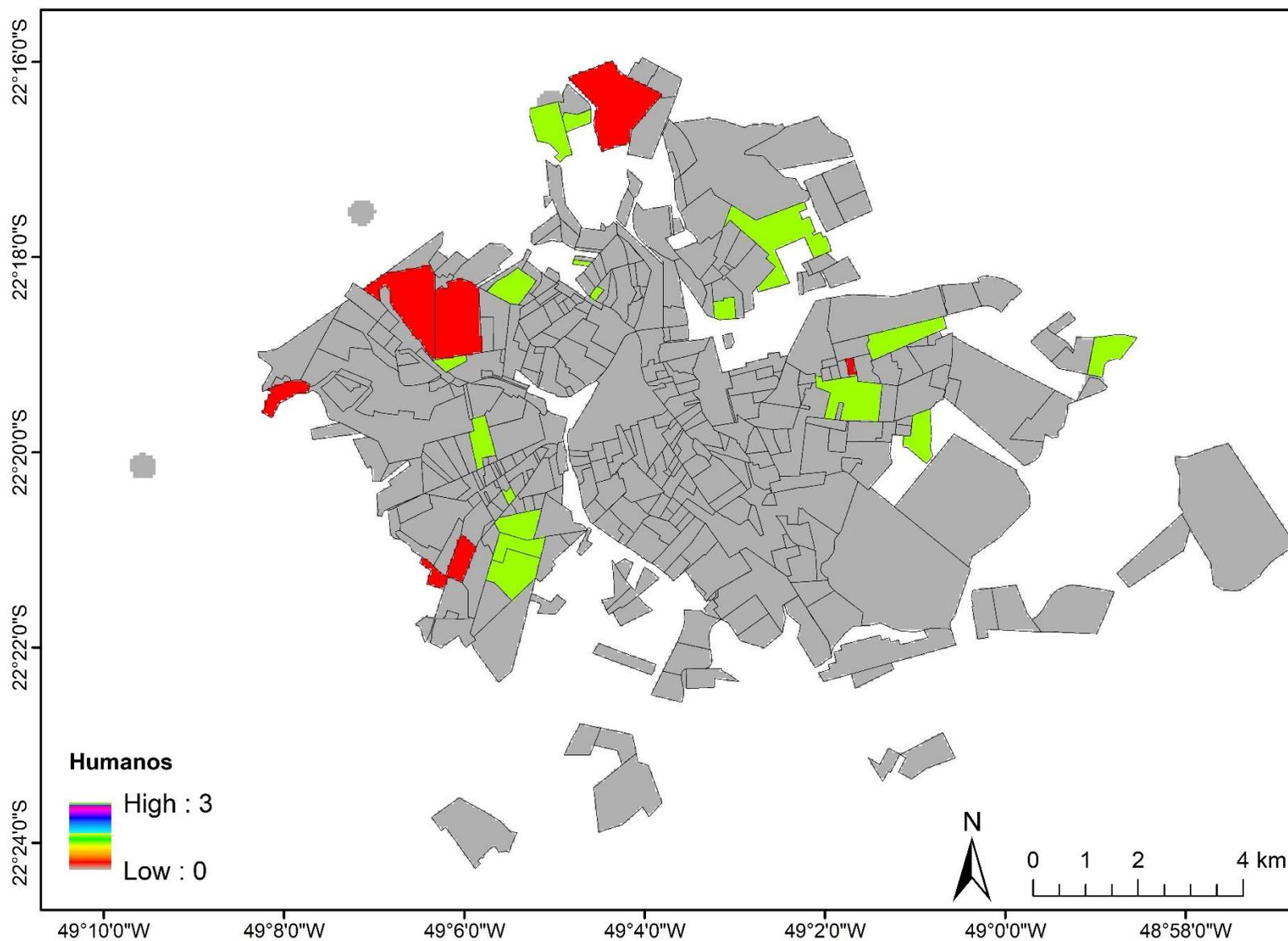
Jardim Yolanda	0.099	0.6058	0.5222	Vila Quaggio	0.0207	27.9439	1.0257
Vila Independencia	0.0308	26.6532	1.2648	Vila Santa Izabel	0	8.2775	0.401
Vila Santa Luzia	0.01286	14.3802	0.8657	Vila São Paulo	0.01449	48.3925	6.0937
Vila Santista	1.0928	20.8032	5.0862	Vila Seabra	0.0099	43.9429	2.8184

Elaboração: Kanda, C.Z (2017)

### *6.9.3. Mapas dos bairros do município de Bauru com destaque para casos positivos de Leishmaniose*

#### 6.9.3.1. Humanos

A Figura 21 destaca os bairros do município de Bauru com registro de Leishmaniose em humanos, nos anos de 2013, 2014 e 2015, de acordo com dados fornecidos pela Secretaria Municipal de Saúde. É possível observar a ocorrência da doença em áreas mais periféricas, mas também na região central do município, corroborando com resultados obtidos em dois trabalhos realizados no município, a fim de verificar a distribuição da doença em humanos, pela análise espacial. O primeiro, realizado por Souza et al.(140), avaliaram a ocorrência da doença no período de 2003 a 2008, tendo-se constatado a maioria dos casos de leishmaniose na área urbana do município, concordando com estudo retrospectivo realizado por Ortiz e Anversa (104), avaliando a epidemiologia da leishmaniose humana em Bauru-SP, sendo que, no período de 2014 a 2012, a doença atingiu indivíduos residentes em região periférica, padrão comum observado na epidemiologia das leishmanioses; porém, observou-se uma diversificação na epidemiologia da doença no município, atingindo também indivíduos que vivem no centro urbano.



Elaboração: Kanda, C.Z (2017)

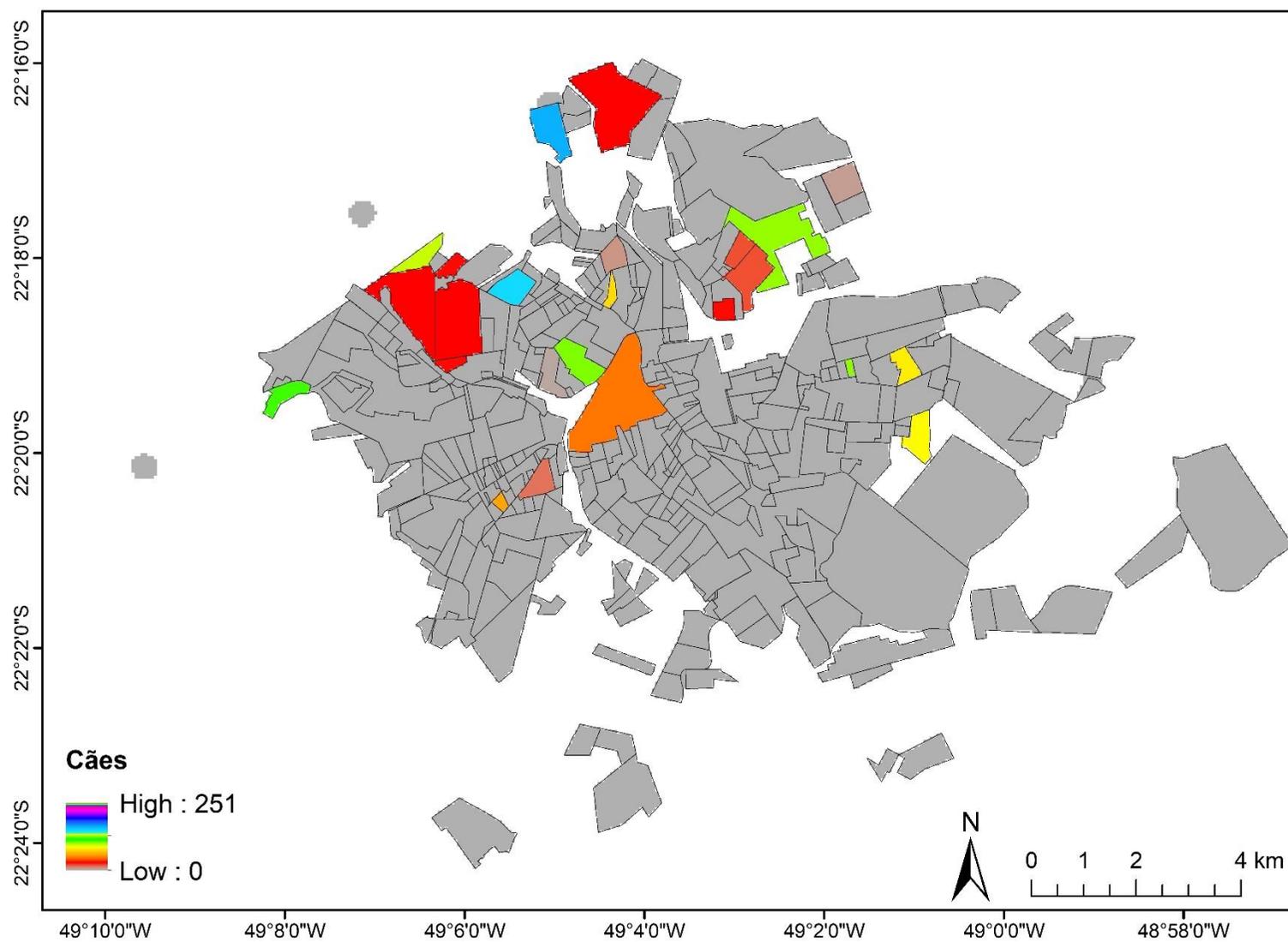
Fonte: Secretaria de Planejamento de Bauri - SP

Figura 21: Mapa dos bairros com casos de LV em humanos no município de Bauri- SP

#### 6.9.3.2. Cães

Na Figura 22, é possível visualizar os bairros com casos positivos da doença em cães nos anos de 2013 a 2015. A LVC é uma doença endêmica no município de Bauru, apresentando elevado número de casos da doença em animais dessa espécie, sendo possível observar no mapa bairros com mais de 300 casos diagnosticados da doença. De acordo com dados do CCZ, a incidência da doença em cães no município de Bauru-SP, está entre 10 a 15% , sendo considerada elevada, tendo em vista que o ideal seria um valor menor que 5%.

Avaliando a influência da doença em cães sobre a ocorrência da doença em humanos nos anos de 2014 e 2015, os coeficientes de regressão apresentaram valores de 0,005 e 0,0059, respectivamente, mostrando efeitos positivos da doença em humanos. Sendo assim, a partir das análises realizadas, os casos da doença em cães favorecem a ocorrência da doença em humanos, resultados que corroboram com a literatura, demonstrando que os casos da doença canina precedem os casos da doença em humanos (53, 188, 189) .



**Elaboração:** Kanda, C.Z (2017)

**Fonte:** Secretaria de Planejamento de Bauru - SP

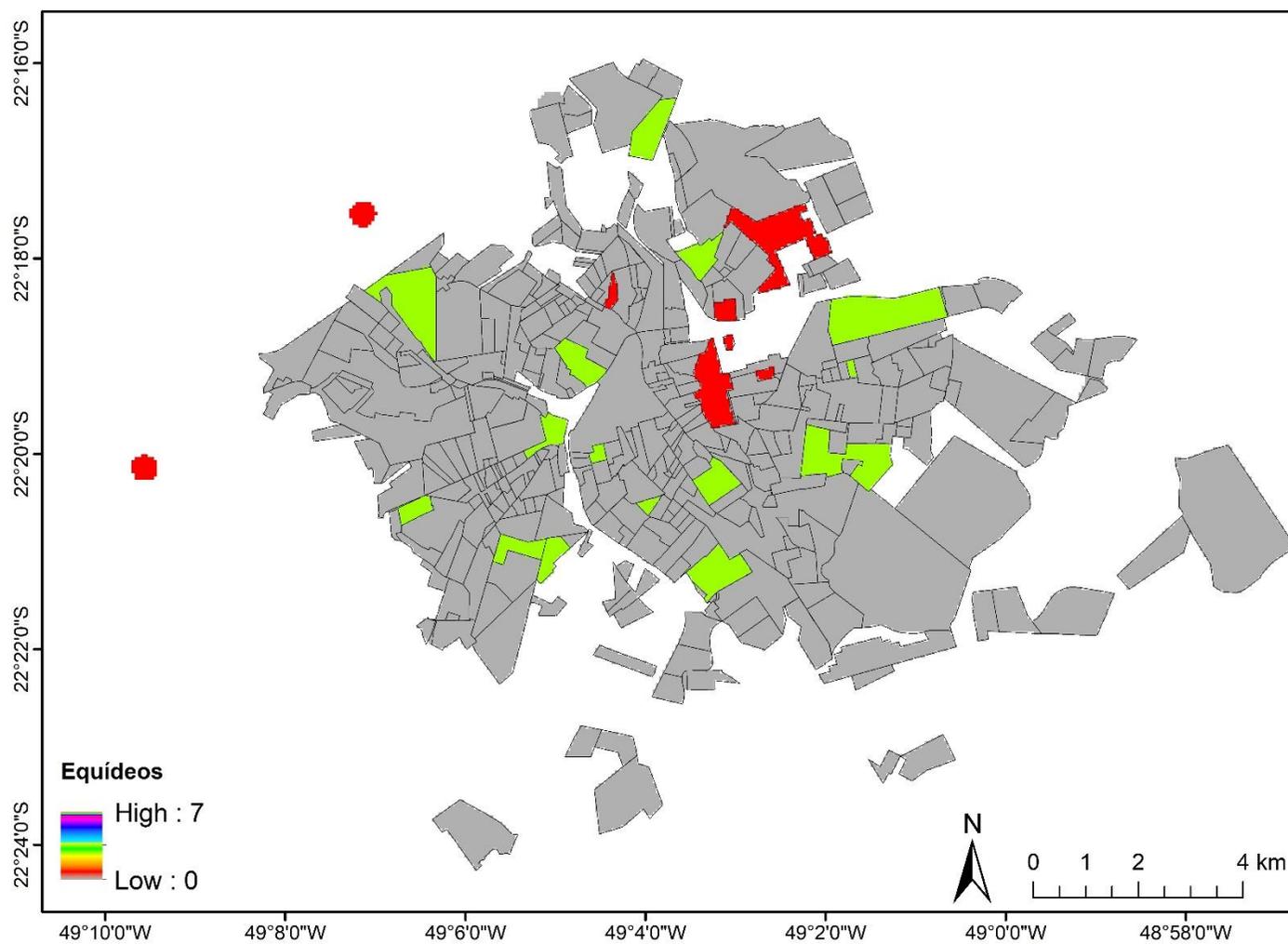
**Figura 22:** Mapa dos bairros com casos de LV canina no município de Bauru- SP

### 6.9.3.3. Equídeos

A partir das técnicas sorológicas para *L. infantum* e *L. braziliensis*, verificamos o possível contato de equídeos de região urbana e periurbana de Bauru, com o parasito causador das leishmanioses. A Figura 23 apresenta os bairros com casos de animais reagentes às provas sorológicas e/ou positivos à técnica molecular para *Leishmania* spp.

A partir da análise dos coeficientes de regressão, avaliando-se a influência da presença de equídeos sobre a ocorrência da doença em humanos, nos anos de 2013 e 2014 houve uma relação negativa, com valores de -0,099 e - 0,026, respectivamente, indicando a presença desses animais como possível fator protetor para a ocorrência da doença em humanos. Já no ano de 2015, a relação foi positiva, porém baixa, com valor de 0,047.

No Brasil, estudos já identificaram a infecção por *Leishmania* spp. em animais dessa espécie (84, 137,140,141) indicando o contato dos flebotomíneos com equídeos, ou seja, diante dos resultados obtidos em nosso estudo, podemos aventar a possibilidade do vetor realizaro repasto sanguíneo em equídeos, não havendo, portanto, a necessidade de se alimentar em humanos.



**Elaboração:** Kanda, C.Z (2017)

**Fonte:** Secretaria de Planejamento de Bauru - SP

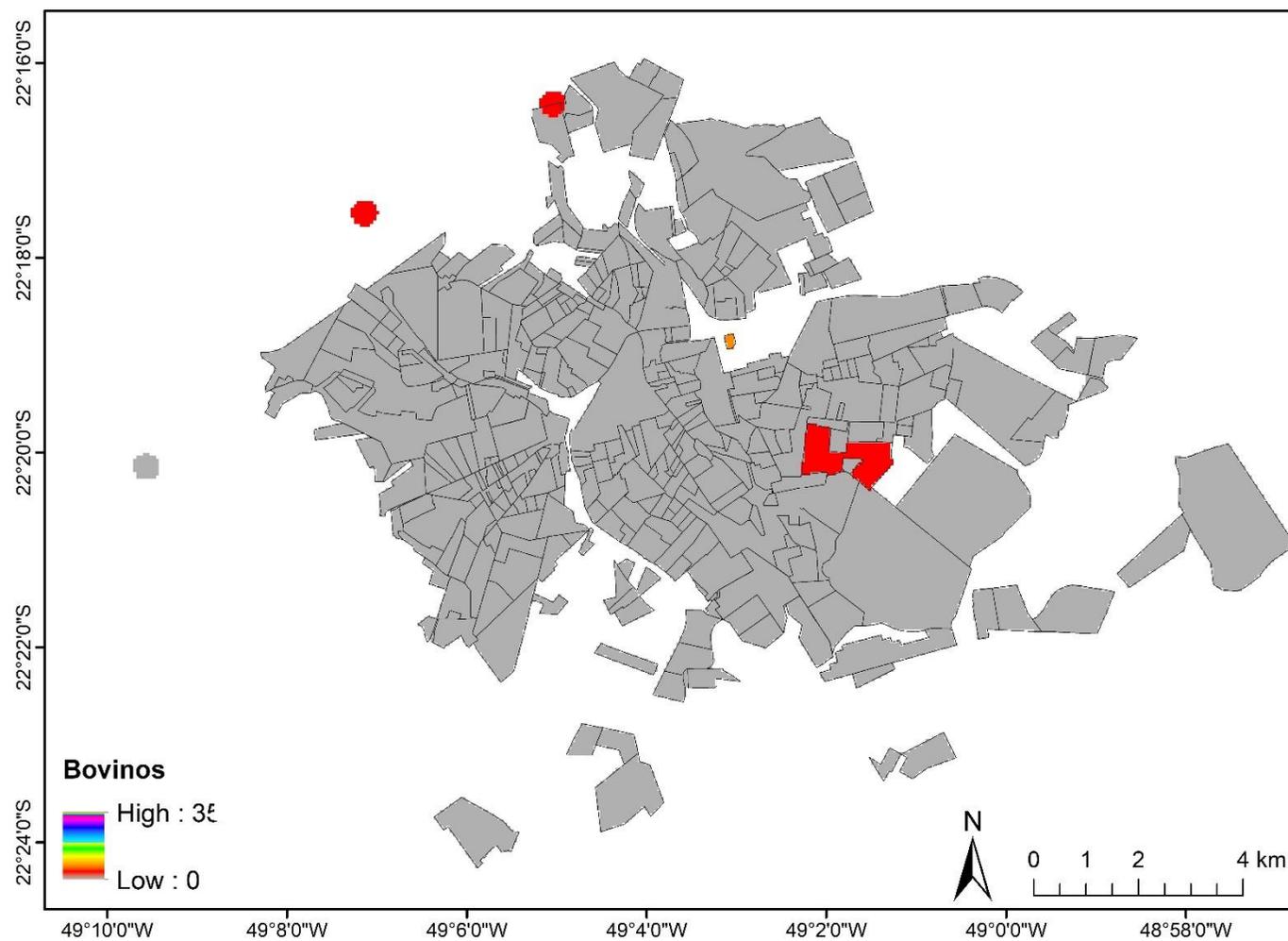
**Figura 23:** Mapa dos bairros com casos de leishmaniose em eqüídeos no município de Bauru- SP

#### 6.9.3.4. Bovinos

A partir das técnicas sorológicas para *L. infantum* e *L. braziliensis*, verificamos, assim como observado em eqüídeos, o possível contato de bovinos de região urbana e periurbana de Bauru, com o parasito causador das leishmanioses. A Figura 24 apresenta os bairros com casos de animais reagentes às provas sorológicas e/ou positivos à técnica molecular para *Leishmania* spp. A coleta de sangue em bovinos foi realizada em menor número de bairros quando comparado à coleta em equinos, o que explica o menor número de bairros com casos positivos.

A partir da análise dos coeficientes de regressão, avaliando-se a influência da presença de bovinos sobre a ocorrência da doença em humanos, no ano de 2013 o efeito foi negativo e baixo, com um valor de -0,097 do coeficiente de regressão, apesar de alguns estudos atribuírem o papel de atração do vetor por animais dessa espécie, que vivem próximos a domicílios, ao aumento da ocorrência da doença em humanos (102, 103,104).

Os resultados do presente estudo indicam que a ocorrência da doença nessa espécie animal, pode ser “benéfica” para seres humanos, evitando-se novos casos da doença na população, corroborando com resultados obtidos por Bern et al.(105), os quais relataram que, no Nepal, devido a preferência alimentar do vetor por bovinos e bubalinos, a presença destes animais nos peridomicílios constituía-se em um fator protetor para LV às pessoas, já que em áreas endêmicas, os vetores realizam freqüentemente repasto sanguíneo em bovinos (101).



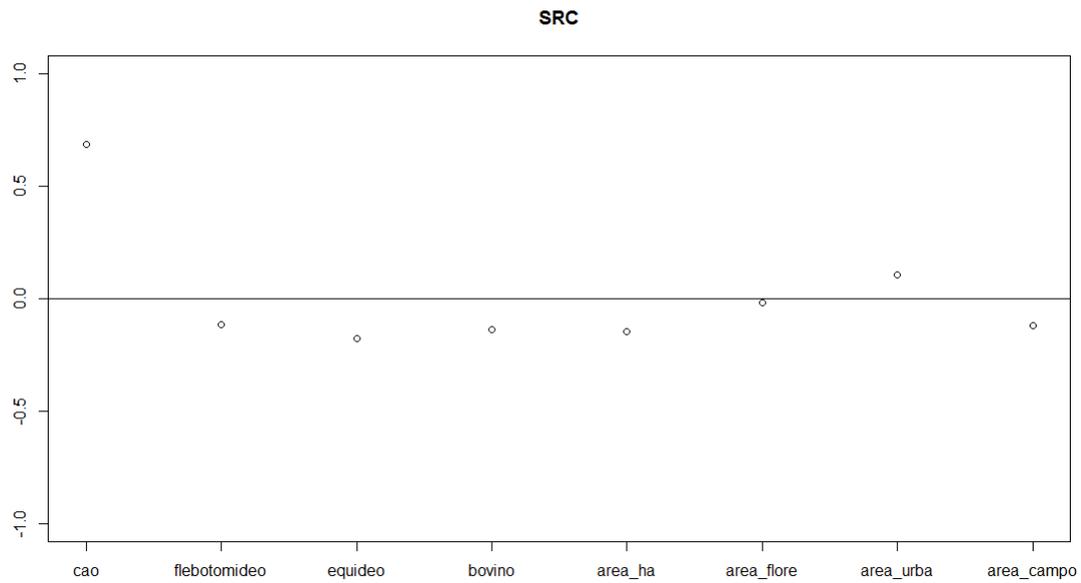
Elaboração: Kanda, C.Z (2017)

Fonte: Secretaria de Planejamento de Bauru - SP

Figura 24: Mapa dos bairros com casos de leishmaniose em bovinos no município de Bauru- SP

#### 6.9.4. Análise do coeficiente geral de todos os fatores

Foi realizada uma análise de regressão dos anos de 2013, 2014 e 2015 baseada nos fatores: tipo de área e presença de cães, bovinos e eqüídeos positivos, para relacionar a influência destes na ocorrência da doença em humanos. A figura 25 apresenta o gráfico da análise nos três anos de estudo.



**Legenda:** SRC = standart regression coefficient

**Elaboração:** Kanda, C.Z (2017)

**Figura 25:** Coeficientes de regressão padronizado dos fatores em função da ocorrência da doença em humanos nos anos de 2013 a 2015.

##### 6.9.4.1. Área

Quando somada a ocorrência total de casos positivos nos anos de 2013, 2014 e 2015 à quantidade de cobertura de área urbana dos bairros, verificou-se um valor de coeficiente de regressão de 0,106, indicando um fator determinante para ocorrência da doença em humanos. Já para a quantidade de cobertura florestal e de campo dentro dos bairros, o coeficiente de regressão foi de -0,019 e - 0,011, respectivamente, indicando um efeito negativo sobre a ocorrência da doença em humanos, resultados que indicam, portanto a urbanização da doença, como já descrito por Zorzetto (41).

##### 6.9.4.2. Cães

A presença de cães positivos, somada à ocorrência total de casos positivos da doença, apresentou um índice de regressão de 0,68, indicando um fator determinante da ocorrência da doença em humanos, como já documentado em outros estudos, relatando-se que

normalmente os casos humanos aparecem após os primeiros casos caninos autóctones serem registrados na localidade (53, 184,185)

#### 6.9.4.3. Equídeos e Bovinos

Diferente do observado em cães, a partir da análise da presença de equídeos e bovinos, o efeito mostrou-se negativo para doença em humanos, com valores de -0,175 e -0,139 respectivamente, indicando que a presença destes pode ser fator protetor para doença em humanos, já que possivelmente os vetores estejam realizando o repasto sanguíneo nestes animais.

*Conclusões*

## 7. CONCLUSÕES

- Alguns dos bovinos e equídeos avaliados no presente estudo demonstraram infecção por *Leishmania* spp., tendo em vista os resultados positivos obtidos às provas parasitológicas, sorológicas e/ou moleculares, indicando a possível participação destes animais no ciclo epidemiológico das leishmanioses no município de Bauru- SP;

- Verificamos a presença de tripanosomatídeos nos equídeos e bovinos avaliados;

- O emagrecimento foi um sinal clínico comum observado nos animais;

- Equídeos e bovinos foram reagentes tanto à RIFI quanto ao ELISA;

- Não foram observados tripanosomatídeos a partir do esfregaço sanguíneo em ambas espécies;

- Foram isolados tripanosomatídeos a partir de hemocultura apenas na espécie bovina;

- O presente estudo foi o primeiro a identificar *Leishmania infantum* e *Trypanosoma theileri* em bovinos do estado de São Paulo;

- Primeira identificação de *Leishmania donovani* em equídeos e bovinos no município de Bauru-SP;

- A análise espacial dos bairros do município de Bauru-SP revelou que não houve relação entre a quantidade de flebotomíneos e a cobertura florestal no período estudado;

- A partir da análise espacial foi possível observar que os animais de produção do presente estudo podem exercer papel de proteção da ocorrência de leishmaniose em humanos.

*Referências  
bibliográficas*

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

- 1 - Borghesan TC. Diversidade e Filogenia de Tripanosomatídeos parasitos de dípteros[tese].São Paulo: Universidade de São Paulo;2013.
- 2 - Matthews KR. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. J Cell Sci. 2005;118:283-90.doi:10.1242/jcs.01649.
- 3 - Roque AIR, Jasen AM. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: Galvão C, organizador. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014. p. 75-87.
- 4 - Abrão DC, Carvalho AU, Facury Filho EJ, Saturnino HM, Ribeiro MFB. Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no estado de Minas Gerais. Cienc Anim Bras. 2009; Supl 1:672-6.
- 5 - Linhares GFC, Dias Filho, FC, Fernandes PR, Duarte SC. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). Cienc Anim Bras. 2006;7(4):455-60.
- 6 - Silva RAMS. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. Corumbá: Embrapa Pantanal; 2002. 141 p.
- 7 - Finelle, P. African animal trypanosomiasis; Part IV. Economic Problemes. Wild Anim Rev.1974; 110: 15-8.
- 8 - World Health Organization [Internet]. Chagas disease (American trypanosomiasis) [citado 20 Fev 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
- 9 - Ministério da Saúde (BR).Secretaria de Vigilância em Saúde.Boletim Epidemiológico.Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2015.
- 10 - Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doença de Chagas. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2009.

---

<sup>1</sup>Segundo normas Vancouver. “Uniform Requeriments for Manuscriptis Submitted to Biomedical Journal (International Committee of Medical Journals editors, 1993).

- 11 - Souza AI, Oliveira TMFS, Machado RZ, Camacho AA. Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesqui Vet Bras.* 2009;29(2):150-2.
- 12 - Longoni SS, López-Céspedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-Gonzalez ME, Sauri-Arce CH, Rodríguez MC. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012;35:469-76.
- 13 - Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Alves-Martin MF, Paixão MS, Rodrigues MV, Starke-Buzetti WA, et al. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. *Vet Parasitol.* 2014;203(1-2):203-6.
- 14 - Zetun CB, Lucheis SB, Zampoli MT, Langoni H. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do estado de São Paulo. *Vet Zootec.* 2014;21(1):139-47.
- 15 - Ibáñez-Cervantes G, Martínez-Ibarra A, Noguera-Torres B, López-Orduña E, Alonso AL, Perea C, et al. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in México. *Parasitol Int.* 2013;62:36-43.
- 16 - Centers for disease Control and Prevention. *Trypanosoma brucei*.
- 17 - Langousis G, Hill KL. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(7):505-18. doi:10.1038/nrmicro3274.
- 18 - Paiva F, Lemos RAA, Nakazato L, Mori AE, Brum KB, Bernardo KC. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: i – acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. *Rev Bras Parasitol.* 2000;9(2):135-41.
- 19 - Batista JS, Bezerra FSB, Lira RA, Carvalho JRG, Rosado Neto AM, Petri AA, et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. *Pesq Vet Bras.* 2008;28(1):63-9.
- 20 - Paiva ES. Tripanossomíase por *Trypanosoma vivax* em pequenos ruminantes: descrição de surtos e infecção experimental da doença [dissertação]. Mossoró: Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFRSA; 2009.

- 21 - Bezerra FSB, Batista JS. Efeitos da infecção por *Trypanosoma vivax* sobre a reprodução: uma revisão. *Acta Vet Bras.* 2008;2(3):61-6.
- 22 - Silva AS, Costa MM, Polenz MF, Polenz CH, Teixeira MMG, Lopes STA, et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural.* 2009;39(8):2550-4.
- 23 - Guerra RMSNC, Feitosa Junior AB, Santos HP, Abreu-Silva AL, Santos ACG. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. *Ciênc Rural.* 2008;38(3):833-5.
- 24 - Madruga CR. Epidemiologia do *Trypanosoma vivax* no Brasil. *Cienc Anim Bras.* 2009;1-10.
- 25 - Cadioli FA, Barnabe PA, Machado RZ, Teixeira MCA, Andre MR, Sampaio PH, et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012;21(2):118-24.
- 26 - Jaimes-Duenez J, Triana-Chavez O, Valencia-Hernandez A, Sanchez Arevalo D, Poche-Ceballos A, Ortiz-Alvarez J, et al. Molecular diagnosis and phylogeographic analysis of *Trypanosoma evansi* in dogs (*Canis lupus familiaris*) suggest an epidemiological importance of this species in Colombia. *Prev Vet Med.* 2017;139:82-9.
- 27 - Franciscato C, Lopes STA, Teixeira MMG, Monteiro SG, Wolkmer P, Garmatz BC, et al. Dog naturally infected by *Trypanosoma evansi* in Santa Maria, RS, Brasil. *Ciênc Rural.* 2007;37(1):288-91.
- 28 - Herrera HM, Norek A, Freitas TPT, Rademaker V, Fernandes O, Jansen AM. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitol Res.* 2005;96:121-6. doi 10.1007/s00436-005-1334-6.
- 29 - Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild A, Soares MP, Milano J, et al. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. *Pesqui Vet Bras.* 2005;25(4):239-49.
- 30 - Zanette RA, Silva AS, Costa MM, Monteiro SG, Santurio JM, Lopes STA. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em equinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. *Cienc Rural.* 2008;38(5):1468-71.

- 31 - Silva AS, Oliveira CB, Zanette RA, Soares CDM, Coradini G, Polenz CH, et al. Occurrence of *Trypanosoma evansi* in bovines from a dairy farm in the municipality of Videira - SC, Brazil. *Acta Sci Vet.* 2007;35(3):373-6.
- 32 - Colpo CB, Monteiro SG, Stainki DR, Colpo ETB, Henriques GB. Natural infection by *Trypanosoma evansi* in dogs. *Cienc Rural.* 2005;35(3):717-9.
- 33 - Fischer VL, Capanema NP, Silva JCV, França NN, Barão TD, Kataoka A. Trypanosomiasis in a dog of Nova Canaã do Norte-MT. In: Anais do 42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 1º Congresso Sul-Brasileiro da ANCLIVEPA; 2015; Curitiba. Curitiba; 2015.
- 34 - Suganuma K, Yamasaki S, Molefe NI, Musunguzi PS, Davaasuren B, Mossaad E, et al. The establishment of in vitro culture and drug screening systems for a newly isolated strain of *Trypanosoma equiperdum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2017;7:200-5.
- 35 - Rodrigues RPS, Sanches MP, Soares LLS, Barbosa MAPS, Moura LSM, Sousa RPR, et al. Aspectos epidemiológicos, patológicos e clínicos da tripanossomíase “Mal do coito”. *Publ Med Vet Zootec.* 2016;10(4):321-6.
- 36 - Brun R, Hecker H, Zhao-Rong L. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet Parasitol.* 1998;79:95-107.
- 37 - Mott GA, Wilson R, Fernando A, Robinson A, MacGregor P, Kennedy D, et al. Targeting cattle-borne zoonoses and cattle pathogens using a novel trypanosomatid-based delivery system. *PLoS Pathog.* 2011;7(10):e1002340.
- 38 - Martins JR, Leite RC, Doyle RL. Tripanosomatídeos like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2008;17(2):113-4.
- 39 - Sood NK, Singla LD, Singh RS, Uppal SK. Association of *Trypanosoma theileri* with peritonitis in a pregnant cross-bred cow: a case report. *Vet Med.* 2011;56(2):82-4.
- 40 - Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):71-80.
- 41 - Zorzetto R. Os vilõezinhos da Leishmaniose. *Pesquisa FAPESP.* 2001;(68):53-5.

- 42 - Braga ARC, Langoni H, Lucheis SB. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2014;20:5.
- 43 - Carranza-Tamayo CO, Werneck GL, Romero GA. Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest Brazilian cities? *Braz J Infect Dis*. 2016;20(2):119-26.
- 44 - JuliãoFS. Uso de método de biologia molecular quantitativo (PCR*real-time*) na avaliação de reservatórios para leishmaniose visceral [tese].Salvador:FundaçãoOswaldoCruz;2011.
- 45 - WilliamsAO,MutingaL,RodgersM. Leishmaniasis in a domestic goat in Kenya. *MolCell Probes*.1991;5:319-25.
- 46 - Zhao S, Kuang Y, Wu CH, Ben-Arih D, Ramalho-Ortigao M, Bi K. Zoonotic visceral leishmaniasis transmission: modeling, backward bifurcation, and optimal control. *J Math Biol*. 2016;73(6-7):1525-60.
- 47 - Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. Leishmanioses. Informe de nº 5. 2017;(5) [citado 08 Maio 2017]. Disponível em: [www.paho.org](http://www.paho.org).
- 48 - World Health Organization [Internet]. Leishmaniasis [citado 20 Maio 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- 49 - Narain JP, Dash AP, Bhattacharya B, Barua S, Bhatia R, Saviolo L. Elimination of neglected tropical diseases in the South-East Region of the World Health Organization. *Bull World Health Organ*. 2010;88(3):199-205.
- 50 - Talhari C, Guerra JAO, Chrusciak-Talhari A, Machado PRL, Talhari S. American Tegumentary Leishmaniasis. In: Faber WR, Hay RJ, Naafs B, organizadores. Imported skin diseases. 2nd ed. India: Wiley-Blackwell; 2013. Cap. 15, p. 171-88.
- 51 - Malafaia G. Leishmaniose visceral e desnutrição: uma relação ainda muito negligenciada. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):478-9.
- 52 - Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med*. 2016;9(10):925-32.

- 53 - Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2014.
- 54 - Secretaria de Estado da Saúde. Leishmaniose Tegumentar Americana: Situação Atual [Internet] São Paulo: SUCEN [citado 10 fev 2017]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-tegumentar-americana/situacao-atua>
- 55 - Centro de Vigilância Epidemiológica (BR). Leishmaniose [Internet]. São Paulo: CVE; 2016 [citado 23 Maio 2016]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve\\_leishvisc.html](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_leishvisc.html)
- 56 - Bauru. Secretaria Municipal de Saúde [Informação pessoal].
- 57 - Bauru. Centro de Controle de Zoonoses do Município de Bauru-SP [Informação pessoal].
- 58 - Cardim MF, Guirado MM, Dibo MR, Chiaravalloti Neto F. Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: spatial and space-time analysis. Rev Saude Publica. 2016;50:48.
- 59 - Souza AI, Nunes VLB, Borralho VM, Ishikawa EAY. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul State, Brazil: a case report. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2009;15(2):359-65.
- 60 - Humberg RMP, Oshiro ET, Pires e Cruz MS, Ribolla PEM, Alonso DP, Ferreira AMT, et al. *Leishmania chagasi* in Opossums (*Didelphis albiventris*) in an Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Am. J Trop Med Hyg. 2012; 87(3): 470–72.
- 61 - Tempone AJ, Pitaluga NA, Traub-Cseko YM. Parte III – Aspectos Bioquímicos e Moleculares na Interação Parasito-Hospedeiro- Vetor- Aspectos Moleculares da Interação Flebotomíneo-Leishmania. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014.p.159.
- 62 - Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.

- 63 - Akilov OE, Amor K, Tayyaba H. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous Leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 2007;46(2):132-42.
- 64 - Costa DL, Costa CHN. Parte VI – Espectro Clínico das Leishmanioses- Leishmaniose Visceral. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p.327.
- 65 - Ministério da Saúde (BR). Leishmaniose Tegumentar: Dados epidemiológicos [Internet]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LT-Graficos-e-Mapas.pdf>
- 66 - Ministério da Saúde (BR). Leishmaniose Visceral: Dados epidemiológicos [Internet]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf>
- 67 - Makowiecky ME, Mattos MS, Tormem SH, Gatti RR, Biz DM, Pereira R, et al. Manual de orientação de LTA [Internet]. Santa Catarina. Vigilância Epidemiológica; 2016 [citado 15 jan 2017]. Disponível em: [http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Manual de Orientacao de LTA\\_revisado.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Manual_de_Orientacao_de_LTA_revisado.pdf)
- 68 - Pessoa SB, Barreto MP. Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro: Ministério da Educação e Saúde; 1948.
- 69 - Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da leishmaniose Tegumentar. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2010.
- 70 - Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2009.
- 71 - Brazil RP, Brazil BG. Parte IV – Hospedeiros, reservatórios e manutenção dos ciclos de transmissão - Vetores na Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p.195.
- 72 - Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7(3):338-49.

- 73 - Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2007.
- 74 - Martins FSV, Pedro LGF, Castiñeiras TMPP. Doenças transmitidas por insetos e carrapatos [Internet]. Rio de Janeiro: Centro de Informação ao Viajante (CIVES); 2016 [citado 20 Maio 2016]. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/viagem/protecao/dtic-iv.html>.
- 75 - Dantas-Torres F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors*. 2008;1(1):25
- 76 - Viol MA, Guerrero FD, De Oliveira BC, De Aquino MC, Loiola SH, De Melo GD, et al. Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. *Parasitol Res*. 2016;115(9):3478-84.
- 77 - Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, De Paiva-Cavalcanti M, Figueiredo LA, Stanneck D, et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res*. 2010;106(4):857-60.
- 78 - FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. O parasita dos parasitas. *Pesquisa Fapesp*. 2012;192:16.
- 79 - Morais RC, Gonçalves De Albuquerque SC, Pessoa e Silva R, Costa PL, Da Silva KG, et al. Detection and quantification of *Leishmania braziliensis* in ectoparasites from dogs. *Vet Parasitol*. 2013;196:506-8.
- 80 - Conceição-Silva F, Alves CR, organizadores. *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. *Leishmaniose: uma apresentação*.
- 81 - Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Rev Cuba Med Trop*. 2012;64(2):108-31.
- 82 - Conselho Federal de Medicina Veterinária. Posicionamento sobre a Leishmaniose Visceral [Internet]. 2010 [citado 20 Maio 2016]. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/destaque.php?cod=419>.

- 83 - Reis AB. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.
- 84 - Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Par Vect.* 2009; 2(Suppl 1).
- 85 - Coelho WMD, Lima VMF, Amarante AFT, Langoni H, Pereira VBR, Abdelnour A, et al. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010;19(4):256-8.
- 86 - Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Silva Sobrinho, LVS, et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2010;47(3):213-7.
- 87 - Bresciani KDS, Serrano ACM, Matos LVS, Savani ESMM, D'Auria SRN, Perri SHV, et al. Ocorrência de *Leishmania* spp. em felinos do município de Araçatuba, SP. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010;19(2):127-9.
- 88 - Alves- Martin MF. Avaliação diagnóstica para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em gatos domésticos procedentes da associação protetora dos animais do município de Ilha Solteira, SP, Brasil [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; 2013.
- 89 - Baldini-Peruca LC, Lucheis SB, Tome RO, Richini-Pereira VB, Correa AFL, Troncarelli MZ, et al. *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) infection in cats from a Brazilian southeastern endemic area for canine and human leishmaniasis. *Vet Zootec.* 2017;24(1):216-25.
- 90 - Dahroug MAA, Almeida ABPF, Sousa VRF, Dutra V, Turbino NCMR, Nakazato L, et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104(1):73-4.
- 91 - Carreira JCA, Silva AVM, Pereira DP, Brazil RP. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Par Vect.* 2012; 5:111.
- 92 - Lombardi MC, Turchetti AP, Tinoco HP, Pessanha AT, Soave AS, Malta MCC, et al. Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. *Pesq Vet Bras.* 2014;34(12):1243-46.

- 93 - Mukhtar MM, Sharief AH, El Saffi SH, Harith AE, Higazzi TB, Adam AM, et al. Detection of antibodies to *Leishmania donovani* in animals in a kala-azar endemic region in eastern Sudan: a preliminary report. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94:33-6.
- 94 - Rolão N, Martins MJ, João A, Campino L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite J.* 2005;12:183-6.
- 95 - Agrela I, Sanchez E, Gomez B, Feliciangeli MD. Feeding behaviour of *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Diptera: Psychodidae), a putative vector of visceral leishmaniasis in Venezuela. *J Med Entomol.* 2002;49(3):440-5.
- 96 - Dias FOP, Lorosa ES, Rebelo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad Saúde Pública.* 2003;19(5):1373-80.
- 97 - Bhattarai NR, Van Der Auwera G, Rijal S, Picado A, Speybroeck N, et al. Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(2):231-7.
- 98 - Baum M, De Castro EA, Pinto MC, Goulart TM, Baura W, Klisiowicz DR, et al. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. *Acta Trop.* 2015;143:8-12.
- 99 - Paternina LE, Verbel-Vergara D, Romero-Ricardo L, Pérez-Doria A, Paternina-Gómez M, Martínez L, et al. Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of blood meals. *Acta Trop.* 2016;153:86-92.
- 100 - Ximenes MF, Souza MF, Castellón EG. Density of sandfly (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(4):427-32.
- 101 - Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990;4(1):1-24.

- 102 - Bucheton B, Kheir MM, El-Safi S H, Hammad A, Mergani A, Mary C, et al. The interplay between environmental and host factors during an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Microbes Infect.* 2002;4(14):1449-57.
- 103 - Singh R, Lal S, Saxena VK. Breeding ecology of visceral leishmaniasis vector sandfly in Bihar state of India. *Acta Trop.* 2008;107:117-20.
- 104 - Ortiz RC, Anversa L. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Bauru, São Paulo, Brazil, 2004-2012: a descriptive study. *Epidemiol Serv Saúde.* 2015;24(1):97-104.
- 105 - Bern C, Joshi AB, Jha SN, Das ML, Hightower A, Thakur GD, et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63(3-4):184-8.
- 106 - Lobsiger L, Müller N, Schweizer T, Frey CF, Wiederkehr D, Zumkehr B, et al. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet Parasitol.* 2010;169:468-74.
- 107 - Koehler K, Stechele M, Hetzel U, Domingo M, Schonian G, Zahner H, et al. Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2002;109:9-17.
- 108 - Solano-Gállego L, Fernández-Bellón H, Serra R, Gallego M, Ramis A, Fondevila D, et al. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Vet J.* 2003;35:320-3.
- 109 - Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Bardagí M, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol.* 2006;(2):1815.
- 110 - Müller N, Welle M, Lobsiger L, Stoffel MH, Boghenbor KK, Hilbe M, et al. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Vet Parasitol.* 2009;166(3-4):346-51.
- 111 - Gama A, Elias J, Ribeiro AJ, Alegria N, Schallig HD, Silva F, et al. Cutaneous leishmaniasis in a horse from northern Portugal. *Vet Parasitol.* 2014;200(1-2):189-92.
- 112 - Reuss SM, Dunbar MD, Mays MBC, Owen JL, Mallicote MF, Archer LL, et al. Autochthonous *Leishmania siamensis* in Horse, Florida, USA. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1545-7.

- 113 - Follador I, Araújo C, Cardoso MA, Tavares-Neto J, Barral A, Carvalho EM, et al. Surto de leishmaniose tegumentar americana, SantoAmaro,Bahia(Brasil).Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(5):497-503.
- 114 - Oliveira JTF. Frequência de anticorpos anti- *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911) em caninos e equídeos em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município do cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil [dissertação]. Recife: Faculdade de Medicina Veterinária Pernambuco; 2011.
- 115 - Soares IR, Silva SO, Moreira FM, Pradao LG, Fantinia P, Maranhão RP, et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*.VetParasitol. 2013;197:665-6.
- 116 - Escobar TA. Presença de *Leishmania* sp em equinos de zona urbana de Uruguaiana, Rio Grande do Sul [dissertação]. Uruguaiana: Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul; 2015.
- 117 - Ferreira FP, Caldart ET, Brito DRB, Chaves DP, Soares EDS, Garcia J, et al. Prevalência de anticorpos Anti *Trypanosoma* spp. E ANTI *Leishmania* spp. em cavalos “Baixadeiros”. In: Anais do 1º. Congresso de Pesquisa em Saúde Animal e Humana; 2016; Londrina. Londrina; 2016.
- 118 - Yoshida ELA, Marques AS, Stolf HO, Barsotti LA, Bueno MMF, Sogayar R. Infecção natural de *Equus caballus* por *Leishmania* spp. – São Paulo, Brasil. Rev Inst Med Trop. 1988;30(2):79-80.
- 119 - Benvenga GU. Ocorrência de Leishmaniose spp. em cães, gatos e equinos no Estado de SP [dissertação]. Pirassununga: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2013.
- 120 - Benassi JC. Detecção de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos [dissertação]. Pirassununga: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2015.
- 121 - Feitosa FLF, Leal J, Mendes LCN, Peiró R, Perri SHV, LimaVMF,et al. Estudo soroepidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral.Braz J Vet Res Anim Sci. 2012;49(6):500-2.

- 122 - DouradoZF,SilvaHD,Silveira-Lacerda EP, Garcia-ZapataMTA. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). Rev Patol Trop. 2007;36(3):2015-14.
- 123 - Ministério da Saúde (BR). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2011.
- 124 - Assis J, Queiroz NMGP, Silveira RCV, Nunes CM, Oliveira TMS, Machado RZ. Comparative study of diagnostic methods for visceral leishmaniasis in dogs from Ilha Solteira. Rev Bras Parasitol Vet. 2010;19(1):17-25.
- 125 - Lima Junior MSC, Andreotti R, Dorval MEMC, Oshiro ET, Oliveira AG, Matos MFC. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da Reação em Cadeia da Polimerase. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(3):303-8.
- 126 - Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone ML, Morte RD, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. Vet Parasitol. 2004;125:251-62.
- 127 - Leite RS, Ferreira SDEA, Ituassu LT, De Melo MN, De Andrade AS. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. Vet Parasitol. 2010;170(3-4):201-6.
- 128 - Barbosa VT, Silva MAG, Sousa MG, Gering AP, Santos HD, Laus JL. Detection of amastigotes forms in a parasitological exam of smears made from conjunctival swab in dogs with visceral leishmaniasis. Arq Bras Med Vet Zootec. 2012;64(6):1465-70.
- 129 - Pereira VF, Benassi JC, Starke-Buzetti WA, Silva DT, Ferreira HL, Keid LB, et al. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49(1):104-6.
- 130 - Iknomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. Vet Parasitol. 2003;113:99-103.
- 131 - Queiroz NMGP, Assis J, Oliveira TMFS, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti WA. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e

PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA- teste. Rev Bras Parasitol Vet. 2010;19(1):32-8.

132 - Laurenti MD. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral canina. Bol Epidemiol Paul. 2009;6(67):13-23

133 - Almeida JR. Planejamento ambiental. Rio de Janeiro: Biblioteca Universidade Estácio de Sá; 1993. p. 154.

134 - Câmara G, Monteiro AM, Druck S, Carvalho MS. Análise espacial e geoprocessamento. In: Druck S, Câmara G, Carvalho MS, Monteiro AMV, organizadores. Análise espacial de dados geográficos. Brasília: EMBRAPA Cerrados; 2002.

135 - Camargo-Neves VLF. A leishmaniose visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. Bol Epidemiol Paul. 2004;1:1-4.

136 - Paulan SC, Silva HR, Lima EACF, Flores EF, Tachibana V, Kanda CZ, et al. Saptial distribution of canine visceral leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. Eng Agric. 2012;32(4):765-74.

137 - Carvalho MS, Souza-Santos R. Análise de dados espaciais em saúde pública: métodos, problemas, perspectivas. Cad Saúde Pública. 2005;21:361-78.

138 - Fonseca ES. Visão geográfica integrada das estratégias de controle das leishmanioses no município de Teodoro Sampaio, SP, com o apoio do geoprocessamento [tese]. Presidente Prudente: Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista; 2013.

139 - Matsumoto PSS. Análise espacial da leishmaniose visceral canina em Presidente Prudente – SP. Abordagem geográfica da saúde ambiental [dissertação]. Presidente Prudente: Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista; 2014.

140 - Souza VA, Cortez LR, Dias RA, Amaku M, Ferreira Neto JS, Kuroda RB, et al. Space-time cluster analysis of American Visceral Leishmaniasis in Bauru, São Paulo State, Brazil. Cad Saude Publica. 2012;28(10):1949-64.

141 - Zuque MAS. Participação de gambás e cães domiciliados como reservatórios de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* georreferenciados nos municípios da Regional de Saúde de Três Lagoas-MS [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2016.

- 142 - Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari D, Michelina AF, Lima VMF. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Vet Parasitol.* 2007;150:283-90.
- 143 - Troncarelli MZ, Lucheis SB, Camargo JB, Machado JG, Langoni H. Análise clínica e laboratorial em cães eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses de Bauru-SP, com vista ao diagnóstico de leishmaniose visceral (LV). *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009;16(2):343-53.
- 144 - Greca H, Silva AV, Langoni H. Associação entre a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. E anti-*Neospora caninum* em cães de Bauru, SP. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2010;62(1):224-7.
- 145 - Guiraldi LM. Pesquisa de tripanosomatídeos em primatas de cativeiro do Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; 2016.
- 146 - Santos WJ. Pesquisa de *Trypanosoma cruzi* em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru – SP [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; 2016.
- 147 - Luz ZMF. Changes in the Hemoculture Methodology Improve the Test Positivity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94: 295-98.
- 148 - Pinto PLS. Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2000.
- 149 - Lahiri DK, Nurnberger JJ. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(19):5444.
- 150 - El Tai N, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schonian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sspc) and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94(5):575-9.

- 151 - Hernandez C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez D. Identification of six new World *Leishmania* species through the implementation of a High-366 Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vector*. 2014;7:501.
- 152 - Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870–4.
- 153 - Szargiki R. Comparação de métodos diagnósticos em leishmaniose tegumentar americana [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
- 154 - Costa TAC. Utilização da técnica de elisa com Proteína Ae anti-IgG para o diagnostico sorológico da leishmaniose visceral felina [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”; 2008.
- 155 - Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme-linked Immunosorbent Assay. In: Rose N, Friedman H, editors. *Manual of clinical immunology*. South Carolina: American Society for Microbiology; 1980. p. 359-71.
- 156 - Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1966;8:227-34.
- 157 - Khanal B, Picado A, Bhattarai NR, Van Der Auwera G, Das MI, Ostyn B, et al. Spatial analysis of *Leishmania donovani* exposure in humans and domestic animals in a recent kala azar focus in Nepal. *Parasitology*. 2010;137(11): 1597-603.
- 158 - Oliveira CDL, Diez-Roux A, César CC, Proietti FA. A case-control study of microenvironmental risk factors for urban visceral leishmaniasis in a large city in Brazil, 1999–2000. *Rev Panam Salud Publica*. 2006;20(6):369-76.
- 159 - Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2001;53(1):1-8.
- 160 - Berthier D, Brenière SF, Bras-Gonçalves R, Lemesre JL, Jamonneau V, Solano P, et al. Tolerance to Trypanosomatids: a threat, or a key for disease elimination? *Trends Parasitol*. 2016;32(2):157-68.

- 161 - Cerqueira E JL, Sherlock I, Gusmão A, Barbosa-Junior AA, Nakatani M. Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(6):695-701.
- 162 - Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2016.
- 163 - Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the Polymerase Chain Reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in a endemic region of North-Eastern Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90:129-32.
- 164 - Chiari E. Chagas Disease diagnosis using Polymerase Chain Reaction, hemoculture and serologic methods. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:299-300.
- 165 - Matos JH, Pinto AYN, Miranda AMM, Silva FLC, Ramos FLP. Reação cruzada nos testes sorológicos entre doença de Chagas e leishmaniose visceral em regiões endêmicas para ambas as doenças. Rev Pan-Amaz Saude. 2015;6(1):65-8.
- 166 - Schwanke K, Silva AMM, Pacheco A, Bahia M, Silveira FT, Scofield A, et al. Diagnóstico molecular e frequência de anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi* em cães domicílio de Belém, Pará. Pesqui Vet Bras. 2014;34(3):255-60.
- 167 - Verlooo D, Brandt J, Van Mervemme N, Buscher P. Comparative in vitro isolation of *Trypanosoma theileri* from cattle in Belgium. Vet Parasitol. 2000;89:129-32.
- 168 - Eyford BA, Sakurai T, Smith D, Lovelees B, Hertz-Fowle C, Donelson JE, et al. Differential protein expression throughout to life cycle of *Trypanosoma congolense*, a major parasite of cattle in Africa. Mol Biol Parasitol. 2011;117:116-25.
- 169 - Syvagothi S, Reddy BS, Kumari KN, Rayulu VC. Hematological changes in *Trypanosoma evansi* infected cattle. Int J Sci World. 2014;2:27-30.
- 170 - Uzcanga GL, Pérez-Rojas Y, Camargo R, Izquier A, Noda JA, Chacín R, et al. Serodiagnosis of bovine trypanosomosis caused by non-tsetse transmitted *Trypanosoma (Duttonella) vivax* parasites using the soluble form of a *Trypanozoon* variant surface glycoprotein antigen. Vet Parasitol. 2016;218:31-42.

- 171 - Sgorbini M, Bonelli F, Pizzolli I, Tognetti R, Corazza M. Seroprevalence of *Leishmania* sp. Infection in healthy horses housed in endemic areas in Tuscany. *J Equine Vet Sci.* 2014;34:572-4.
- 172 - Villalobos EMC, Carvalho PR, Lara MCCSH, Marques EC, Souza MCAM, Felicio OS, et al. Prevalence of immune response of health equines with antibodies anti *Leishmania chagasi* in an endemic área of Leishmaniasis. *Middle-East J Sci Res.* 2010; 5(6): 520-34.
- 173 - Akter S, Alam MZ, Islam T, Mondal MMH. Seroepidemiological study of visceral leishmaniasis and cattle as a possible reservoir host at Trishal Upazila in Bangladesh. *J Bangladesh Agric Univ.* 2012;10(1):79-86.
- 174 - Ferreira PRB, Laranjeira DF, Oliveira LS, Malta MC, Gomes MC, Bastos BL, et al. Teste de ELISA indireto para diagnóstico de Leishmaniose Visceral em canídeos silvestres. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33:528-34.
- 175 - Truppel JH, Otomura FH, Teodoro U, Thomaz-Soccol V. “Can equids be a reservoir of *Leishmania Braziliensis* in endemic areas?” *PLoS One.* 2014; 9.4(2014): e93731.
- 176 - Britto CFPC, Pereira DP. Parte IV – 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.
- 177 - Koltas IS, Fadime Eroglu F, Soner Uzun S, Alabaz D. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2016;164:43-8.
- 178 - Alam MS, Gnosh D, Khan MG, Islam MF, Mondal D, Toh M, et al. Survey of domestic cattle for anti-*Leishmania* antibodies and *Leishmania* DNA in a visceral leishmaniasis endemic area of Bangladesh. *Vet Res.* 2011;7:27.
- 179 - Rodrigues AC, Campaner M, Takata CSA, Porto AD, Milder RV, Takeda GF, Teixeira MMG. 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.* 2003; 116 (2003) :185–207.

- 180 - Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schonian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microb Infec.* 2005; 7 :1224–34.
- 181 - 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.* 2009; 46:181-7.
- 182 - Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico de Leishmaniose Visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso de epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saúde Pública.* 2004;20(1):259-65.
- 183 - Almeida OS, Minzão ER, Minzão LD, Silva SR, Ferreira AD, Faccenda O, et al. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(6):723-7.
- 184 - Martins KA. Comportamento adaptativo de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) às áreas urbanas da cidade de Teresina-PI. [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande de Norte; 2011.
- 185 - Silvino ACS, Silva KB, Sousa-Paula LC, Dias RV, Braga PET. Caracterização de flebotomíneos em bairros de Sobral, Ceará. *Rev Biol.* 2017;17(2):12-7.
- 186 - D'Andrea LAZ. Leishmaniose visceral americana – análise das estratégias de controle da doença na micro – região de Dracena na Alta Paulista/SP – Brasil [dissertação]. Presidente Prudente: Universidade do Oeste Paulista; 2008.
- 187 - Superintendência de Controle de Endemias. [Internet]. 2010 [citado 20 Maio 2016]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-visceral/vetores>
- 188 - Pocai EA, Frozza L, Headley AS, Graça DL. Leishmaniose Visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural.* 1998;28(3):501-5.
- 189 - Lopes EGP, Magalhães DF, Silva JA, Haddad JPA, Moreira EC. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2010; 62 (5): 1062-71.

*Anexos*

## 9. ANEXOS

### Anexo 1

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP

unesp	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		
		Comissão de Ética no Uso de Animais	Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012
<h2>CERTIFICADO Nº 1095/2014-CEUA</h2>			
<p><b>CERTIFICAMOS</b> que o Projeto de Pesquisa (<b>Protocolo CEUA 1095/2014</b>) <b>Investigação e análise espacial da ocorrência de leishmaniose visceral e tegumentar em bovinos (<i>Bos taurus</i>) e equídeos (<i>Equs spp.</i>) capturados em vias públicas do município de Bauru-SP</b>, a ser conduzido por Mirian dos Santos Paixão, orientada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Baldini Luchies, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os <b>"equídeos e bovinos"</b> são provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Bauru, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</p>			
<p><b>CERTIFICAMOS</b>, ainda que foi autorizada a utilização de <b>"100 equídeos e 100 bovinos"</b>. Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.</p>			
<p><b>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 31/07/2014</b></p>			
 Prof. Adjunto Katashi Okoshi Presidente da CEUA	 Kleber Messias de Camargo Secretário da CEUA		
<small>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br</small>			

# *Appendices*

## 10. APÊNDICES

### Apêndice 1

Determinação da melhor diluição de soro, conjugado e antígeno para equídeos

<b>Diluição</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Soro</b>	<b>Conjugado</b>	<b>Abs/Neg - Abs/Pos</b>
1	1	25	500	0,33
2	1	50	500	0,101
3	1	25	100	0,095
4	1	50	100	0,086
5	2,5	25	500	0,421
6	2,5	50	500	0,144
7	2,5	25	100	0,133
8	2,5	50	100	0,085

**Apêndice 2**

Determinação da melhor diluição do soro, conjugado e antígeno para bovinos

<b>Diluição</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Soro</b>	<b>Conjugado</b>	<b>Abs/Neg - Abs/Pos</b>
1	2,5	25	10000	0,189
2	2,5	25	20000	0,1365
3	2,5	25	30000	0,0455
4	2,5	50	10000	0,143
5	2,5	50	20000	0,074
6	2,5	50	30000	0,0445
7	2,5	100	10000	0,0915
8	2,5	100	20000	0,0175
9	2,5	100	30000	0,027
10	2,5	200	10000	0,08
11	2,5	200	20000	0,03
12	2,5	200	30000	0,0245

### Apêndice 3

Resultado gerais da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmaniainfantum* e *Leishmania braziliensis* em bovinos procedentes de Bauru-SP.

<b>Animal</b>	<b><i>L.infantum</i></b>	<b><i>L.braziliensis</i></b>	<b>Animal</b>	<b><i>L.infantum</i></b>	<b><i>L.braziliensis</i></b>
1	NR	NR	51	40	NR
2	NR	NR	52	NR	NR
3	NR	NR	53	NR	NR
4	NR	NR	54	80	NR
5	40	NR	55	NR	NR
6	80	N	56	NR	NR
7	NR	NR	57	NR	NR
8	40	NR	58	NR	NR
9	NR	NR	59	160	NR
10	80	NR	60	NR	NR
11	NR	NR	61	80	NR
12	NR	NR	62	NR	NR
13	NR	NR	63	NR	NR
14	NR	NR	64	NR	NR
15	NR	NR	65	NR	NR
16	NR	NR	66	NR	NR
17	NR	NR	67	80	NR
18	NR	NR	68	NR	NR
19	NR	NR	69	NR	NR
20	NR	NR	70	NR	NR
21	NR	NR	71	NR	NR
22	NR	NR	72	NR	NR
23	NR	NR	73	NR	NR
24	NR	NR	74	NR	NR
25	NR	NR	75	80	NR
26	NR	NR	76	NR	NR
27	NR	NR	77	NR	NR
28	NR	NR	78	NR	NR

29	NR	NR	79	80	NR
30	NR	NR	80	NR	NR
31	NR	NR	81	NR	NR
32	NR	NR	82	NR	NR
33	NR	NR	83	NR	NR
34	NR	NR	84	NR	NR
35	40	N	85	NR	NR
36	NR	NR	86	160	NR
37	NR	NR	87	NR	NR
38	80	NR	88	NR	NR
39	NR	NR	89	NR	NR
40	40	NR	90	NR	NR
41	40	NR	91	NR	NR
42	40	NR	92	80	NR
43	NR	NR	93	NR	NR
44	40	NR	94	NR	NR
45	40	NR	95	NR	NR
46	80	NR	96	NR	NR
47	40	NR	97	40	NR
48	160	NR	98	40	NR
49	NR	NR	99	NR	NR
50	NR	NR	100	NR	NR

Legenda: NR = Não Reagente

#### Apêndice 4

Resultados gerais de técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* em equídeos procedentes de Bauru-SP.

<b>Animal</b>	<b><i>L.infantum</i></b>	<b><i>L.braziliensis</i></b>	<b>Animal</b>	<b><i>L.infantum</i></b>	<b><i>L.braziliensis</i></b>
1	NR	NR	51	40	NR
2	40	NR	52	180	NR
3	NR	NR	53	80	NR
4	NR	NR	54	NR	NR
5	NR	NR	55	NR	NR
6	NR	NR	56	NR	NR
7	NR	NR	57	NR	NR
8	NR	NR	58	NR	NR
9	NR	NR	59	NR	NR
10	NR	NR	60	NR	NR
11	NR	NR	61	NR	NR
12	NR	NR	62	NR	NR
13	NR	NR	63	NR	NR
14	40	NR	64	NR	NR
15	NR	NR	65	NR	NR
16	NR	NR	66	NR	NR
17	NR	NR	67	NR	NR
18	NR	NR	68	NR	NR
19	NR	NR	69	NR	NR
20	160	160	70	NR	NR
21	40	NR	71	NR	NR
22	NR	NR	72	NR	NR
23	NR	NR	73	NR	NR
24	160	NR	74	NR	NR
25	NR	NR	75	NR	NR
26	80	NR	76	80	NR
27	NR	NR	77	NR	NR
28	NR	NR	78	NR	NR
29	NR	NR	79	NR	NR

30	NR	NR	80	NR	NR
31	NR	NR	81	NR	NR
32	NR	NR	82	NR	NR
33	40	NR	83	NR	NR
34	NR	NR	84	NR	NR
35	NR	NR	85	NR	NR
36	NR	NR	86	NR	NR
37	NR	NR	87	NR	NR
38	40	NR	88	NR	NR
39	NR	NR	89	NR	NR
40	40	NR	90	NR	NR
41	NR	NR	91	NR	NR
42	40	NR	92	NR	NR
43	NR	NR	93	NR	NR
44	NR	NR	94	NR	NR
45	NR	NR	95	NR	NR
46	NR	NR	96	NR	NR
47	NR	NR	97	NR	NR
48	80	40	98	NR	NR
49	40	NR	99	NR	NR
50	NR	NR	100	NR	NR

**Legenda:** NR= Não Reagente

**Apêndice 5**

Valores dos Níveis ELISA (NE) em relação aos valores de absorvância na reação de ELISA indireto para *Leishmania braziliensis* em bovinos . Em destaque nível do ponto de corte

<b>Níveis</b>	<b>Intervalo</b>
<b>0</b>	0-0,138
<b>1</b>	0,139-0,186
<b>2</b>	0,187-0,251
<b>3</b>	0,252-0,338
<b>4</b>	0,339-0,456
<b>5</b>	0,457-0,615
<b>6</b>	0,616-0,830
<b>7</b>	0,831-1,120
<b>8</b>	1,121-1,512
<b>9</b>	1,513-2,041

## Apêndice 6

ELISA indireto com antígenos brutos de *Leishmania braziliensis* realizado com soros dos bovinos procedentes de Bauru-SP.

<b>Animal</b>	<b>D.O</b>	<b>A/P</b>	<b>NE</b>	<b>Animal</b>	<b>D.O</b>	<b>A/P</b>	<b>NE</b>
<b>1</b>	0,038	-0,2523	0	<b>51</b>	0,0215	-0,3287	0
<b>2</b>	0,018	-0,3449	0	<b>52</b>	0,0345	-0,26852	0
<b>3</b>	0,0955	0,013889	0	<b>53</b>	0,0525	-0,18519	0
<b>4</b>	0,1295	0,171296	1	<b>54</b>	0,402	1,43287	8
<b>5</b>	0,1265	0,157407	1	<b>55</b>	0,0215	-0,3287	0
<b>6</b>	0,0955	0,013889	0	<b>56</b>	0,0425	-0,23148	0
<b>7</b>	0,1195	0,125	0	<b>57</b>	0,0485	-0,2037	0
<b>8</b>	0,1035	0,050926	0	<b>58</b>	0,027	-0,30324	0
<b>9</b>	0,0435	-0,22685	0	<b>59</b>	0,042	-0,2338	0
<b>10</b>	0,06	-0,15046	0	<b>60</b>	0,019	-0,34028	0
<b>11</b>	0,106	0,0625	0	<b>61</b>	0,045	-0,21991	0
<b>12</b>	0,11	0,081019	0	<b>62</b>	0,0735	-0,08796	0
<b>13</b>	0,0675	-0,11574	0	<b>63</b>	0,054	-0,17824	0
<b>14</b>	0,103	0,048611	0	<b>64</b>	0,246	0,71064	6
<b>15</b>	0,098	0,025463	0	<b>65</b>	0,005	-0,40509	0
<b>16</b>	0,087	-0,02546	0	<b>66</b>	0,0265	-0,30556	0
<b>17</b>	0,15	0,266204	3	<b>67</b>	0,184	0,4236	4
<b>18</b>	0,1315	0,180556	1	<b>68</b>	0,0425	-0,23148	0
<b>19</b>	0,087	-0,02546	0	<b>69</b>	0,0435	-0,22685	0
<b>20</b>	0,079	-0,0625	0	<b>70</b>	0,016	-0,35417	0
<b>21</b>	0,061	-0,14583	0	<b>71</b>	0,046	-0,21528	0
<b>22</b>	0,1165	0,111111	0	<b>72</b>	0,072	-0,09491	0
<b>23</b>	0,057	-0,16435	0	<b>73</b>	0,0595	-0,15278	0
<b>24</b>	0,051	-0,19213	0	<b>74</b>	0,036	-0,26157	0
<b>25</b>	0,0875	-0,02315	0	<b>75</b>	0,0295	-0,29167	0
<b>26</b>	0,1035	0,050926	0	<b>76</b>	0,0425	0,025921	0
<b>27</b>	0,0635	-0,13426	0	<b>77</b>	0,0225	-0,32407	0
<b>28</b>	0,0725	-0,09259	0	<b>78</b>	0,0525	-0,18519	0
<b>29</b>	0,0575	-0,16204	0	<b>79</b>	0,0695	-0,10648	0

<b>30</b>	0,05	-0,19676	0	<b>80</b>	0,033	-0,27546	0
<b>31</b>	0,068	-0,11343	0	<b>81</b>	0,017	-0,34954	0
<b>32</b>	0,053	-0,18287	0	<b>82</b>	0,022	-0,32639	0
<b>33</b>	0,114	0,099537	0	<b>83</b>	0,031	-0,28472	0
<b>34</b>	0,1125	0,092593	0	<b>84</b>	0,0115	-0,375	0
<b>35</b>	0,069	-0,1088	0	<b>85</b>	0,005	-0,40509	0
<b>36</b>	0,0365	-0,259	0	<b>86</b>	-	-0,43356	0
<b>37</b>	0,0955	0,013889	0	<b>87</b>	0,02725	-0,30208	0
<b>38</b>	0,0575	-0,16204	0	<b>88</b>	0,0755	-0,0787	0
<b>39</b>	0,0875	-0,02315	0	<b>89</b>	0,0285	-0,2963	0
<b>40</b>	-0,0095	-0,47222	0	<b>90</b>	0,0285	-0,2963	0
<b>41</b>	0,0585	-0,15741	0	<b>91</b>	0,0545	-0,17593	0
<b>42</b>	0,071	-0,09954	0	<b>92</b>	0,043	-0,22917	0
<b>43</b>	0,123	0,141204	0	<b>93</b>	0,032	-0,28009	0
<b>44</b>	0,039	-0,24769	0	<b>94</b>	0,0365	-0,25926	0
<b>45</b>	0,034	-0,27083	0	<b>95</b>	0,0125	-0,37037	0
<b>46</b>	0,027	-0,30324	0	<b>96</b>	0,0385	-0,25	0
<b>47</b>	0,0725	-0,09259	0	<b>97</b>	0,0305	-0,28704	0
<b>48</b>	0,2853	0,8935	7	<b>98</b>	0,0525	-0,18519	0
<b>49</b>	0,005	-0,40509	0	<b>99</b>	0,0275	-0,30093	0
<b>50</b>	0,0335	-0,27315	0	<b>100</b>	0,0145	-0,36111	0

Legenda:

D.O = densidade óptica

A/P = (média da amostra – média do positivo) / (média do positivo – média do negativo)

NE = nível ELISA

**Apêndice 7**

Valores dos Níveis ELISA (NE) em relação aos valores de absorbância na reação de ELISA indireto para *Leishmania infantum* em bovinos . Em destaque nível do ponto de corte

<b>Níveis</b>	<b>Intervalo</b>
<b>0</b>	0-0,055
<b>1</b>	0,056-0,074
<b>2</b>	0,075-0,099
<b>3</b>	0,100-0,153
<b>4</b>	0,154-0,179
<b>5</b>	0,180-0,241
<b>6</b>	0,242-0,325
<b>7</b>	0,326-0,438
<b>8</b>	0,439-0,591
<b>9</b>	0,592-0,797

## Apêndice 8

ELISA indireto com antígenos brutos de *Leishmania infantum* com soros dos bovinos procedentes de Bauru-SP.

<b>Animal</b>	<b>D.O</b>	<b>A/P</b>	<b>NE</b>	<b>Animal</b>	<b>D.O</b>	<b>A/P</b>	<b>NE</b>
<b>1</b>	0,017	-0,07531	0	<b>51</b>	0,038	0,020921	0
<b>2</b>	0,0175	-0,06485	0	<b>52</b>	0,015	-0,07531	0
<b>3</b>	0,018	-0,06276	0	<b>53</b>	0,016	-0,07113	0
<b>4</b>	3,96	16,43096	0	<b>54</b>	0,115	0,343096	6
<b>5</b>	0,058	0,104603	0	<b>55</b>	0,0245	-0,03556	0
<b>6</b>	5,96	24,79916	0	<b>56</b>	0,021	-0,05021	0
<b>7</b>	0,016	-0,07113	0	<b>57</b>	0,01	-0,09623	0
<b>8</b>	0,0115	-0,08996	0	<b>58</b>	0,0155	-0,07322	0
<b>9</b>	0,02	-0,05439	0	<b>59</b>	0,0115	-0,08996	0
<b>10</b>	-34	-142,397	0	<b>60</b>	0,0155	-0,07322	0
<b>11</b>	0,0295	-0,01464	0	<b>61</b>	0,017	-0,06695	0
<b>12</b>	0,0225	-0,04393	0	<b>62</b>	0,017	-0,06695	0
<b>13</b>	0,013	-0,08368	0	<b>63</b>	0,017	-0,06695	0
<b>14</b>	0,0115	-0,08996	0	<b>64</b>	0,372	1,418	9
<b>15</b>	0,0255	-0,03138	0	<b>65</b>	0,007	-0,10879	0
<b>16</b>	0,026	-0,02929	0	<b>66</b>	0,0165	-0,06904	0
<b>17</b>	0,037	0,016736	0	<b>67</b>	0,01	-0,09623	0
<b>18</b>	0,0505	0,073222	0	<b>68</b>	0,014	-0,0795	0
<b>19</b>	-25	-104,741	0	<b>69</b>	0,016	-0,07113	0
<b>20</b>	0,0145	-0,07741	0	<b>70</b>	0,0115	-0,08996	0
<b>21</b>	0,0205	-0,0523	0	<b>71</b>	0,0195	-0,05649	0
<b>22</b>	0,0335	0,002092	0	<b>72</b>	0,0205	-0,0523	0
<b>23</b>	0,017	-0,06695	0	<b>73</b>	0,023	-0,04184	0
<b>24</b>	0,0185	-0,06067	0	<b>74</b>	0,021	-0,05021	0
<b>25</b>	0,032	-0,00418	0	<b>75</b>	0,0195	-0,05649	0
<b>26</b>	0,0235	-0,03975	0	<b>76</b>	0,014	-0,0795	0
<b>27</b>	0,013	-0,08368	0	<b>77</b>	0,0205	-0,0523	0
<b>28</b>	0,0235	-0,03975	0	<b>78</b>	0,017	-0,06695	0
<b>29</b>	0,02	-0,05439	0	<b>79</b>	0,048	0,062762	0

<b>30</b>	-14	-58,7155	0	<b>80</b>	0,0265	-0,0272	0
<b>31</b>	0,033	0	0	<b>81</b>	0,0245	-0,03556	0
<b>32</b>	0,0605	0,115063	3	<b>82</b>	0,0365	0,014644	0
<b>33</b>	0,0195	-0,05649	0	<b>83</b>	0,002	-0,12971	0
<b>34</b>	0,031	-0,00837	0	<b>84</b>	0,0415	0,035565	0
<b>35</b>	0,0175	-0,06485	0	<b>85</b>	0,0265	-0,0272	0
<b>36</b>	35,9535	150,295	0	<b>86</b>	0,047	0,058577	0
<b>37</b>	0,005	-0,11715	0	<b>87</b>	0,0385	0,023013	0
<b>38</b>	0,095	0,259414	0	<b>88</b>	0,014	-0,0795	0
<b>39</b>	0,0215	-0,04812	0	<b>89</b>	0,031	-0,00837	0
<b>40</b>	0,007	-0,10879	0	<b>90</b>	0,0286	-0,01841	0
<b>41</b>	0,025	-0,03347	0	<b>91</b>	0,0355	0,01046	0
<b>42</b>	0,0245	-0,03556	0	<b>92</b>	0,0285	-0,01883	0
<b>43</b>	0,0095	-0,09833	0	<b>93</b>	0,0115	-0,08996	0
<b>44</b>	0,0135	-0,08159	0	<b>94</b>	0,049	0,066946	1
<b>45</b>	0,018	-0,06276	0	<b>95</b>	0,0275	-0,02301	0
<b>46</b>	0,013	-0,08368	0	<b>96</b>	0,035	0,008368	0
<b>47</b>	0,0245	0,0355	0	<b>97</b>	0,057	0,100418	3
<b>48</b>	0,019	-0,05858	0	<b>98</b>	0,034	0,004184	0
<b>49</b>	0,0035	-0,12343	0	<b>99</b>	0,0335	0,002092	0
<b>50</b>	0,023	-0,04184	0	<b>100</b>	0,0145	-0,07741	0

**Legenda:**

D.O = densidade óptica

A/P = (média da amostra – média do positivo) / (média do positivo – média do negativo)

NE = nível ELISA

**Apêndice 9**

Valores dos Níveis ELISA (NE) em relação aos valores de absorbância na reação de ELISA indireto para *Leishmania braziliensis* em equídeos . Em destaque nível do ponto de corte

<b>Níveis</b>	<b>Intervalo</b>
<b>0</b>	0 - 0,201
<b>1</b>	0,202-0,271
<b>2</b>	0,272-0,366
<b>3</b>	0,367-0,494
<b>4</b>	0,495-0,667
<b>5</b>	0,668-0,900
<b>6</b>	0,901-1,215
<b>7</b>	1,216-1,639
<b>8</b>	1,640-2,212
<b>9</b>	2,213- 2,986

## Apêndice 10

ELISA indireto com antígenos brutos de *Leishmania braziliensis* realizado com soros dos equídeos procedentes de Bauru-SP.

<b>Animal</b>	<b>D.O</b>	<b>A/P</b>	<b>NE</b>	<b>Animal2</b>	<b>D.O3</b>	<b>A/P4</b>	<b>NE5</b>
1	0,089	-0,192	0	51	0,308	0,749	5
2	0,047	-0,328	0	52	0,151	0,006	0
3	0,213	0,207	1	53	0,098	-0,165	0
4	0,043	-0,343	0	54	0,422	0,885	5
5	0,219	0,226	1	55	0,522	1,207	7
6	0,1	-0,156	0	56	0,087	-0,199	0
7	0,132	-0,055	0	57	0,085	-0,207	0
8	0,2155	0,215	1	58	0,084	-0,208	0
9	0,181	0,105	0	59	0,135	-0,045	0
10	0,058	-0,292	0	60	0,17	0,069	0
11	0,525	1,216	7	61	0,088	-0,195	0
12	0,132	-0,053	0	62	0,085	-0,207	0
13	0,222	0,236	1	63	0,141	-0,025	0
14	0,221	0,234	1	64	0,227	0,252	1
15	0,092	-0,184	0	65	0,255	0,344	2
16	0,316	0,542	4	66	0,078	-0,228	0
17	0,141	-0,025	0	67	0,132	-0,055	0
18	0,13	-0,059	0	68	0,4	0,812	5
19	0,156	0,022	0	69	0,156	0,022	0
20	0,317	0,543	4	70	0,19	0,132	0
21	0,301	0,493	3	71	0,077	-0,233	0
22	0,162	0,043	0	72	0,045	-0,334	0
23	0,232	0,27	1	73	0,063	-0,278	0
24	0,49	1,103	6	74	0,181	0,103	0
25	0,388	0,773	5	75	0,094	-0,176	0
26	0,135	-0,045	0	76	0,164	0,05	0
27	0,072	-0,249	0	77	0,098	-0,165	0
28	0,152	0,009	0	78	0,0915	-0,186	0

<b>29</b>	0,144	-0,014	0	79	0,364	0,695	5
<b>30</b>	0,114	-0,113	0	80	0,405	0,828	5
<b>31</b>	0,2275	0,254	1	81	0,088	-0,197	0
<b>32</b>	0,128	-0,067	0	82	0,4285	0,904	6
<b>33</b>	0,114	-0,111	0	83	0,098	-0,165	0
<b>34</b>	0,193	0,144	0	84	0,287	0,448	4
<b>35</b>	0,135	-0,045	0	85	0,134	-0,046	0
<b>36</b>	0,037	-0,362	0	86	0,473	1,048	6
<b>37</b>	0,256	0,346	2	87	0,1165	-0,105	0
<b>38</b>	0,191	0,137	0	88	0,126	-0,074	0
<b>39</b>	0,075	-0,239	0	89	0,087	-0,2	0
<b>40</b>	0,107	-0,135	0	90	0,281	0,428	3
<b>41</b>	0,154	0,017	0	91	0,1	-0,158	0
<b>42</b>	0,232	0,27	1	92	-0,0015	-0,487	0
<b>43</b>	0,176	0,087	0	93	-0,002	-0,488	0
<b>44</b>	0,075	-0,239	0	94	-0,005	-0,483	0
<b>45</b>	0,066	-0,268	0	95	0,198	0,16	0
<b>46</b>	0,509	1,166	6	96	0,133	-0,051	0
<b>47</b>	0,286	0,443	3	97	0,087	-0,2	0
<b>48</b>	0,003	-0,47	0	98	0,45	0,975	6
<b>49</b>	0,115	-0,108	0	99	-0,001	-0,487	0
<b>50</b>	0,1	-0,156	0	100	0,111	-0,121	0

Legenda:

D.O = densidade óptica

A/P = (média da amostra – média do positivo) / (média do positivo – média do negativo)

NE = nível ELISA

**Apêndice 11**

Valores dos Níveis ELISA (NE) em relação aos valores de absorvância na reação de ELISA indireto para *Leishmania infantum* para equídeos. Em destaque nível do ponto de corte.

<b>Níveis</b>	<b>Intervalo</b>
<b>0</b>	0-0,208
<b>1</b>	0,209- 0,280
<b>2</b>	0,281-0,378
<b>3</b>	0,379-0,510
<b>5</b>	0,689-0,928
<b>6</b>	0,929-1,252
<b>7</b>	1,253-1,690
<b>9</b>	2,281-3,079

## Apêndice 12

ELISA indireto com antígenos brutos de *Leishmania infantum* realizado com soros dos equídeos procedentes de Bauru-SP.

Animal	D.O	A/P	NE	Animal	D.O	A/P	NE
1	0,136	-0,037	0	51	0,702	1,564	7
2	0,1565	0,027	0	52	0,159	0,032	0
3	0,194	0,15	0	53	0,065	-0,234	0
4	0,053	-0,307	0	54	0,403	0,721	5
5	0,222	0,239	1	55	0,558	1,158	6
6	0,1285	-0,063	0	56	0,116	-0,0904	0
7	0,14	-0,025	0	57	0,137	-0,029	0
8	0,105	-0,139	0	58	0,114	-0,094	0
9	0,181	0,106	0	59	0,128	-0,056	0
10	0,098	-0,16	0	60	0,147	-0,002	0
11	0,22	0,233	1	61	0,0685	-0,224	0
12	0,271	0,398	3	62	0,094	-0,151	0
13	0,11	-0,121	0	63	0,132	-0,045	0
14	0,175	0,087	0	64	0,331	0,516	4
15	0,082	-0,213	0	65	0,226	0,221	0
16	0,113	-0,113	0	66	0,082	-0,185	0
17	0,144	-0,011	0	67	0,0995	-0,137	0
18	0,185	0,121	0	68	0,42	0,769	5
19	0,106	-0,134	0	69	0,122	-0,072	0
20	0,224	0,245	1	70	0,114	-0,094	0
21	0,3255	0,574	4	71	0,076	-0,201	0
22	0,151	0,097	0	72	0,063	-0,24	0
23	0,176	0,09	0	73	0,094	-0,152	0
24	0,47	1,042	6	74	0,117	-0,086	0
25	0,237	0,289	0	75	0,132	-0,045	0
26	0,184	0,118	0	76	0,134	-0,039	0
27	0,096	-0,166	0	77	0,19	0,12	0
28	0,156	0,025	0	78	0,211	0,177	0
29	0,143	-0,016	0	79	0,366	0,617	4
30	0,109	0,124	0	80	0,175	0,077	0
31	0,151	0,011	0	81	0,134	-0,039	0
32	0,162	0,045	0	82	0,334	0,525	4
33	0,104	-0,142	0	83	0,146	-0,004	0
34	0,154	0,019	0	84	0,294	0,413	3

35	0,0205	-0,412	0	85	0,12	-0,07	0
36	0,1105	-0,121	0	86	0,536	1,096	6
37	0,34	0,542	4	87	0,1	-0,135	0
38	0,334	0,526	4	88	0,075	-0,204	0
39	0,072	-0,213	0	89	0,174	0,074	0
40	0,2175	0,196	0	90	0,217	0,196	0
41	0,068	-0,225	0	91	0,159	0,031	0
42	0,131	-0,046	0	92	0,008	-0,394	0
43	0,174	0,074	0	93	0,007	-0,398	0
44	0,065	-0,233	0	94	0,007	-0,398	0
45	0,074	-0,209	0	95	0,086	-0,173	0
46	0,503	1,002	6	96	0,27	0,346	2
47	0,216	0,193	0	97	0,103	-0,125	0
48	0,321	0,488	3	98	0,048	-0,282	0
49	0,105	-0,12	0	99	0,007	-0,396	0
50	0,1045	-0,122	0	100	0,237	0,252	1

Legenda:

D.O = densidade óptica

A/P = (média da amostra – média do positivo) / (média do positivo – média do negativo)

NE = nível ELISA









## Apêndice 14

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) realizado com diferentes *primers*, em amostras de bovinos procedentes de Bauru-SP.

Animal	<b>PRIMERS</b>											
	<b>ITS1</b>				<b>ITS2</b>				<b>HSP70</b>			
	Sangue	Hemocultura	Ectoparasitos	Suabes	Sangue	Hemocultura	Ectoparasitos	Suabes	Sangue	Hemocultura	Ectoparasitos	Suabes
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	N	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N
9	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N







## Apêndice 15

Resultados gerais das provas diagnósticas para *Leishmania* spp. em equídeos procedentes de Bauru-SP

Animal	Provas Diagnósticas									
	Esfregaço	Hemocultura	RIFI		ELISA		PCR			
			<i>L.infantum</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.infantum</i>	<i>L.braziliensis</i>	Sangue	Hemocultura	Ectoparasitos	Suabes
1	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
2	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
3	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
4	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
5	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
6	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
7	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
8	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
9	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
10	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
11	N	N	NR	NR	NR	R	N	N	N	N
12	N	N	NR	NR	R	NR	N	N	N	N
13	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
14	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N

15	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
16	N	N	NR	NR	NR	R	N	N	N	N
17	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
18	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
19	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
20	N	N	160	160	NR	R	N	N	N	N
21	N	N	40	NR	R	R	N	N	N	N
22	N	N	NR	NR	NR	N	N	N	N	N
23	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
24	N	N	160	NR	R	R	N	N	N	N
25	N	N	NR	NR	NR	R	N	N	N	N
26	N	N	80	NR	NR	NR	N	N	N	N
27	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
28	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
29	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
30	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
31	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
32	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
33	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
34	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N

35	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
36	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
37	N	N	NR	NR	R	NR	N	N	N	N
38	N	N	40	NR	R	NR	N	N	N	N
39	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
40	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
41	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
42	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
43	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
44	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
45	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
46	N	N	NR	NR	R	R	N	N	N	N
47	N	N	NR	NR	NR	R	N	N	N	N
48	N	N	1/80	1/40	R	NR	N	N	N	N
49	N	N	1/40	NR	NR	NR	N	N	N	N
50	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
51	N	N	40	NR	R	R	P	N	N	N
52	N	N	80	NR	NR	NR	N	N	N	N
53	N	N	80	NR	NR	NR	N	N	N	N
54	N	N	NR	NR	R	R	N	N	N	N

55	N	N	NR	NR	R	R	N	N	N	N
56	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
57	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
58	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
59	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
60	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
61	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
62	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
63	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
64	N	N	NR	NR	R	NR	P	N	N	N
65	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
66	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
67	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
68	N	N	NR	NR	R	R	N	N	N	N
69	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
70	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
71	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
72	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
73	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
74	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N

75	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
76	N	N	80	NR	NR	NR	P	N	N	N
77	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
78	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
79	N	N	NR	NR	R	R	N	N	N	N
80	N	N	NR	NR	NR	R	N	N	N	N
81	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
82	N	N	NR	NR	R	R	N	N	N	N
83	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
84	N	N	NR	NR	R	R	N	N	N	N
85	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
86	N	N	NR	NR	R	R	N	N	N	N
87	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
88	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
89	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
90	N	N	NR	NR	NR	R	N	N	N	N
91	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
92	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
93	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
94	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N

95	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
96	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
97	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
98	N	N	NR	NR	NR	R	N	N	N	N
99	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
100	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N

**Legenda:** N=Negativo; NR= Não Reagente; R= Reagente; P=Positivo

## Apêndice 16

Resultados gerais das provas diagnósticas para *Leishmania* spp. em bovinos procedentes de Bauru-SP.

Animal	Provas Diagnósticas									
	Esfregaço	Hemocultura	RIFI		ELISA		PCR			
			<i>L.infantum</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.infantum</i>	<i>L.braziliensis</i>	sangue	hemocultura	ectoparasitos	suabes
1	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
2	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
3	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
4	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
5	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
6	N	N	80	NR	NR	NR	N	N	N	N
7	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
8	N	P	40	NR	NR	NR	P	P	N	N
9	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
10	N	N	80	NR	NR	NR	N	N	N	N
11	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
12	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
13	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
14	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
15	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
16	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
17	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
18	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
19	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
20	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N

21	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
22	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
23	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
24	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
25	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
26	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
27	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
28	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
29	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
30	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
31	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
32	N	N	NR	NR	R	NR	N	N	N	N
33	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
34	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
35	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
36	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
37	N	P	NR	NR	NR	NR	P	P	N	N
38	N	N	80	NR	NR	NR	N	N	N	N
39	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
40	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
41	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
42	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
43	N	N	N	NR	NR	NR	N	N	N	N
44	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
45	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
46	N	N	80	NR	NR	NR	N	N	N	N
47	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N

48	N	N	160	NR	NR	R	N	N	N	N
49	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
50	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
51	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
52	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
53	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
54	N	N	80	NR	R	R	N	N	N	N
55	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
56	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
57	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
58	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
59	N	N	160	NR	NR	NR	N	N	N	N
60	N	N	N	NR	NR	NR	N	N	N	N
61	N	N	80	NR	NR	NR	N	N	N	N
62	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
63	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
64	N	N	NR	NR	R	R	P	N	N	N
65	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
66	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
67	N	N	80	NR	NR	R	N	N	N	N
68	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
69	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
70	N	P	NR	NR	NR	NR	P	P	N	N
71	N	N	N	NR	NR	NR	N	N	N	N
72	N	N	N	NR	NR	NR	N	N	N	N
73	N	N	N	NR	NR	NR	P	N	N	N
74	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N

75	N	P	80	NR	NR	NR	P	P	N	N
76	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
77	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
78	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
79	N	N	80	NR	NR	NR	N	N	N	N
80	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
81	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
82	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
83	N	P	NR	NR	NR	NR	P	P	N	N
84	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
85	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
86	N	N	160	NR	NR	NR	N	N	N	N
87	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
88	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
89	N	P	NR	NR	NR	NR	P	P	N	N
90	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
91	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
92	N	P	80	NR	NR	NR	P	P	N	N
93	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
94	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
95	N	N	NR	NR	NR	NR	P	N	N	N
96	N	N	NR	NR	NR	NR	N	N	N	N
97	N	N	40	NR	R	NR	N	N	N	N
98	N	N	40	NR	NR	NR	N	N	N	N
99	N	N	N	NR	NR	NR	N	N	N	N
100	N	N	N	NR	NR	NR	N	N	N	N

**Legenda:** N=Negativo; P=Positivo; NR= Não Reagente; R= Reagente;P=Positivo