

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
BACHARELADO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**DETECÇÃO DE *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS EM PROPRIEDADES NO
MUNICÍPIO DE UNAÍ MG**

Matheus Ribeiro Coelho

Unaí/MG

2018

DETECÇÃO DE *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS EM PROPRIEDADES NO
MUNICÍPIO DE UNAÍ/MG

Matheus Ribeiro Coelho

Orientador:

Prof. Dr. Jenevaldo Barbosa da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Bacharelado de Ciências Agrárias, como
parte dos requisitos exigidos para a
conclusão do curso.

APROVADO em 03/11/13


Prof. Dr. Jeanne Broch Siqueira - UFVJM


Prof. Dr. Débora Ribeiro Orlando - UFVJM


Prof. Dr. Jenevaldo Barbosa da Silva - UFVJM

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar me proporcionando a conclusão de mais uma etapa da minha vida acadêmica.

Aos meus pais e familiares, por todo carinho, dedicação e educação, que me forneceram durante a vida.

Ao meu orientador, Jenevaldo Barbosa da Silva, pela orientação na elaboração desta monografia.

Aos integrantes do Laboratório Multidisciplinar de Ciências Básicas I do Instituto de Ciências Agrárias-ICA/UFVJM, que me auxiliaram na coleta das amostras e posteriormente no processamento.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Unaí pela infraestrutura necessária para realização do presente trabalho incluindo todos os profissionais multidisciplinares do ICA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. <i>Trypanosoma vivax</i>	9
2.2. Ciclo biológico <i>Trypanosoma vivax</i>	10
2.3. Forma de Transmissão.....	10
2.4. Epidemiologia.....	11
2.5. Alterações clínicas	12
2.6. Alterações hematológicas	13
2.7. Alterações histopatológicas	13
2.8. Métodos de diagnósticos	14
3. MATERIAL E MÉTODO	14
3.1. Conselho de Ética no Uso de Animais	14
3.2. Propriedades	15
3.3. Processamento amostral	16
3.4. Esfregaço em camada delgada.....	17
3.5. Esfregaço Gota Espessa.....	18
3.6. Microhematócrito - Técnica de Woo.....	18
3.7. Hematócrito	18
3.8. Proteína Plasmática Total (PPT)	18
3.9. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	18
3.10. Ensaio de Imunofluorescência Indireto (ELISA)	19
3.11.Reações de PCR LAMP	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERÊNCIAS	28

RESUMO

A tripanossomíase é uma das mais graves enfermidades dos bovinos, sendo causada por *T. vivax* e transmitida, ciclicamente, por moscas do gênero *Glossina*. Essa enfermidade foi primeiramente detectada no continente africano, já na América, foi introduzida em meados do século XIX por colonizadores europeus, sendo transmitida unicamente de forma mecânica por dípteros hematófagos e fômites. No Brasil, a enfermidade tem ocorrido com vasta periodicidade, tem sido relatado em bovinos do Maranhão, Tocantins, Paraíba, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco e Goiás. Objetivou-se com este estudo realizar a detecção de *T. vivax* em bovinos provenientes de propriedades leiteiras do município de Unaí, Região Noroeste de Minas Gerais, Brasil. *Trypanosoma vivax* é considerado endêmico no estado de Minas Gerais, a enfermidade já foi detectada em regiões próximas ao município de Unaí e diversos produtores relataram animais com sinais clínicos condizentes com a doença. Foram selecionados 40 bovinos de duas propriedades que relataram queda na produção leiteira, animais magros e mortalidade sem diagnóstico conclusivo. O hematócrito médio dos animais da propriedade 01 foi de 25,61% com variância de 19 - 29, já na propriedade 02 o hematócrito médio foi de 27,11% com variância de 11 - 37. A Proteína Plasmática Total (PPT) média na propriedade 01 foi de 7,73% com variância de 6 - 8,9, já na propriedade 02 a PPT média foi de 8,04% com variância de 6,2 - 10,2. A detecção parasitológica de *T. vivax* mostrou-se negativa pelas técnicas de esfregaço sanguíneos, gota espessa e técnica de Woo em ambas as propriedades. Nos exames sorológicos, os animais das duas propriedades mostraram-se negativos no ELISA, porém, dois animais, sendo um de cada propriedade, apresentaram positividade na diluição 1:40 no RIFI. Posteriormente os dois animais apresentaram negativas para PCR LAMP. Não foi detectada a presença de *T. vivax* por técnicas parasitológica, sorológicas e moleculares, nos rebanhos estudados.

Palavra-Chave: Animais ungulados, Soropositivo, ELISA, RIFI, PCR LAMP, Unaí.

ABSTRACT

Trypanosomiasis is one of the most serious bovine diseases, being caused by *T. vivax* and transmitted, cyclically, by flies of the *Glossina* genus. This disease was first detected in the African continent. In America, it was introduced in the mid-nineteenth century by European colonizers, and was transmitted only mechanically by hematophagous dipterans and fomites. In Brazil, the disease has occurred with a large periodicity, been reported in cattle from Maranhão, Tocantins, Paraíba, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco and Goiás. The objective of this study was to detect *T. vivax* in cattle from dairy farms in the city of Unaí, in the Northwest Region of Minas Gerais, Brazil. *Trypanosomavivax* is considered endemic in the state of Minas Gerais, the disease has been already detected in regions near the city of Unaí and several producers have reported animals with clinical signs that are consistent with the disease. We selected 40 cattle from two farms that reported a decline in milk production, lean animals and mortality without a conclusive diagnosis. The mean hematocrit of animals from property 01 was 25.61% with variance of 19-29, while at property 02 the mean hematocrit was 27.11% with variance of 11-37. Mean Total Plasma Protein (PPT) at property 01 was 7.73% with variance of 6 - 8.9, while in property 02 the average PPT was 8.04% with a variance of 6.2 - 10.2. The parasitological detection of *T. vivax* was negative by blood smear, thick gout and Woo technique in both properties. In the serological tests, the animals of the two properties were ELISA negative, however, two animals, one of each property, were positive at 1:40 dilution in the RIFI. Subsequently the two animals presented negative for PCR LAMP. The presence of *T. vivax* was not detected by parasitological, serological and molecular techniques in the herds studied.

Key words: Hoofed animals, Seropositive, ELISA, RIFI, PCR LAMP, Unaí.

1. INTRODUÇÃO

As tripanossomíases são causadas por protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae*, onde as espécies do gênero são divididas em duas seções: Stercoraria, onde o vetor deposita as formas infectantes junto com suas fezes no local da picada. A segunda, seção Salivaria, onde sua transmissão se dá por meio da saliva de moscas hematófagas (Hoare, 1972; Gardiner, 1989). Os tripanosomatídeos são parasitas hemoflagelados que acometem tanto os seres humanos quanto os animais (Hoare, 1972). Na África *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* acarretam a doença do sono no homem, ao passo que o *T. brucei*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi*, acarretam importantes prejuízos no rebanho bovino e equino. Dentre esses, *T. vivax* é responsável por maior potencial de perdas econômicas na bovinocultura na África, Ásia, Américas Central e do Sul. (Hoare, 1972).

Segundo Silva et al. (2002) a tripanossomíase bovina causada por *T. vivax* teve seu princípio no continente africano, sendo transmitida ciclicamente por moscas do gênero *Glossina* (tsé-tsé). Já na América, foi introduzida em meados do Século XIX por colonizadores europeus. Porém, visto que nesta região não circula a mosca tsé-tsé, a transmissão é exercida mecanicamente por tabanídeos e *Stomoxys calcitrans* (Serra-freire; Rezende, 1988; Paiva et al., 2000; Cadioli et al., 2012), ou de forma iatrogênica por fômites contaminados (Silva et al., 1997; Cadioli et al., 2012).

No Brasil, infecções por *T. vivax* têm ocorrido com vasta periodicidade, sendo descritos inicialmente surtos em bubalinos no Estado do Pará em 1972 (Shaw; Laison, 1972), posteriormente incidindo em bovinos na Amazônia (Pereira; Abreu, 1978) e reincidência na mesma região, segundo documentado em Serra-Freire (1981); posteriormente relatado em bovinos do Amapá, Mato Grosso (Silva et al., 1996). Nas últimas duas décadas foram observados surtos por *T. vivax* em bovinos do Maranhão (Feitosa et al., 2004); Tocantins (Linhares et al., 2006); Paraíba (Batista et al., 2007); Minas Gerais (Carvalho et al., 2008; Cuglovici et al., 2010); Rio Grande do Sul (Silva et al., 2009); São Paulo (Cadioli et al., 2012); Pernambuco (Pimentel et al., 2012; Guerra, 2013) e Goiás (Bastos et al., 2017).

É de grande dificuldade determinar as perdas econômicas causadas pelo *T. Vivax* devido a ocorrência simultânea com outros agentes nos animais (Clarkson, 1976). Por ser considerada uma doença enzoótica em algumas regiões, o impacto causado pela

tripanossomíase tem sido extenso, principalmente no que diz respeito à queda na produção e perda de animais (Paiva et al., 2000; Carvalho et al., 2008). No Brasil, Seidl, et al. (1999) estimaram que o custo com a enfermidade causada pelo *T. vivax* em rebanhos bovinos alcançaria cifras perto de US\$ 14,65 por animal ou 4% do valor estabelecido do rebanho. Adicionalmente, estes mesmos autores observaram que em rebanhos sem o tratamento os custos aumentam em até 17% do valor total do rebanho.

Segundo Batista et al. (2008); Cadioli et al. (2012), o diagnóstico de *T. vivax* não consta como tarefa simples para o profissional da Medicina Veterinária, pelo fato do parasito fomentar sintomas pouco específicos, tais como diarreia, lacrimejamento, letargia, perda de apetite, fraqueza, febre, anemia, podendo evoluir para morte (Silva et al., 1997), o que também tem sido comum no diagnóstico de outras doenças parasitárias e bacterianas. Conforme os métodos para realização do diagnóstico desta enfermidade podemos enfatizar o parasitológico, sorológico e moleculares (Silva et al., 1999; Radostits, 2000; Madruga et al., 1999). O método parasitológico é exercido pelo esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa e a técnicas de concentração em tubo de microhematócrito (Silva et al., 1999). Os testes sorológicos utilizados são o Ensaio de Imunoadsorção Enzimático (ELISA), a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Teste de Aglutinação em Cartão (Silva et al., 2002), onde apresenta uma maior sensibilidade ao se comparar com os parasitológicos. Já o método molecular destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) onde representa a presença do DNA de *T. vivax* (Clausen et al., 1998).

Com base nestes relatos podemos observar que nas ultimas décadas o *T. vivax* é considerado um patógeno com grande incidência em ruminantes em diversas regiões geográficas do Brasil. O município de Unaí localiza-se em uma área circundadas por diversas cidades com diagnostico confirmatório da ocorrência da enfermidade e relatos de produtores da região de animais com sinais clínicos condizentes com a infecção por *T. vivax*. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi realizar a detecção de *T. vivax* em bovinos de propriedades do município de Unaí, Região Noroeste de Minas Gerais, Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Trypanosoma vivax*

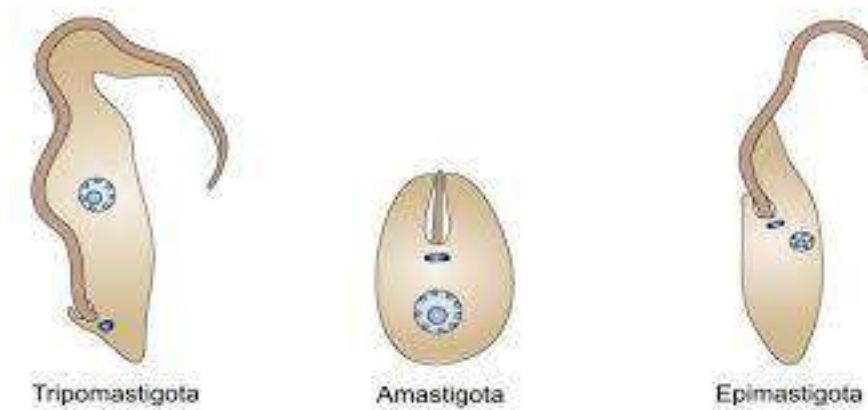
Trypanosoma vivax pertence ao filo *Euglenozoa* classe *Zoomastigophora*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Dutonella*.

O flagelo surge próximo ao cinetoplasto e emerge ao lado do corpo para correr ao longo da membrana ondulante. O comprimento desse flagelo varia entre 21 a 25,4 µm, possuem como principal característica a presença de cinetoplasto localizado na base do flagelo contendo o DNA mitocondrial (Vickerman, 1976).

Ao corte transversal apresenta-se elíptico ou oval e suas extremidades são afiladas. Este se evidencia com um protozoário pleomórfico, onde sua multiplicação é por fissão binária (Uilenberg; Boyt, 1998).

Segundo Wallace (1966), os *Trypanosomas* se desenvolvem em grande diversidade de formas como amastigota, epimastigota e tripomastigota, sendo estabelecidas de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo onde podem ser distinguidos pelas etapas dos ciclos de vida de seus hospedeiros. A forma amastigota é representada por formas arredondadas ou alongada, núcleo desenvolvido, cinetoplasto próximo ao núcleo e sem flagelo livre. As formas epimastigotas possuem um flagelo livre e uma membrana ondulante pouco desenvolvida que corre toda sua extensão (Thompson et al, 1992). As tripomastigotas, são representados por formas alongadas com cinetoplasto pós nuclear, onde o flagelo surge próximo ao cinetoplasto e emerge ao lado do corpo para correr ao longo da membrana ondulante.

Entre as principais particularidades da tripanossomose, destaca-se a variação antigênica das glicoproteínas variantes de superfície (GVS) o que pode contribuir para a flutuação nos níveis parasitêmicos (Jackson et al., 2012; Cross, 2003). As GVS são glicoproteínas que revestem o *T. vivax*, possuindo papel na evasão do sistema imunológico do hospedeiro (Vincendeau & Bouteille, 2006). Por tanto, a variação antigênica leva a uma constante produção de resposta imune, estendendo-se por toda a fase de infecção crônica (Turner, 1997; Jackson et al., 2012;).



Adaptado de Docampo et al., 2005.

2.2. Ciclo biológico *Trypanosoma vivax*

De acordo com Silva et al. (2002), este parasita é digenético, no ciclo é indispensável a presença de hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os animais vertebrados são considerados hospedeiros definitivos, em contrapartida diversos invertebrados são classificados hospedeiros intermediários. No continente africano o ciclo ocorre de forma biológica, sendo necessária a realização de parte do ciclo no vetor, porém na América do Sul o ciclo ocorre de forma mecânica por dípteros hematófagos e seringas para aplicação de ocitocina.

Trypanosoma vivax é encontrado na corrente sanguínea pela forma tripomastigota, onde são ingeridas pelo hospedeiro invertebrado, as moscas tse-tse, localizando-se primeiramente no esôfago e faringe (Moloo & Gray, 1989), transfigurando em formas epimastigotas. Ocorre uma migração das formas epimastigotas para o canal alimentar, logo após 24 horas multiplicando-se demasiadamente, direcionando para as paredes do labro, ocorrendo a migração da forma epimastigotas em direção à hipofaringe, onde se transformam em tripomastigotas, forma infectante para o hospedeiro vertebrado (Silva et al., 2002). A forma tripomastigotas são inoculadas nos hospedeiros vertebrados pela picada das moscas hematófagas e objetos inanimados (Gardiner, 1989; & Silva et al. 2002). O desenvolvimento nos mamíferos é iniciado pela inoculação da forma tripomastigota metaíclica pelo hospedeiro invertebrado Silva 2002.

2.3. Forma de Transmissão

No continente africano, *T. vivax* é transmitido pela *Glossina* sp. (mosca tsé-tsé) de forma cíclica (Levine, 1973). Já na América do Sul a principal forma de transmissão

é mecânica através de dípteros hematófagos (Paiva et al, 2000; Silva et al, 1997). Sendo exercida por *Stomoxys calcitrans* (mosca dos estábulos), Tabanídeos (mutucas), por meio das suas peças bucais no momento que fazem o repasto sanguíneo nos animais (Paiva, 2009), ou de forma iatrogênica por fômites (Cadioli et al., 2012), como compartilhamento de agulhas para administração de fármacos e vacinas.

Mosca do gênero *Glossina*



Fonte: www.remadiodaterra.com

Tabanídeos (mutucas)



Fonte: cachorosblogs.blogspot.com

Stomoxys calcitrans



Fonte: www.stab.org.br

Forma iatrogênica



Fonte: Revista Balde Branco

2.4. Epidemiologia

Trypanosoma vivax teve sua origem na África, onde disseminou-se pela América do Sul e América Central (Stephen, 1986). No continente de origem a tripanossomíase é conhecida com "nagana" ou "secadeira" (Gardiner, 1989). Segundo Gardiner (1989) a tripanossomíase atinge animais ungulados, onde se inclui bovinos, caprinos, ovinos, equinos, búfalos e uma grande variedade de espécies de antílopes selvagens.

A enfermidade dispõe de alta morbidade e letalidade, sendo observado principalmente quando há um contato inicial entre o parasito e o hospedeiro. É de suma importância, salientar que em alguns animais, não há caracterização clínica da doença (Madrug, 2009), sendo portadores assintomáticos, possuindo habilidade de controlar os níveis de parasitemia, por tanto não há necessidade de efetuar uso de fármacos (Murray & Teail, 1984; Kemp & Teale, 1998; Black et al., 2001).

A epidemiologia da tripanossomíase bovina pode ser mudada ao longo do tempo, pelas alterações do ambiente e mudanças do manejo das propriedades (Batista, 2008). Através de investigações epidemiológicas, pode-se notar um aumento dos casos relacionados a transmissão iatrogênica, de preferência em rebanhos leiteiros, a mesma é potencializada pelo uso inadequado da ocitocina na ordenha, na maioria das propriedades o uso é em numerosos animais com utilização de mesma agulha, sem antissepsia adequada (CIEP).

Guedes Júnior et al. (2008) observaram prevalência de 83% a 96,7% para *T.vivax* em bovinos no estado do Pará, já no estado de Minas Gerais, principalmente no

sul do estado, em um estudo com 400 bovinos, a prevalência para *T.vivax* média foi de 9,9% (6,7% - 13,1%). No município de Patos de Minas, foram avaliadas 101 amostras de soro sanguíneo de bovinos, onde 63% (64/101) foram reagentes para anticorpos contra o *T. vivax* (Germano et al., 2017). De maneira geral, ainda são necessários estudos sobre a epidemiologia de *T. vivax*, sua distribuição, prevalência, incidência, a partir deste avaliar seu impacto econômico na pecuária leiteira.

2.5. Alterações clínicas

Dentre os principais sinais clínicos observado em animais acometidos com *T. vivax*, estão a perda progressiva de peso, tendo como consequência perda da produção leiteira, anemia, queda da fertilidade, aborto (Delafosse et al., 2006). Adicionalmente, os animais podem apresentar febre, letargia, fraqueza, diarreia e conjuntivite (Silva et al., 2009; Cadioli et al., 2012).

De acordo com Silva et al. (1999); Pimentel et al. (2012) a tripanossomíase pode causar aborto no terço final da gestação ou nascimentos prematuros. Além disso, pode ocorrer mortalidade no periparto e uma prorrogação do retorno da atividade ovariana (Okech et al., 1996). Em touros, pode-se observar lesões no testículo e epidídimo, onde em casos crônicos leva à séria infertilidade, podendo culminar com esterilidade (Sekoni et al., 1990; Adamu et al., 2007). Macroscopicamente, o testículo pode apresentar consistência flácida e coloração pálida e histopatológicas, pode apresentar degeneração moderada caracterizada pela redução de células da linhagem germinativa e diminuição da altura do epitélio seminífero, estando relacionadas a processos patológicos generalizados (Nascimento & Santos, 2003).

De acordo com Batista et al. (2008) a forma neurológica central, que ocorre na África, causada por tripanosomas salivários deve ser também considerada como uma importante manifestação da enfermidade nas Américas. Na ocorrência de meningoencefalite, a permeabilidade seletiva da barreira hematoencefálica protege o tripanossomo da ação das drogas (Lejon & Buscher, 2005). Dentre os sinais neurológicos descritos, incoordenação motora, tremores musculares, estrabismo, cegueira, opistótono, dismetria e ataxia são mais frequentes (Batista et al., 2007; Cadioli et al., 2012).

2.6. Alterações hematológicas

Segundo Fikru et al. (2012) dentre as alterações causadas pelo *T. vivax* podemos destacar a anemia como uma característica patológica de fundamental importância, desencadeando eventos como fagocitose por macrófagos de células como eritrócitos, plaquetas (Gardiner, 1989; Osorio et al., 2008) e hemólise intravascular imunomediada (Andrianarivo et al., 1995). Anosa & Isoun (1980) observaram no hemograma redução do volume globular (VG) e hemoglobina (Hb), onde a anemia, à princípio, é macrocítica e em um segundo momento se torna microcítica, podendo ou não ser acompanhada de reticulocitose.

O processo anemiante causado por *T. vivax* pode resultar de vários fatores, como a produção de um fator hemolítico (Igbokwe, 1994); o efeito direto dos tripanossomos sobre as hemácias, adesão de antígenos dos tripanossomos ou deposição de imunocomplexos na superfície das hemácias (Williams et al., 1992), diminuição da eritropoetina pela hemopoese insuficiente (Fiennes, 1954), aumento de citosinas IL-1 e IL-6, TNF α e interferon gama.

A leucopenia em casos graves de anemia ocorre com normalidade na fase inicial da enfermidade em contrapartida a leucocitose tem caráter predominante em bovinos naturalmente infectados pelo aumento de linfócitos (Cadioli et al., 2012). Há considerações de que a leucopenia possui relação com a imunossupressão e que este protozoário acarreta nos animais infectados (Jain, 1986).

2.7. Alterações histopatológicas

Moraes (2001) & Batista et al. (2008) observaram em bovinos experimentalmente infectados com *T. vivax* lesões como hepatite, pneumonia focais, nefrite, edema nos rins, hiperplasia de folículo linfóide e adrenais, hiperplasia de polpa branca com necrose multifocais.

Batista et al. (2007) observou que animais infectados apresentam tripanossomos na corrente sanguínea sendo seguida de migração extra vascular, assumindo notável papel no esclarecimento de lesões em diversos sistemas. Assim, pode-se destacar as lesões inflamatórias e degenerativas no coração (Masake, 1980), no sistema nervoso (Batista et al., 2007; Whitelaw et al., 1988) e nos ovários (Rodrigues et al., 2013). No sistema nervoso central de animais infectados por *T. vivax* ocorrem meningite e mielite com manguitos perivasculares com predomínio de células

mononucleares, onde podem estar associados à presença de malácia (Batisat et al., 2007; Almeida et al., 2010).

2.8. Métodos de diagnósticos

Dentre os métodos para realizar o diagnóstico da infecção por *T. vivax*, podemos destacar o parasitológico, sorológicos e moleculares (Silva et al., 1999; Radostits, 2000; Madruga et al., 1999). Os métodos parasitológicos se destacam para o diagnóstico do *T. vivax* no Brasil (Madruga, 2004). A partir de amostras de sangue, linfonodos, líquido, secreções genitais e órgãos (Desquesnes, 2004) são confeccionados esfregaços corados pelo Giemsa (Silva et al., 1999). Assim, *T. vivax* é diferenciado pelo tamanho, posição do núcleo e do cinetoplasto (Silva et al., 2002). Dentre as técnicas parasitológicas, tem grande relevância a concentração em tubo de microhematócrito, onde pode ser observado as formas tripomastigotas (Woo, 1970; Rebeski et al., 1999).

Entre os testes sorológicos mais utilizados ressalta se o Ensaio de Imunoadsorção Enzimático (ELISA), a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Teste de Aglutinação em Cartão (Silva et al., 2002). Os métodos sorológicos apresentam maior sensibilidade em comparação com os parasitológicos, estes indicam um contato prévio entre o hospedeiro e o parasito, no entanto, não permitem indicar se há infecção ou se o animal respondeu ao tratamento (Nantulya, 1990).

Dentre os métodos moleculares, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Clausen et al., 1998), PCR em tempo real (Knowles Junior & Li; Pastoret, 2008) e a amplificação circular isotérmica (LAMP), (Kuboki et al., 2003; Laohasinnarong et al., 2011) representando ótimos indicadores da presença do DNA de *T. vivax* no sangue dos bovinos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Conselho de Ética no Uso de Animais

O presente estudo encontra-se dentro do projeto “Detecção de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* e *Trypanosoma vivax* em bovinos da Região Noroeste de Minas Gerais, Brasil” foi submetido ao Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e encontra-se de acordo com os preceitos e normas do Conselho Nacional de

Experimentação Animal (CONSEA), sendo assim aprovado sob o protocolo N° 060/2016.

3.2. Propriedades e Animais experimentais

Foram selecionados duas propriedades que apresentaram animais com sinais clínicos condizentes com a enfermidade, sendo selecionados 20 animais de cada propriedade. Ambas as propriedades localizadas no município de Unaí, na mesorregião do Noroeste de Minas Gerais, Brasil.

A primeira propriedade se caracteriza por possuir animais Holandes e Girolando, sendo mantidos a pasto, recebem concentrado no momento do ordenha, os bezerros são criados em sistema coletivo, onde todos animais da propriedade possui um calendário de vacinação para Febre Aftosa e Brucelose. (Figura.1 A e B).

A segunda propriedade é caracterizada por uma criação intensiva, os animais são manejados em confinamento "*free stall*" contando com animais em seu predomínio Holandes, os bezerros são criados em sistema coletivo, onde todos animais da propriedade possui calendário de vacinação para Febre Aftosa, Brucelose e Carbúnculo (Figura.1 C e D).



Figura 1. Fazenda leiteira localizada no município de Unaí, Minas Gerais. **A** - vacas mantidas em área recreativa em fazenda de sistema semi intensivo; **B** - bezerros lactentes mantidos em sistema coletivo ao ar livre; **C** - vacas em pista de trato coberta se alimentando de silagem de milho; **D** - bezerros lactentes mantidos em área coberta.

3.3. Processamento amostral

As 40 amostras foram obtidas através de venopunção da veia jugular externa e/ou veia cocigeana, em tubos com anticoagulante EDTA e sem anticoagulante e, posteriormente encaminhadas para o Laboratório Multidisciplinar de Ciências Básicas I do Instituto de Ciências Agrárias - ICA/UFVJM. Inicialmente as amostras foram alíquotadas em tubos tipo *ependorf* realizados os exames de esfregaço em camada delgada, esfregaço em gota espessa, microhematócrito (Técnica de Woo), Hematócrito, Proteína Plasmática Total (PPT).

As amostras de sangue sem EDTA foram centrifugadas por 10 min a 1500 rpm para obtenção do soro. Posteriormente as amostras de soro e sangue foram divididas em alíquotas de 1,0 mL, identificadas e mantidas congeladas a - 20°C. Essas amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV/UNESP), onde foram submetidas a Reação de Imunofluorescência Indireta

(RIFI) para detecção de anticorpos anti *T. vivax* e Ensaio de Imunoadsorção Enzimático Indireto (ELISA) e As amostras positivas na sorologia foram posteriormente testadas na Reação de Cadeia Polimerase (PCR Lamp).

3.4. Esfregaço em camada delgada

Foram utilizado lâminas de vidro limpas e desengorduradas onde foi colocada 7µl de sangue próximo de uma das extremidades. Com auxílio de outra lâmina e colocada adiante da gota em um ângulo de 45°, sendo feito o espalhado. Em seguida a lâmina foi mergulhadas no álcool metílico por 4 minutos, em seguida coradas por 45 minutos com solução de Giemsa e lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante. Por fim, as lâminas foram lidas em microscópio óptico (Labormed) na objetiva de 100 vezes com óleo de imersão. (Figura.2).



Figura 2. A - colheita de sangue pela veia coccígea com tubo a vácuo contendo anticoagulante EDTA; B e C - confecção de microhematócrito e esfregaço sanguíneo; D - tubo de microhematócrito após centrifugação pré leitura; E e F - leitura de microhematócrito e esfregaço corado com Giemsa.

3.5. Esfregaço Gota Espessa

Em uma lâmina, foi colocado 7µl de sangue adicionando uma lâminula em cima da gota e com este processo faz com que se espalhe o sangue. Posteriormente foi realizada a leitura em microscópio óptico em uma objetiva de 10 e 40 vezes.

3.6. Microhematócrito - Técnica de Woo

Para análise do microhematócrito (Técnica de Woo) tubos capilares foram preenchidos três quartos com sangue. Posteriormente FORAM centrifugados por cinco minutos e a leitura é realizada em microscópio óptico MARCA(Labormed). Os tripanosomatídeos são visualizados, quando presentes, na região acima da camada leucocitária.

3.7. Hematócrito

Os tubos de microhematócritos foram preenchidos de sangue com aproximadamente três quartos da sua capacidade, em seguida uma das extremidades foi vedada pelo calor no bico de Bunsen. Posteriormente os tubos foram centrifugados (NT810 Novatecnica) a 10.000 rpm por 5 minutos QUAL CENTRIFUGA. Por fim, as leituras foram realizadas com o cartão especial para leitura de hematócrito.

3.8. Proteína Plasmática Total (PPT)

A concentração plasmática de proteínas totais foi determinada por refratometria (Jain, 2000). Após a centrifugação para o hematócrito, o capilar é quebrado acima da porção de leucócitos e plaquetas, o plasma é distribuído pelo prisma e colocado no refratômetro para a realização da leitura.

3.9. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

As lâminas foram descongeladas à temperatura ambiente por 15 minutos e em cada cavidade foram pipetadas as amostras de soro diluídas 1:40. Posteriormente, foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 35 minutos e a seguir, submetidas a três lavagens por imersão, cinco minutos cada, em solução salina tamponada, PBSc om pH 7,2 (1,3 M NaCl; 27 mM KCl; 56 mM Na₂HPO₄; 10 mM KH₂PO₄; 9,2 mM NaH₂PO₄).

Após secagem, as cavidades das lâminas foram recobertas com IgG de coelho anti-IgG bovino conjugada ao isotiocianato de fluoresceína e diluído 1:300 em solução de PBS, contendo azul de Evans 1 mg. Após adição do conjugado, as lâminas foram novamente incubadas a 37°C por 35 minutos e submetidas a três lavagens por imersão em PBS, durante cinco minutos cada, e à uma quarta lavagem de 30 segundos em água tridestilada. Após a secagem, as lâminas foram recobertas com glicerina tamponada na proporção 9:1 (glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5 M pH 9,6), seguida da montagem com lamínula. Logo após, as lâminas foram observadas em microscópio equipado para fluorescência (Olympus BX-FLA) (Aquino et al., 1999).

3.10. Ensaio de Imunofluorescência Indireto (ELISA)

Nas cavidades das microplacas de fundo plano (Nunc MaxiSorp®) foram adicionado 100 µL do antígeno diluído *T. vivax*, em tampão carbonato-bicarbonato de sódio (0,05 M pH 9,6). As placas foram encubadas por 12 horas em câmara úmida à 4°C e posteriormente, lavadas com PBS-Tween 20 (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20) por três vezes.

Após o bloqueio com tampão carbonato-bicarbonato de sódio foi adicionado as placas 6% de soro de coelho, sendo levadas a câmara úmida a 37°C por 90 minutos, e posteriormente lavadas. Os soros testes juntamente com os de referência positivos e negativos foram testados em duplicatas, diluídos a 1/50, onde a diluição foi determinada por meio de padronização em bloco, em PBS Tween 20 acrescido de 5% de soro normal de coelho, seguindo-se de nova incubação e lavagem. A cada cavidade foram adicionados 100 µL de conjugado, IgG de coelho anti-IgG de bovino acoplada à fosfatase alcalina (Sigma-A0793- 1 mL, Saint Louis, USA), diluído (1:30.000) em PBS Tween 20 acrescido de 5% de soro normal de coelho, seguindo-se nova incubação e lavagem. Posteriormente a esta etapa, foram adicionados 100 µL do substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato-PNPP diluído a 1 mg/mL em tampão dietanolamina com pH 9,8; Sigma, Saint Louis, EUA), sendo incubado a reação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este, a reação foi bloqueada pela adição de 25 µL de NaOH 3,0 M, onde foi feita a leitura da reação em um leitor de microplacas de ELISA (Microplate Reader MRX TC Plus, Dynex Technology, EUA), sob comprimento de onda de 405 nm, adotando como “branco” da reação a cavidade da microplaca que continha todos os elementos da reação com exceção do soro bovino.

3.11. Reações de PCR LAMP

A PCR foi realizada utilizando um conjunto de DNA com sequência do gene que codifica a enzima semelhante à catepsina I (CatL) de *T. vivax* (Cortez et al., 2009). A PCR foi realizada utilizando um volume de 50 µl, em triplicata, contendo 20 a 100 mg do genômica do DNA e uma concentração final de 100 pmol de cada primer, 200 mM de dNTP, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM de MgCl₂, 7,5% dimetilsulfóxido (DMSO), 0,1 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) e 2,5 unidades de DNA polimerase (Invitrogen, EUA). As reações foram conduzidas em um termociclador sob as condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação em 94°C por 1min, e um anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, com extensão final em 72°C por 10 minuto.

O LAMP foi realizado usando um conjunto de sequência de DNA de *T. vivax* (depósito número J03989) que havia sido testado anteriormente por Njiru et al. (2011). A reação de LAMP foi realizada em triplicado em volumes de reação de 25,0 µl, consistindo de 5 pmol dos primers externos, 20 pmol dos primers de loop, 40 pmol dos primers internos, 4 mM de extra MgSO₄, 1 M de betaína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 2,5 mM de trifosfato de desoxinucleotídeo mix (dNTP). O fragmento grande da DNA polimerase foi de 1µl (8 unidades), enquanto SYTO-9 corante de fluorescência a 1,5 M e 2,5µl de cada amostra foram usados para cada reação em tempo real. As reações foram conduzidas a 63°C por 60 minutos, utilizando um Cycler (BioRad).

A reação foi interrompida aumentando a temperatura para 80°C por 5 minutos. As curvas de fusão foram adquiridas com passos de 0,5°C, com intervalos de 5 segundos, de 63 a 96°C, para confirmar que o *T. vivax* LAMP amplificou o alvo correto. Os resultados foram lidos através da observação de curvas de amplificação usando o Software Bio-Rad CFX Manager. Produtos LAMP foram separados em Gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio e as imagens foram revelada no dispositivo do sistema de imagem ChemiDoc™ MP (Bio Rad, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na propriedade 01, foram analisados o hematócrito de dezoito animais, onde quatro animais (22,22%) apresentaram o hematócrito abaixo do parâmetro de

normalidade (24%) e os demais animais quatorze (77,77%) apresentaram acima do parâmetro de normalidade. Nesta propriedade, o valor mínimo do hematócrito foi de 19% e o máximo de 29%.

Na propriedade 02, foram analisados o hematócrito de dezenove animais, onde quatro animais (21,05%) apresentaram hematócrito abaixo do parâmetro de normalidade (24 %) e os outros quinze (78,95%) animais apresentaram acima do parâmetro de normalidade. Nesta propriedade, o valor do hematócrito mínimo foi de 11% e o máximo de 37%.

Segundo Kaneko, (1007); Meyer & Harvey (2004) a Proteína Plasmática Total (PPT) em bovinos apresenta abaixo do parâmetros de normalidade que é 7 e acima do parâmetro de normalidade 8,5. Na propriedade 01 foram analisados a Proteína Plasmática Total (PPT) de dezoito animais, onde quatro animais (22,22%) apresentaram abaixo do parâmetro de normalidade e quatro animais (22,22%) apresentaram acima do parâmetro de normalidade, os outros dez (55,55%) animais estão dentro dos parâmetros.

Na propriedade 02 foram analisados a Proteína Plasmática Total (PPT) de dezoito animais onde três animais (16,66%) apresentaram abaixo do parâmetro de normalidade e quatro animais (22,22%) apresentaram acima do parâmetro de normalidade, onde os outros onze animais (61,11%) estão dentro dos parâmetros.

Na detecção parasitológica direta para *T. vivax* mostrou-se negativa pelas técnicas de esfregaço sanguíneo, gota espessa e técnica de Woo em ambas propriedades.

Nos exames sorológicos, os animais das duas propriedades mostraram-se negativos no ELISA, porém, dois animais, sendo um de cada propriedade, apresentaram positividade na diluição 1:40 no RIFI (Tabela 01 e 02).

No exame molecular as duas propriedades apresentaram negativas para PCR LAMP.

Tabela 1. Propriedade 1, avaliação hematológica e detecção direta e indireta de *Trypanosoma vivax* em bovinos leiteiros do município de Unai, Região Noroeste de Minas Gerais, Brasil, 2018.

Amostra	Hematócrito	PPT	Esfregaço	Gota Espessa	Técnica de Woo	RIFI TITULAÇÃO 1: 40	ELISA P.C.:0,380	PCR LAMP
01	23	7,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,134	Negativo
02	25	8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,120	Negativo
03	24	8,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,197	Negativo
04	26	6,7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,253	Negativo
05	29	8,3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,133	Negativo
06	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,167	Negativo
07	27	8,4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,147	Negativo
08	29	8,7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,167	Negativo
09	23	7,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,223	Negativo
10	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,103	Negativo
11	26	8,9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,133	Negativo
12	29	8,9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,213	Negativo
13	19	6,6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,157	Negativo
14	25	7,2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,288	Negativo
15	25	6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,155	Negativo
16	25	8,8	Negativo	Negativo	Negativo	1:40	0,178	Negativo
17	23	7,5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,158	Negativo
18	25	7,9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,182	Negativo
19	29	8,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,199	Negativo
20	29	6,8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,224	Negativo

ELISA [PONTO DE CORTE = 0,380; CONTROLE POSITIVO = 1,610; CONTROLE NEGATIVO = 0,152]

Tabela 2. Propriedade 2, avaliação hematológica e detecção direta e indireta de *Trypanosoma vivax* em bovinos leiteiros do município de Unaí, Região Noroeste de Minas Gerais, Brasil, 2018.

Amostra	Hematócrito	PPT	Esfregaço	Gota Espessa	Técnica de Woo	RIFI TITULAÇÃO 1: 40	ELISA P.C.:0,380	PCR LAMP
01	34	9,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,243	Negativo
02	37	8,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,212	Negativo
03	31	8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,167	Negativo
04	26	8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,144	Negativo
05	28	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,134	Negativo
06	28	8,5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,265	Negativo
07	11	7,4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,284	Negativo
08	21	6,7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,165	Negativo
09	15	6,2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,149	Negativo
10	26	8,2	Negativo	Negativo	Negativo	1:40	0,175	Negativo
11	31	7,7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,253	Negativo
12	31	8,7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,122	Negativo
13	29	8,3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,211	Negativo
14	31	8,7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,209	Negativo
15	28	6,4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,173	Negativo
16	27	8,4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,274	Negativo
17	-	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,154	Negativo
18	23	8,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,259	Negativo
19	29	10,2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,253	Negativo
20	29	8,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,122	Negativo

ELISA [PONTO DE CORTE = 0,380; CONTROLE POSITIVO = 1,610; CONTROLE NEGATIVO = 0,152]

Estes resultados diferem dos achados realizados em estudos com bovinos do Tocantins (Linhares et al., 2006); Paraíba (Batista et al., 2007); Minas Gerais (Carvalho et al., 2008; Cuglovici et al., 2010); Rio Grande do Sul (Silva et al., 2009); São Paulo (Cadioli et al., 2012), Pernambuco (Pimentel et al., 2012; Guerra, 2013) e Goiás (Bastos et al., 2017).

No estado do Tocantins, o primeiro diagnóstico de *T. vivax* foi realizado em bovinos do município de Formosa do Araguaia, por Linhares et al. (2006). O surto ocorreu em um rebanho composto por 250 animais da raça Brahman recém introduzidos na propriedade e oriundos do estado de São Paulo. No alto sertão da Paraíba foi descrito dois surtos de *T. vivax* em duas propriedades de bovino leiteiro (Batista et al., 2007). O diagnóstico foi realizado por meio de esfregaço de capa leucocitária e mediante a PCR.

No município de Igarapé, em uma vaca apresentando perda da visão e anemia, foi confirmando o diagnóstico morfométrico, sendo assim relatado o primeiro caso de *T. vivax* no estado de Minas Gerais (Carvalho et al., 2008). Posteriormente no Sul do estado, foi feito um estudo com 400 animais, onde a prevalência para *T. vivax* foi de 9,9%. No município Patos de Minas, Região do Alto Paranaíba, foram avaliadas 101 amostras, as quais foram analisadas pelo teste sorológico da RIFI, onde 63% (64/101) amostras testadas, foram reagentes para anticorpos contra o *T. vivax* (Germano et al., 2017).

No município de São Pedro, Estado do Rio Grande do Sul, uma vaca apresentou sinais clínicos inespecíficos como hiporexia, hipertermia, fraqueza, desidratação, mucosas ictericas, secreção vaginal, agressividade, atrofia muscular dos membros pélvicos, incoordenação motora, dificuldade em levantar-se e manter-se em pé. Foi realizado o diagnóstico inicial baseado em análise morfológica de forma tripomastigotas e a confirmação foi realizada por meio da PCR. Assim, foi relatado o primeiro caso de *T. vivax* no Estado do Rio Grande do Sul (Silva et al., 2009).

No estado de São Paulo, foram avaliadas 12 amostras de 20 vacas oriundas do estado do Mato Grosso do Sul. Nesta propriedade, em um período de seis meses 100% das vacas soroconverteram (Cadioli et al. 2012).

No município de Itambé, estado de Pernambuco, ocorreu um surto de *T. vivax* em uma fazenda de gado leiteiro (Pimentel et al., 2012). Um total de 80 animais apresentaram sinais condizentes com a enfermidade. Coletou-se amostras de sangue de 22 animais e o diagnóstico foi realizado pelo PCR e confirmado pelo sequenciamento

genômico. Assim, 100% (22/22) dos animais apresentaram positividade para *Trypanosoma* spp. Posteriormente, Guerra (2013) realizou um estudo através de RIFI e PCR em um total de 2053 amostras de soro sanguíneo. Foram selecionados os municípios com maiores frequências de anticorpos e coletados 127 amostras de sangue para PCR. A sorologia mostra 13,93% (286/2053) reagentes para anticorpos IgG anti- *T. vivax* e 44,88 % (57/127) na PCR.

Na cidade de Ipameri, Estado de Goiás, foi relatado um surto de *T. vivax* pela introdução de 18 vacas Girolandas oriundo do Triângulo Mineiro, infectando 161 animais, sendo diagnosticado pelo método parasitológico (esfregaço sanguíneo) e PCR. Os autores concluíram que a infecção foi proveniente do compartilhamento de agulhas no momento da ordenha (Bastos et al.,2017).

Nos animais com suspeita clínica de infecção por *T. vivax* na região de Unaí, a perda de peso foi a manifestação mais comum. Porém, estudos anteriores relatam que a anemia é a manifestação mais frequente tanto em animais infectados natural ou experimentalmente por *T. vivax* (Silva et al., 1999; Paiva et al., 2000; Batista et al., 2006).

Os testes parasitológicos, tem mostrado baixa sensibilidade, com grande particularidade em animais na fase crônica, onde os mesmos apresentam baixas parasitemias (Masake et al., 1994; Rebeski et al., 1999). Por outro lado, os métodos sorológicos apresentam maior sensibilidade em comparação com os parasitológicos. Os métodos moleculares, como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pela amplificação circular isotérmica (LAMP), representa ótimos indicadores da presença do DNA de *T. vivax* pela sua alta sensibilidade. Em um estudo de Moraes, (2001) & Batista et al., (2008) os exames histopatológicos de bovinos experimentalmente infectados com *T. vivax* foram observadas lesões como hepatite, pneumonia focais, nefrite, edema nos rins, baço com hiperplasia de polpa branca com necrose multifocais, meningite e mielite.

O diagnóstico da tripanossomíase é dificultoso pelo fato da doença não apresentar sinais patognomônicos, onde os animais podem apresentar anemia, queda da produtividade, queda da fertilidade, aborto, febre, letargia, fraqueza, diarreia, conjuntivite, incoordenação motora, tremores musculares, estrabismo, cegueira, morte ou nenhum sinal aparente. Esses sinais podem ser confundidos com outras enfermidades relacionadas aos Sistemas Reprodutor (Leptospirose e Neosporose), Nervoso (Raiva, Herpes Vírus Tipo 5 e Polioencefalomalacia), Sistema Locomotor (Doenças podais),

Doenças anemiantes (Complexo Tristeza Parasitária Bovina) e Doenças Nutricionais (Hipocalcemia, Intoxicação por uréia, Intoxicação por plantas tóxicas), (Figura.3).



Figura 3. Animais com sinais clínicos condizentes com o *T. vivax* na Região Noroeste de Minas Gerais. **A** - animal diagnosticado com intoxicação por uréia; **B** - animal diagnosticado com Leucose Bovina; **C** - animal ainda sem diagnóstico; **D e E** - bezerro com anaplasmoze bovina; **F** - animal com problema podal.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo relata um possível surto de *Trypanosoma vivax* em duas propriedades no município de Unaí. Onde os animais, foram submetidos a diagnóstico parasitológicos, sorológicos e moleculares, apartir destes podemos concluir que o *T. vivax* não se encontra nos rebanhos estudados.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMU, S., FATIHU, M. Y., USEH, N. M., MAMMAN, M., SEKONI, V.O. & ESIEVO, K.A.N. Sequential testicular and epididymal damage in Zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, 143:29-34, 2007.
- ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; TEBALDI, J. H.; ALESSI, A. C.; MACHADO R. Z.; NASCIMENTO, A. A. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 11, n. 3, p. 669-676, 2010.
- ANDRIANARIVO, A. G.; MUYRA, P.; OPOLLO, M. M.; LOGAN-HENFREY, L. L. *Trypanosoma congolense*: comparative effects of primary infection on bone marrow progenitor cells from N'dama and Boran cattle. **Experimental Parasitology**. San Diego, v. 80, n. 3, p 407-418, 1995.
- AQUINO, L. P. C. T.; MACHADO, R. Z.; ALESSI, A. C. MARQUES, L. C.; CASTRO, M. B.; MALHEIROS, E. B. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 255-260, 1999.
- BASTOS, T. S.A.; FARIA, A. M.; MADRID, D. M. C.; BESSA, L. C.; LINHARES, G. F. C.; JUNIOR, O. L. F.; SAMPAIO, P. H.; CRUZ, B. C.; CRUVINEL, L. B.; NICARETTA, J. E.; MACHADO, R. Z.; COSTA, A. J.; LOPES, W. D. Z. Primeiro surto e casos subsequentes de *Trypanosoma vivax* no Estado de Goiás. **Brasil. Braz. J. Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 366-371, july-sept. 2017.
- BATISTA, J. S.; BEZERRA, F. S. B.; LIRA, R. A.; CARVALHO, J. R. G.; ROSADO NETO, A. M.; PETRI, A. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, p. 63-69, 2008.
- BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. G.; MADRUGA, C. R.; SIMÕES, S. D. V.; MAIA, T. F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 2, p. 174-181, 2007.
- BLACK, S. J.; SEED, J. R.; MURPHY, N. B. Innate and acquired resistance to African trypanosomiasis. **The Journal of Parasitology**. v. 87, n. 1-9, 2001.
- BORGES L.P.B., ALMEIDA A.P.A., TEIXEIRA P.P.M., MARIANO R.S.G., BARROS F.F.P.C. & PEREIRA L.F. Tripanossomíase bovina na região de Ibiraci/MG - relato de caso. **Revista Acadêmica Ciência Animal**. 15(Supl 2): S337-338, 2017.
- CADIOLI, F. A.; BARNABÉ, P. A.; MACHADO, R. Z.; TEIXEIRA, M. C. A.; ANDRÉ, M. R.; SAMPAIO, P. H.; FIDELIS JUNIOR, O. L.; TEIXEIRA, M. M. G.; MARQUES, L. C. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 118-124, 2012.

CARVALHO, A. U.; ABRÃO, D. C.; FACURY FILHO, E. J.; PAES, P. R. O.; RIBEIRO, M. F. B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 769-771, 2008.

CLARKSON, M. J. Trypanosomiasis of domesticated animals of South America. Seminar on Trypanosomiasis – Species of the subgenus and their potential usefulness. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 70, n. 2, p. 125-126, 1976.

CLAUSEN, P. H.; WIEMANN, A.; PATZELT, R.; KAKAIRE, D.; POETZSCH, C.; PEREGRINE, A.; MEHLITZ, D. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. In naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. **Annals of The New York Academy of Sciences**, New York, v. 849, p. 21-31, 1998.

COORDENAÇÃO DE INFORMAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA(CIEP). Análise dos Informes Epidemiológicos mensais. Disponível em: http://www.adab.ba.gov.br/arquivos/File/Informes_2016/07.pdf. Acessado em: 10/07/2018.

CORTEZ, A.P., RODRIGUES, A.C., GARCIA, A.H., NEVES, L., BATISTA, J.S., BENGALY, Z., PAIVA, F., TEIXEIRA, M.M.G., Cathepsin I-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and south America -characterization, relationships and diagnostic implications. **Mol. Cell. Probes** 23 (1), 44–51. 2009.

CROSS, G. A. M. Antigenic variation in African Tripanosomes and malaria. In: MARR, J. J.; NILSEN, T. W.; KOMUNIECKY, R. W. Molecular medical parasitology, San Diego: **Academic Press**. p. 82-110, 2003.

CUGLOVICI, D. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; REIS-CUNHA, J. L.; CARVALHO, A. U.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 169, n. 3-4, p. 320-326, 2010.

DELAFOSSÉ, A.; THÉBAUD, E.; DESQUESNES, M.; MICHAUX, Y. Epidemiology of *Trypanosoma vivax* infection in cattle in the tsetse area of Lake Chad. **Preventive Veterinary Medicine**, v.74, p.108-119, 2006.

DESQUESNES, M.; DIA, M.L. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by African tabanid *Atylotus fuscipes*. **Vet. Parasitology**, v. 119, p. 9-19, 2004.

FEITOSA, J. A. B.; GUERRA, R. M. S. N. C.; SANTOS, H. P.; ABREU-SILVA, A. L. Registro e morfometria de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo de bovino no município de Itapecuru-Mirim, Maranhão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 1, p. 232, 2004. Suplemento 1.

FIENNES, R. N. T.W. Hematological studies in trypanosomiasis of cattle. **Veterinary Record**, London, v. 66, p. 423-434, 1954.

GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, v.28, p.229-317, 1989.

GERMANO, P. H. V.; EDLER, G. E. C.; SILVA, A. A.; LOPES, L. O. Prevalência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no município de Patos de Minas/MG. **Rev. Acad. Ciênc. Anim.**15(Supl.2):S433-434, 2017.

GONZÁLES, L. F.; GARCÍA, J. A.; NÚÑEZ, C.; PERRONE, T. M.; GONZÁLEZBARADAT, B.; GONZATTI, M. I.; REYNA-BELLO, A. *Trypanosoma vivax*: a novel method for purification from experimentally infected sheep blood. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 111, n. 2, p. 126-129, 2005.

GUEDES JUNIOR, D. S. et al. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.08, n.17, p.105-109, 2008.

GUERRA, N. R. *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* (Ziemann, 1905) em bovinos das diferentes mesorregiões do estado de Pernambuco, Brasil. **Dissertação em Ciência Animal Tropical - Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, 45f, 2013.

HOARE, C. A. The Salivaria: Subgenus Duttonella Chalmers, 1918. In the: The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**. Cap. 11, p. 401-429, 1972.

IGBOKWE, I. O. Mechanisms of cellular injury in African trypanosomiasis. **International Veterinary Bulletin**, New York, v. 64, n. 7, p. 611-620, 1994.

JACKSON, A.; BERRY, A.; ASLETT, M.; ALLISON, H.; BURTON, P.; VAVROVA-ANDERSON, J.; BROWN, R.; BROWNE, H.; CORTON, H.; HAUSER, H.; GAMBLE, J.; GILDERTHORP, R.; MARCELLO, L.; MCQUILLAN, J.; OTTO, T.; QUAIL, M.; SANDERS, M.; TONDER, A.; GINGER, M.; FIELD, M.; BARRY, J.; HERTZ-FOWLER, C.; BERRIMANA, M. Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**. 109(9):3416-21, 2012.

JAIN, N. C. Schalm's Veterinary Hematology. 4. ed. **Philadelphia: Lea and Febinger**. 1221 p, 1986.

JAIN, N.C. Schalm's Veterinary hematology. 5 Ed., **Philadelphia: Lippincott**, 2000.

KEMP, S. J.; TEALE, A. J. Genetic basis of trypanotolerance in cattle and mice. **Parasitology**. Today, v. 14, n. 11, p. 450-454, 1998.

KNOWLES JUNIOR, D. P.; LI, H.; PASTORET, P. P. Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases and vaccine development. In: PEARSON, J. E. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: **Office des International des Epizooties**. p. 66-89, 2008.

KUBOKI, N.; INOUE, N.; SAKURAI, T.; DI CELLO, F.; GRAB, D. J. SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; IGARASHI, I. Loop-Mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 12, p. 5517-5524, 2003.

LAOHASINNARONG, D.; THEKISOE, O. M. M.; MALELE, I.; NAMANGALA, B. ISHII, A.; GOTO, Y.; KAWAZU, S.; SUGIMOTO, C.; INOUE, N. Prevalence of *Trypanosoma* sp. in cattle from Tanzania estimated by conventional PCR and loopmediated isothermal amplification (LAMP). **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 6, p. 1735-1739, 2011.

LEVINE, N. D. Protozoan parasites of domestic animals and man. 2 ed. **Minneapolis: Burguers**, p. 406, 1973.

LINHARES, G. F. C.; DIAS FILHO, F. D.; FERNANDES, P. R.; DUARTE, S. C. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 4, p. 455-460, 2006.

MADRUGA, C.R. Epidemiologia do *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**. 0(0): 1-10, 2009.

MADRUGA, C. R. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanosoma (Duttonella) vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 46-47, 2004.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; CRUZ, T. M.; SCHENK, M. A. M. Desenvolvimento de Uma Prova de Imunoabsorção Enzimática para Detecção De Anticorpos Contra *Trypanosoma vivax* em Bovinos: Resultados Preliminares. **Embrapa-CNPGC**, Campo Grande. Pesquisa em Andamento, N°50, junho de 1999, p. 1-3. Embrapa- CNPGC.1999.

MASAKE, R. A.; NANTULYA, V. M.; PELLÉ, R.; MAKAU, J. M.; GATHUO, H.; OLEMOIYOI, K. A specie specific antigen of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* detectable in the course of infection is encoded by a differentially tandemly-reiterated gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 207-218, 1994.

MASAKE, R. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. **The Veterinary Record**. 107:551 - 7, 1980.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 92, p. 123, 1997. Suplemento 1.

MOLOO, S. K.; GRAY, M. A. New observations on the cyclical development of *Trypanosoma vivax* in Glossina. **Acta Tropica**, Basel, v.4, p.167-172, 1989.

MORAES, M. A. V. *Trypanosoma vivax*: Infecção experimental em bovinos (*Bos indicus*). 104 f. **Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, Jaboticabal, 2001.

MURRAY, M.; TRAIL, J. C. M. Genetic resistance to animal trypanosomiasis in Africa. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p.541-51, 1984.

NANTULYA, V. M. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties*, Paris, v. 9, n. 2, p. 357-367, 1990.

NASCIMENTO, E. F. & SANTOS, R. L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 137p, 2013.

NJIRU, Z.K., OUMA, J.O., BATETA, R., NJERU, S.E., NDUNGU, K., GITONGA, P.K., GUYA, S., TRAUB, R., Loop-mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma vivax* based on satellite repeat DNA. **Vet. Parasitol.** 180 (3–4), 358–362, 2011.

OKECH, G.; WATSON, E. D.; LUCKINS, A. G.; MAKAWITI, D. W. The effect of *Trypanosoma vivax* infection on late pregnancy and postpartum return to cyclicity in boran cattle. **The rriogenology, Stoneham**, v. 46, n. 5, p. 859-869, 1996.

OSORIO, A.; MADRUGA, C.; DESQUESNES, M.; SOARES, C.; RIBEIRO, L.; COSTA, S. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the new world - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 103:1-13, 2008.

PAIVA, E. S. Tripanossomíase por *trypanosoma vivax* em pequenos ruminantes: descrição de surtos e infecção experimental da doença. 2009.83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) - **Universidade Federal Rural do Semi - Árido**. Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. Agosto, 2009.

PAIVA, F.; LEMOS, R. A. A.; NAKASATO, L.; BRUM, K. B.; BERNADO, K. C.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil: II – Inoculação Experimental. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 143-148, 2000.

PEREIRA, L. J.; ABREU, A. C. V. V. Ocorrência de tripanosomas em bovinos e ovinos na região amazônica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 17-21, 1978.

PIMENTEL, de S. P.; RAMOS, C. A. do N.; RAMOS, R. A. do N.; ARAÚJO, F. R. de; BORBA, M. L.; FAUSTINO, M. A. da G.; ALVES, L. C. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 185, n. 2-4, p. 286-289, 2012.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. A textbook of the diseases of catte, sheep, pigs, goats and horses. **Veterinary medicine**.9.ed. London: W.B.Saunders,. 1899p, 2000.

REBESKI, D. E.; WINGER, E. M.; ROGOVIC, B.; ROBINSON, M. M.; CROWTHER, J. R.; DWINGER, R. H. Improved methods for the diagnosis of african trypanosomosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 249-253, 1999.

RODRIGUES, C. OLINDA, R.; SILVA, T.; VALE, R.; DA SILVA, A.; LIMA, G.; GARCIA, H.; BATISTA, J. Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. **Veterinary Parasitology**. 191:146-53, 2013.

SEIDL, A. F.; DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian pantanal and Bolivian lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 2, p. 269-272, 1999.

SEKONI, V. O., NJOKU, C. O., KUMI-DIAKA, J. & SAROR, D. I. Pathological changes in male genitalia of cattle infected with *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense*. **British Vet. J.** 146:175-80, 1990.

SERRA-FREIRE, N. M. Oiapoque – outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 4, p. 30-31, 1981.

SERRA-FREIRE, N. M.; REZENDE, A. M. L. *Stomoxys calcitrans*, um vetor mecânico do *Trypanosoma vivax* no Brasil e notas sobre o comportamento do parasito no vetor. **Arquivos da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 77-82, 1988.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brasil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.66, p.25-32, 1972.

SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; POLENZ, M. F.; POLENZ, C. H.; TEIXEIRA, M. M. G.; LOPES, S. T. A.; MONTEIRO, S. G. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2550-2554, 2009.

SILVA, R. A. M. S.; DAVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L.; PELLEGRIN, A. O. **Abortions caused by *T. vivax* in bovines from the Pantanal of Poconé, MT, Brazil.**

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; D'ÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma Vivax*: Biologia, Diagnóstico e Controle. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Embrapa Pantanal, 2002.

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

THOMPSON, J. H. et al. **Microbiologia médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 280-282, 1992.

TURNER, C. M. The rate of antigenic variation in fly-transmitted and syringe-passaged infections of *Trypanosoma brucei*. **FEMS Microbiology Letters**. 1007;153(1):227-31, 1997.

UILENBERG, G.; BOYT, W. P. A Field guide for the diagnosis, treatment and prevention of african animal trypanosomosis. Rome: **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 158 p, 1998.

VICKERMAN, k. The diversity of the Kinetoplastid flagellates in: Biology of the Kinetoplastida. Lumsden W.H.R. & Evans D.A. (Eds), Academic Press, London/New York/ San Francisco,. **Academic Press, London/New York/San Francisco**:1-34, 1976.

VINCENDEAU, P.; BOUTEILLE, B. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 645-665, 2006.

Wallace FG. The Trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**.18(1):124-93, 1966.

WHITELAW, D. D.; GARDINER, P. R.; MURRAAY. M. Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. **Parasitology**.97 (Pt 1):51-61, 1988.

WILLIAMS, D. J.; LOGAN-HENFREY, L. L.; AUTHIÉ, E.; SEELY, C.; CODIMBA, F. Experimental Infection with a Hemorrhage Causing *Trypanosoma vivax* in N'Dama and Boran cattle. **Scand. Journal of Immunology**, Baltimore, v. 36, suppl. 11, p. 34-36, 1992.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 27, n. 4, p. 384-386, 1970.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial do presente trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.



Matheus Ribeiro Coelho

matheusribver@gmail.com

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Av. Vereador João Narciso, 1380- Cachoeira, Uruí- MG, 38610-000