

UNIVERSIDADE DE UBERABA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS
TRÓPICOS (PPGSPAT)- MESTRADO**

IZABELA ANDRADE PANDOLFI

**PADRONIZAÇÃO DO USO DO PAPEL FILTRO NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA VIVAX* EM BOVINOS E
ANÁLISE DE COINFEÇÕES COM OUTROS PATÓGENOS**

UBERABA-MG

2022

IZABELA ANDRADE PANDOLFI

**PADRONIZAÇÃO DO USO DO PAPEL FILTRO NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA VIVAX* EM BOVINOS E
ANÁLISE DE COINFECÇÕES COM OUTROS PATÓGENOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

Orientadora: Prof. Dra. Joely F. Figueiredo Bittar

Coorientador: Prof. Dr. Ian Martin

UBERABA-MG

2022

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

- P192p Pandolfi, Izabela Andrade.
Padronização do uso do papel filtro no diagnóstico sorológico da infecção por *Trypanosoma vivax* em bovinos e análise de coinfeções com outros patógenos / Izabela Andrade Pandolfi. – Uberaba, 2022.
104 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação.
Orientadora: Profa. Dra. Joely F. Figueiredo Bittar.
Coorientador: Prof. Dr. Ian Martin.
1. Tripanossomose em animais. 2. Bovino – Doenças – Diagnóstico. 3. Bovino. 4. Bovinocultura. 5. Sorologia. I. Bittar, Joely F. Figueiredo. II. Martin, Ian. III. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. IV. Título.

CDD 616.9363

IZABELA ANDRADE PANDOLFI

PADRONIZAÇÃO DO USO DO PAPEL FILTRO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA
INFECÇÃO POR TRYPANOSOMA VIVAX EM BOVINOS E ANÁLISE DE COINFECÇÕES
COM OUTROS PATÓGENOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 24/02/2022

BANCA EXAMINADORA:



Profª. Drª. Joely F. Figueiredo Bittar - Orientadora
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo
Centro de Pesquisas René Rachou,
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - BH

*“Crê em ti mesmo, age e verá os resultados.
Quando te esforças, a vida também se esforça para
te ajudar.”*

Francisco Cândido Xavier

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos Espíritos de Luz por me sustentarem em todos os momentos da vida. Minha força e determinação são graças a ELES.

Aos meus pais Agda e Marcos Tulio. Vocês são minha base e toda e qualquer vitória sempre será por vocês e para vocês.

Ao meu companheiro de vida Guilherme, que compartilha comigo o amor pela Medicina Veterinária, entende meus objetivos e que nem por um minuto mediu esforços para que este sonho fosse realizado.

Aos amigos Amanda, Celso, Vanessa, Sofia, Giovana e Alexandre por todo o companheirismo ao longo desta caminhada. Vocês fazem parte desta conquista.

Aos meus filhos de quatro patas Fiona, Manuela, Nero e Luana, que sempre foram e sempre serão minhas maiores motivações para ser uma boa profissional.

À querida professora Joely, que extrapolou o papel de orientadora. Obrigada por sua amizade, conselhos e ensinamentos durante nossa convivência. Você é uma inspiração.

À professora Francynny que me acompanhou durante toda graduação e foi meu ombro amigo no mestrado. Sua doçura e carinho ficarão guardados para sempre.

Às queridas alunas de iniciação científica Ana Vitória, Joyce, Thais e Amanda. Vocês foram muito importantes para realização deste trabalho e tenho certeza que se encantaram, assim como eu, com a beleza da imunofluorescência.

Aos alunos de internato que tive o prazer de acompanhar, aprender e ensinar. Vocês reforçaram meu desejo de ser uma professora.

À todos do setor de Diagnóstico Laboratorial do HVU por toda paciência, dedicação e ensinamentos passados ao longo desses dois anos de projeto.

À CAPES e UNIUBE pelo auxílio financeiro concedido, peça fundamental para que concluísse o mestrado.

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Capítulo II

- Figura 1:** Adsorção de soro bovino em papel filtro com gramaturas de 250G (A) e 88G (B) utilizados na padronização de pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. vivax* por imunofluorescência indireta, sendo que para o papel de 250 G foram impregnados 100 µL de soro enquanto no PF de 88 G foram dispensados 50 µL de soro..... 788
- Figura 2:** Procedimentos laboratoriais para obtenção de eluato de PF onde: (A) Picotagem do papel filtro (PF) em 12 círculos de 3 mm cada utilizando perfurador metálico, dentro de uma placa de petri; (B) Acondicionamento dos picotes de PF em tubos plásticos com tampa do tipo eppendorf contendo 350 µL de PBS-SFB 3%; (C) Homogeneização overnight a 4°C por 12 horas. 799
- Figura 3:** Imagens representativas do esquema realizado para obtenção das amostras biológicas sendo em A observada a coleta de sangue através da venopunção de jugular em tubo estéril sem anticoagulante, em B a coleta do soro após 60 minutos de decantação do sangue na posição vertical em T.A, utilizando para tanto uma seringa de 1mL. Na imagem C observa-se a transferência do soro coletado para o PF, sendo dispensados 100 µL de soro e, em D, observa-se o PF já embalado em papel alumínio e acondicionado em saco plástico, após 4 horas de secagem em temperatura ambiente. 80
- Figura 4:** Comparação da visualização de controles positivos e negativos obtidos através de soro e eluato, observados em microscópio de epifluorescência no aumento de 400X. Sendo que a sigla C- S se refere ao controle negativo utilizando amostras de soro congeladas a -20°C enquanto a sigla C+ S faz referência a amostra de controle positivo utilizando como material soro congelado a -20°. Já a imagem identificada como C- E foi obtida através da visualização do controle negativo utilizando amostras de soro eluidas em PF, armazenadas em T.A, enquanto a imagem identificada como C+ E é referente ao controle positivo de soro eluido em PF. Observa-se maior facilidade na identificação do controle negativo como uma amostra verdadeiramente negativa, sem a presença de formas semelhantes aquelas observadas em amostras positivas. Já as amostras positivas de eluato, quando comparadas ao soro congelado, proporcionaram menor quantidade de aglomerados, o que também é um facilitador durante o momento da leitura. 82
- Quadro 1:** Grau de concordância índice Kappa.....81
- Quadro 2:** Análises realizadas por classe pelo método Kappa.....83

Capítulo III

Figura 1: Prevalência geral e percentual da tripanossomíase e de seus diagnósticos diferenciais, provenientes de amostras sorológicas enviadas ao HVU entre os anos de 2013 a 2020 (Fig. A). As legendas do eixo x destacadas com retângulos indicam as doenças mais prevalentes ($p < 0,05$) (Fig. A). Prevalência de coinfeções entre a tripanossomíase bovina e seus principais diagnósticos diferenciais, onde cores sólidas distintas significam doenças distintas apresentadas como monoinfeções e cores mescladas significam coinfeções (Fig. B). As legendas do eixo x destacadas com retângulos indicam as coinfeções mais prevalentes ($p < 0,05$) (Fig. B) Perfil sazonal identificado através da prevalência das doenças avaliadas ao longo das estações do ano (Fig. C) e distribuição de todas as doenças ao longo das estações do ano, sendo possível observar os momentos em que as doenças exibem o mesmo perfil, sendo considerados portanto, momentos onde o diagnóstico diferencial se torna indispensável (pontos circundados por retângulos) (Fig. D). As letras sobre as colunas (Fig. A e B) ou pontos (Fig. C e D) indicam diferença significativamente entre os respectivos itens avaliados na sequência apresentada nos gráficos ao nível de 5% de probabilidade.....94

Figura 2: Impacto da sazonalidade sobre a prevalência de mono e coinfeção em fêmeas bovinas com suspeita clínica de tripanossomíase encaminhadas para o Hospital Veterinário de Uberaba (HVU) no período entre 2013 e 2020 de acordo com as estações do ano. Na imagem A são observadas o perfil sazonal dividido por doença, onde as cores sólidas representam monoinfeções, cor branca representa os animais testados que foram negativos e as cores mescladas indicam o perfil de coinfeção entre tripanossomíase e a doença analisada. Os gráficos com fundo cinza escuro indicam as doenças que diferem entre si estatisticamente em relação as coinfeções (Fig. A). O perfil sazonal das doenças avaliadas em forma de coinfeções ou monoinfeções, divididos de acordo com cada estação do ano (Fig B), onde cores sólidas representam monoinfeções, cor branca representa animais com sorologia negativa para a doença avaliada e cores mescladas indicam a prevalência de coinfeções entre as doenças avaliadas e a tripanossomíase. As legendas do eixo x destacadas com retângulos indicam as coinfeções mais prevalentes ($p < 0,05$). As letras sobre as colunas (Fig. A e B) indicam diferença significativamente entre os respectivos itens avaliados na sequência apresentada nos gráficos ao nível de 5% de probabilidade.....96

Figura 3: Prevalência das doenças infecciosas em relação aos títulos de anticorpos anti-*T. vivax* detectados em IFI de fêmeas bovinas com suspeita clínica de Tripanossomíase encaminhadas ao HVU no período entre 2013 e 2020. Na imagem A são identificadas as principais prevalências das coinfeções com tripanossomíase. Na imagem B nota-se as titulações sorológicas para tripanossomíase em comparação as doenças concomitantes.....97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de contingência	81
Tabela 2: Tabela de contingência dos dados	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BoHV	Herpesvírus Bovino
BoHV 1.1	Herpesvírus Bovino 1.1
BoHV1.2a	Herpesvírus Bovino 1.2a
BoHV 1.2b	Herpesvírus Bovino 1.2b
BLV	Vírus da leucose bovina
BVD	Diarreia Viral Bovina
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
BVD-1	Vírus da diarreia viral bovina tipo 1
BVD-2	Vírus da diarreia viral bovina tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção enzimática
IBR	Rinotraqueite Infecciosa Bovina
IDGA	Imunodifusão em Gel de Ágar
IFI	Imunofluorescência Indireta
IPB	Balanopostite Pustular Infecciosa
IPV	Vulvovaginite Pustular Infecciosa
IgG	Imunoglobulina G
LAMP	Transcrição reversa mediada por loop
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PBS	Tampão Fosfato-salino
PF	Papel Filtro
qPCR	PCR quantitativo em Tempo Real
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
<i>T. vivax</i>	<i>Trypanosoma vivax</i>
VLB	Vírus da Leucose Bovina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO I	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. PAPEL FILTRO	19
3.1.1. Histórico do Papel Filtro:	19
3.1.2. Composição do Papel filtro	19
3.1.3. Procedimentos para utilização do Papel Filtro	19
3.1.4. Benefícios da utilização do Papel Filtro	20
3.1.5. Desvantagens da utilização do Papel Filtro	20
3.1.6. Estudos comparando soro congelado e papel filtro	21
3.2. TRIPANOSSOMÍASE BOVINA	21
3.2.1. Base Biológica	21
3.2.2. Histórico do <i>Trypanosoma vivax</i>	21
3.2.3. Distribuição Geográfica e Epidemiologia	22
3.2.4. Hospedeiros Susceptíveis	23
3.2.5. Transmissão	24
3.2.6. Patogenia e Sintomatologia Clínica	24
3.2.7. Alterações Hematológicas	26
3.2.8. Diagnóstico	27
3.2.9. Tratamento e Controle	29
3.3. NEOSPOROSE BOVINA	30
3.3.1. Bases Biológicas	30
3.3.2. Distribuição Geográfica e Epidemiologia	31
3.3.3. Ciclo Biológico e Patogenia	32
3.3.4. Transmissão	34
3.3.6. Diagnóstico	35
3.3.7. Tratamento e Controle	36
3.4. LEPTOSPIROSE BOVINA	37
3.4.1. Bases Biológicas	37
3.4.2. Distribuição Geográfica e Epidemiologia	38

3.4.3. Patogenia	38
3.4.4. Transmissão.....	39
3.4.5. Sintomatologia.....	40
3.4.6. Diagnóstico	40
3.4.7. Tratamento e Controle	41
3.5. LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA.....	42
3.5.1. Bases Biológicas.....	42
3.5.2. Distribuição Geográfica e Epidemiologia	43
3.5.3. Patogenia	44
3.5.4. Transmissão.....	45
3.5.5. Sintomatologia.....	45
3.5.6. Diagnóstico	46
3.5.7. Tratamento e Controle	47
3.6. RINOTRAQUEITE INFECCIOSA BOVINA (IBR).....	49
3.6.1. Bases biológicas	49
3.6.2. Distribuição Geográfica e Epidemiologia	49
3.6.3. Patogenia	50
3.6.4. Transmissão.....	51
3.6.5. Sintomatologia.....	51
3.6.6. Diagnóstico	52
3.6.7. Tratamento e Controle	53
3.7. DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD).....	54
3.7.1. Bases Biológicas.....	54
3.7.2. Distribuição Geográfica e Epidemiologia	54
3.7.3. Patogenia	56
3.7.4. Transmissão.....	57
3.7.5. Sintomatologia.....	57
3.7.6. Diagnóstico	58
3.7.7. Tratamento e Controle.....	59
REFERÊNCIAS.....	62
CAPÍTULO II.....	74
CAPÍTULO III	88
ANEXO 1	104

1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase ou tripanossomose é uma doença causada por protozoários que pertencem ao gênero *Trypanosoma*, que são capazes de infectar diferentes espécies como bovinos, humanos e outros mamíferos (SILVA et al., 2002). Com destaque na medicina veterinária está o *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*), que gera diversos impactos negativos na bovinocultura, percebidos principalmente em animais com aptidão leiteira (BASTOS et al., 2017; PEREIRA et al., 2018).

Na América do Sul acredita-se que a introdução da doença ocorreu no ano de 1820, em decorrência da importação de gado zebu contaminado proveniente do Senegal com destino a Guiana Francesa (CAMUS, 1996). No Brasil, o primeiro diagnóstico da tripanossomíase bovina foi feito em 1946 no Estado do Pará e, no ano de 1972, novos relatos foram feitos sobre a infecção por *T. vivax* em búfalos (BOULHOSA, 1946; SHAW; LAINSON, 1972). Relatos da doença em outras regiões do país começaram no ano de 1995 sendo na região Nordeste do país o primeiro caso identificado em 2002 (BATISTA et al., 2007), em Minas Gerais e São Paulo no ano de 2008 (CARVALHO et al., 2008; CADIOLI et al., 2012) e no Rio Grande do Sul em 2009 (Silva et al., 2009 a). As ocorrências de surtos continuam em diferentes localidades do país, sendo comumente relacionados a introdução de animais provenientes de localidades nas quais casos já foram relatados (BASTOS et al., 2017).

No continente Africano a doença é transmitida pela mosca do gênero *Glossina* sp., já no continente Sul Americano, na ausência deste vetor, o parasito se adaptou a vetores pertencentes aos gêneros *Stomoxys* spp e *Tabanus* sp (PAIVA et al., 2000; DABUS; CAMPOS; NEVES, 2011). Portanto, a associação entre a presença das moscas e surtos da doença pode ser feita (BATISTA et al., 2008). O uso de fômites contaminados também é importante no processo de disseminação da doença, com destaque para o uso de agulhas compartilhadas utilizadas principalmente no processo de ordenha de gado leiteiro (BASTOS et al., 2017). Nota-se que o cuidado com a introdução de novos animais ao rebanho também é necessário para impedir que a tripanossomíase se instale na propriedade, fato observado por Batista et al., (2008) que indicaram como possível origem do surto em uma propriedade, o aluguel de pastagens para bovinos oriundos de propriedade em que a presença do *T. vivax* já havia sido comprovada.

A presença desta doença implica em perdas relacionadas a abortos, queda na produção de leite, queda nas taxas de prenhez, sintomatologia neurológica e, em casos graves, pode

resultar em morte do animal (BATISTA et al., 2008, ABRÃO et al., 2009). As perdas podem ser percebidas não apenas na forma direta (relacionadas ao animal) mas também, de forma indireta pois afetam a oferta de carne e leite ao consumidor (SILVA et al., 1997).

Nota-se que devido à similaridade de sintomas gerados pela tripanossomíase em bovinos com outras doenças, como a Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia Viral Bovina (BVD), Leptospirose e Neosporose, principalmente relacionados ao aborto, repetição de cio e anemia, a realização de diagnósticos diferenciais se torna indispensável (MENDES et al., 2009).

Apesar de pouco relacionada em estudos com a Tripanossomíase, a Leucose é uma doença que gera sintomas semelhantes àqueles resultantes de infecções por *T. vivax*, como por exemplo emagrecimento progressivo e queda de produtividade, além de resultar em queda de imunidade, o que facilita o surgimento de outras doenças oportunistas (SILVA FILHO et al., 2011; MEIRELLES-BARTOLI; SOUSA, 2013). Além disso, vale ressaltar que as duas enfermidades têm mecanismos de transmissão semelhantes, que envolvem o repasto sanguíneo de insetos hematófagos e a utilização de fômites contaminados (SILVA et al., 1997; SANTOS et al., 2013; BASTOS et al., 2017).

Pereira et al., (2018) e Zanatto et al., (2019) observaram que a tripanossomíase pode ser apresentada de forma isolada ou em conjunto com outras enfermidades, o que torna difícil a determinação da verdadeira causa da sintomatologia, observando a necessidade do diagnóstico diferencial e precoce. Portanto, o diagnóstico da infecção por *T. vivax* deve ser realizado e relacionado com a clínica do animal, bem como seus diagnósticos diferenciais.

Diferentes metodologias devem ser aplicadas para o diagnóstico da tripanossomíase bovina, incluindo o exame clínico, porém, deve-se ter em mente a possibilidade da existência de animais assintomáticos e a inespecificidade de sintomas (LOPES et al., 2018). Os exames que podem ser adotados incluem a Técnica de Woo, Técnica da Gota Espessa e/ou *Buffy coat* para detecção de tripomastigota circulante, Imunofluorescência Indireta (IFI) e Elisa, para detecção de anticorpos e técnicas moleculares (PCR, qPCR) para detecção do material genético do parasita e/ou carga parasitária (SILVA et al., 2002; SILVA; SANCHEZ; DÁVILA, 2003).

Como pode-se notar, a maioria dos exames laboratoriais necessitam de sangue como amostra biológica, portanto, a utilização de técnicas que facilitem o manejo com as amostras coletadas em trabalhos a realizados à campo, são fundamentais para facilitar e otimizar o diagnóstico (BAHIA et al., 1995). Gomes (2004) ressaltou a necessidade de cuidado para que as amostras de sangue/soro sejam enviadas corretamente ao laboratório, respeitando as

especificações de coleta, acondicionamento das amostras e envio em tempo e condições ideais, para que as mesmas sejam recebidas nas melhores condições possíveis e viabilizem a realização dos exames.

No contexto de busca por facilidades para coleta e armazenamento de amostras sanguíneas, o papel filtro entra em cena, representando uma forma barata e fácil de armazenar amostras, não necessitando de refrigeração ou acondicionamento específico (FONSECA et al., 2007). Seu uso é justificado também pelo fato de que uma vez que o material biológico impregnado no papel, se torna estável e sem capacidade infectante (MEI et al., 2001). Na medicina veterinária a aplicação do papel filtro está sendo expandida para diversos exames, dentre eles a Toxoplasmose, Leishmaniose visceral canina e doença de Newcastle (GOMES et al., 2004; FONSECA et al., 2007).

Assim, o presente trabalho objetivou padronizar o uso do papel filtro para o diagnóstico sorológico por IFI da tripanossomíase bovina e correlacionar a presença da doença com outras enfermidades que acometem os bovinos, analisando os fatores sazonais envolvidos no processo.

Para melhor entendimento, o estudo foi dividido em três capítulos distintos. No primeiro será apresentada a revisão de literatura das doenças envolvidas no estudo e sobre o papel filtro e no segundo e terceiro capítulos, serão apresentados os artigos científicos produzidos sobre a padronização e validação do uso do papel filtro e a ocorrência de coinfeções com a tripanossomíase.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar e validar a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta para identificar anticorpos anti-*Trypanosoma vivax* em amostras de soro bovino eluidas de papel filtro e identificar a ocorrência da Tripanossomíase em animais com suspeita clínica e também avaliar coinfeções com outros patógenos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a utilização do papel filtro no exame de Imunofluorescência Indireta (IFI) para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax*.

- Padronizar a aplicação do soro em papel filtro a campo

- Comparar os resultados da pesquisa de anticorpos IgG, por IFI, dos soros eluidos em papel filtro e armazenados a -20°C.

- Avaliar a prevalência e sazonalidade da tripanossomíase em amostras enviadas ao laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário de Uberaba, de animais com suspeita da doença entre os anos de 2013 e 2020.

- Avaliar a prevalência e sazonalidade de coinfeções em animais com suspeita de tripanossomíase em amostras enviadas ao laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário de Uberaba, de animais com suspeita clínica da doença, entre os anos de 2013 e 2020.

- Correlacionar a soroprevalência de tripanossomíase bovina e de outras infecções concomitante (Leptospirose, Neosporose, Leucose, Diarreia Viral Bovina (BVD) e Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR), utilizando para isto os dados presentes no setor de Diagnóstico Laboratorial Preventivo do Hospital Veterinário de Uberaba.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA:

**PAPEL FILTRO, TRIPANOSSOMÍASE, NEOSPOROSE, LEPTOSPIROSE,
LEUCOSE, RINOTRAQUEÍTE INFECCIOSA BOVINA (IBR) E DIARREIA VIRAL
BOVINA (BVD)**

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PAPEL FILTRO

3.1.1 Histórico do Papel Filtro:

O início da fabricação do papel filtro (PF) não possui data certa, mas, os protótipos começaram a ser feitos em meados de 1700 na Inglaterra, com o objetivo de atender a demanda de papeis de qualidade (MEI et al., 2001). Na medicina humana, o PF começou a ser utilizado para coleta de sangue em 1960 enquanto na medicina veterinária, a utilização deste material remota da década de 1970, sendo empregado a princípio na detecção da doença de Newcastle (BREAD; BRUGH, 1997; FONSECA et al., 2007).

3.1.2 Composição do Papel filtro

O papel filtro possui alto grau de celulose em sua composição e, em alguns casos pode conter também algodão, sendo que a diferenciação entre um PF e outro é feita pela dimensão de seus poros, peso e espessura (RIBEIRO, 2015). O PF possui ainda como característica ser fabricado com altíssima precisão, tendo a capacidade de ter alto poder de absorção das amostras de sangue, de acordo com as especificações de cada fabricante/produto (MEI et al., 2001).

3.1.3 Procedimentos para utilização do Papel Filtro

De forma geral, a utilização do PF deve seguir as especificações indicadas por cada fabricante. Alguns papeis podem exigir preparação prévia como por exemplo a esterilização, enquanto outros não fazem a mesma recomendação. Indicações sobre o volume ideal a ser aplicado em cada tipo de PF também devem ser observadas, visto que cada material possui uma capacidade diferente de absorção (FONSECA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 1986).

Para utilização do PF, a amostra de sangue ou soro deve ser aplicada no mesmo e, deve-se aguardar 60 minutos para secagem sendo que em seguida, áreas do papel devem ser picotadas e eluidas em solução salina tamponada de fosfato (PBS), obtendo assim o eluato, que é o material a ser utilizado para realização dos testes sorológicos (BRAGA et al., 1998). A secagem do PF antes deste ser armazenado é fundamental, visto que a umidade pode induzir o crescimento de bactérias e resultar em alterações no tempo da eluição da amostra (MEI et al., 2001). Guimarães e colaboradores (1986) salientam ainda o cuidado necessário quanto a diluição utilizada na leitura do eluato quando comparada ao soro.

Quando aplicadas em PF, as amostras podem ser mantidas viáveis em temperatura ambiente por um período de 15 a 30 dias e após, recomenda-se a manutenção da amostra sob temperatura de 2 a 4 °C por um período que varia de 3 a 5 meses (LIN-WANG; MANRIQUE, 2002; GOMES *et al.*, 2004). O cuidado na manutenção da temperatura do PF é salientado por Gomes et al., (2004) pelo fato de que a temperatura pode alterar tanto a amostra impregnada como o próprio PF, que pode abrir suas fibras e aumentar assim a diluição da amostra.

3.1.4- Benefícios da utilização do Papel Filtro

Amostras de sangue/soro exigem algumas especificações ao serem enviadas para os laboratórios e dentre elas, estão a necessidade de envio sob refrigeração e em curto espaço de tempo, sob o risco de as amostras serem desnaturadas e os resultados serem comprometidos. O transporte de tubos contendo amostras pode ainda implicar em risco de quebra dos mesmos, além do fato de que tubos ocupam maiores espaços e conseqüentemente incrementam os custos de envio (FONSECA et al., 2007; GOMES et al., 2004).

Sendo assim, o PF que é um meio de transporte de amostras que não exige envio em baixas temperaturas, ocupa pequenos espaços, dura grandes períodos de tempo e não implica em riscos de perda de amostras por quebra de frascos ou desnaturação, é uma alternativa com grandes atrativos (MEI et al., 2001). Guimarães et al., (1986) citam ainda que a utilização deste produto é vantajosa por dispensar a mão de obra especializada para coleta do material.

3.1.5 Desvantagens da utilização do Papel Filtro

A utilização do PF contendo amostras de sangue ou soro implica em um ponto negativo, que é a necessidade de utilizar métodos de análise do material que possuam elevada sensibilidade, visto que as amostras chegarão ao laboratório em volume reduzido (EDELBOEK et al., 2009). Outro ponto a ser levado em consideração na utilização do PF é com relação a degradação que a celulose pode sofrer no processo, sendo altamente influenciada pela luminosidade e umidade, apesar de existir controle destes fatores para fabricação do material (COCCA, ARIENZO, ORAZIO, 2011).

Mei et al., (2001) destacaram o fato de que o PF ainda pode ser associado a alguma imprecisão nos testes devido à dificuldade de padronizar o dispositivo (papel específico para determinada doença). Um mesmo PF pode apresentar diferentes graus de absorção, o que

justifica a tendência de títulos de anticorpos serem mais baixos nos ensaios imunológicos quando se utiliza eluato de PF comparado ao soro (GOMES et al., 2004).

3.1.6 Estudos comparando soro congelado e papel filtro

Em estudo realizado com PF para doença de Newcastle, a semelhança entre os resultados de papel filtro e soro representaram 74% (FONSECA et al., 2007). Já para a pesquisa de Leishmaniose visceral canina, a sensibilidade e especificidade foram de 73% (SILVA et al., 2009b).

3.2 TRIPANOSSOMÍASE BOVINA

3.2.1 Base Biológica

Considerado o agente etiológico com maior relevância na ocorrência de tripanossomíase bovina, o *T. vivax* é classificado com o sendo um organismo unicelular, flagelado e eucariótico (HOARE, 1972). É classificado ainda como um hemoparasita pertencente à família *Trypanosomatidae*, ao gênero *salivaria* e ao subgênero *Dutonella* (SILVA et al., 2002).

O *T. vivax* é observado no esfregaço como um parasito de corpo alongado, com dimensões que variam entre 20 a 26 µm de comprimento, possuem a extremidade posterior com formato arredondado e o cinetoplasto terminal é observado em forma de meia lua na porção final do corpo do parasito (FELIPE; KATAOKA, 2019).

3.2.2 Histórico do *Trypanosoma vivax*

Inicialmente a tripanossomíase bovina foi identificada no continente africano, sendo que lá, era causada por diversas espécies do gênero *Trypanosoma* spp. e, possuíam como vetor as moscas do gênero *Glossina* sp. (PAIVA et al., 2000). A introdução do *T. vivax* na América do Sul começou pela Guiana Francesa pela importação do gado Zebu proveniente do Senegal no ano de 1830, porém, o intenso comércio de gado entre Brasil e países Africanos antes de 1830 também pode ter trazido o *T. vivax* na América do Sul (CAMUS, 1996).

Os primeiros relatos de contaminação por *T. vivax* no Brasil foram feitos por Boulhosa em 1946 no Estado do Pará e, em 1972, também no Pará, foi identificada a contaminação de búfalos por *T. vivax* (SHAW & LAINSON, 1972). A região norte do Brasil foi, portanto, a primeira a identificar casos de tripanossomíase por *T. vivax* e, relatos em outras regiões começaram apenas no ano de 1995, quando foi identificado surto da doença no estado do Mato Grosso (SILVA et al., 1996).

3.2.3 Distribuição Geográfica e Epidemiologia

A primeira ocorrência de *T. vivax* nas Américas foi observada no ano de 1919 na Guiana Francesa e, posteriormente foi disseminada por diversos países localizados na América do Sul, ilhas do Caribe e América Central (SILVA et al., 2004). Desde os primeiros relatos da doença no Brasil, a região Norte e o Pantanal se tornaram endêmicas para a tripanossomíase bovina e, relatos da enfermidade em outras partes do país são considerados pontuais e caracterizados por surtos (SILVA et al., 1997).

A tripanossomíase bovina é considerada uma doença com disseminação mundial, principalmente pelo fato do parasito já ter se adaptado a outros vetores como por exemplo *Stomoxys* spp. e *Tabanus* spp. que são dípteros hematófagos presentes no continente americano (DABUS; CAMPOS; NEVES, 2011). Em áreas com abundante presença dos vetores aos quais o parasita encontra condições ideais para sua multiplicação, a tripanossomíase pode ser endêmica, visto que a presença dos vetores é um grande indicativo da possibilidade da presença da doença (FELIPE; KATAOKA, 2019).

O *T. vivax* foi identificado nos estados do Brasil em diferentes anos, sendo na região Nordeste em 2002 (BATISTA et al., 2007), Tocantins em 2006 (LINHARES et al., 2006) Minas Gerais e São Paulo em 2008 (CARVALHO et al., 2008; CADIOLI et al., 2012), e Rio Grande do Sul em 2009 (SILVA et al., 2009 a). Porém, os relatos de animais doentes não cessaram, sendo encontradas divulgações de surtos em diferentes regiões do país como Mato Grosso do Sul em 2013 (BASTOS et al., 2013), Goiás em 2016 (BASTOS et al., 2017) e Minas Gerais em 2017 (GERMANO et al., 2017).

A soropositividade identificada em uma propriedade localizada no estado do Maranhão foi de 82,51% (PEREIRA et al., 2018) enquanto no Rio Grande do Norte de 447 amostras testadas, 42 foram positivas, representando prevalência de 9,0% sendo que destes, 59,5% eram animais de corte, 92,5% eram fêmeas, 85,7% estavam em lactação e 88,1% eram de raças europeias (BATISTA et al., 2018). Em 400 amostras avaliadas de bovinos de corte de Corumbá-MS, a positividade de anticorpos IgG anti-*T. vivax* foi de 89,75%, reforçando a ideia de que a área é endêmica para o parasito (MELLO, 2019). A alta positividade sorológica também foi identificada por Silva (2018) que avaliou que das 6474 amostras biológicas destinadas a realização de sorologia, enviadas para o Hospital Veterinário de Uberaba, pertencentes a animais com suspeita clínica da doença, 78,48% apresentaram anticorpos anti-*T. vivax*.

As taxas de morbidade e mortalidade são variáveis. Em estudo feito em três propriedades distintas, localizadas no estado do Mato Grosso, a taxa de morbidade variou de 14,3% a 28,1%, já a taxa de mortalidade ficou entre 4,2% e 9,2% (CARDOSO, 2017). Porém, de forma geral é aceita a ideia de que em áreas endêmicas, a doença tem como características as baixas morbidade e mortalidade já em áreas nas quais ocorrem surtos, observa-se alta mortalidade (PAIVA et al., 2000).

Batista et al., (2018) apontaram que animais com aptidão leiteira, em lactação e de raças europeias, alojados em propriedades com presença do vetor mecânico e que fazem a compra de animais sem o devido rigor sanitário, possuem maiores chances de ter a doença. Pereira et al., (2018) observaram que os fatores relacionados a ocorrência de surto de tripanossomíase em um rebanho no estado do Maranhão foram: ambiente propício para os vetores mecânicos, presença de animais silvestres e a introdução de animais ao rebanho que eram oriundos de estados nos quais a doença já havia sido registrada anteriormente.

Silva et al., (2002) notaram que existe associação positiva entre a estação das chuvas e o aumento da prevalência de tripanossomíase no rebanho, sendo este fato decorrente do aumento da presença de moscas hematófagas, que são vetores mecânicos do parasito. Segundo Barros et al., (2003) os picos populacionais dos vetores mecânicos podem ser observados durante a época chuvosa na região do Pantanal brasileiro

3.2.4 Hospedeiros Susceptíveis

Os hospedeiros susceptíveis ao *T. vivax* são diversos e, dentre eles estão os ovinos, caprinos, bovinos e antílopes, sendo que os antílopes são os principais hospedeiros selvagens acometidos no continente africano (SILVA et al., 1997). Tendo em vista os hospedeiros susceptíveis ao *T. vivax*, observa-se que os ruminantes possuem maior predisposição a adquirir a enfermidade (BOWMAN, 2009).

Leak (1999) definiu que para o estabelecimento da tripanossomíase no hospedeiro, fatores como vetor, ambiente e imunidade devem favorecer o protozoário e falhar em relação a proteção do hospedeiro. Fato observado por Felipe; Kataoka (2019) que afirmaram em seus estudos que a resistência do hospedeiro ao surgimento da sintomatologia da tripanossomíase dependerá do estado nutricional do animal, sua imunidade e também do meio e da quantidade de inoculação do parasita no organismo.

3.2.5 Transmissão

A infecção por *T. vivax* em sua forma cíclica é feita por meio do repasto sanguíneo de moscas hematófagas do gênero *Glossina* spp. mas, na ausência deste vetor, na América do Sul o parasito consegue realizar a transmissão mecânica através de dípteros hematófagos pertencentes principalmente aos gêneros *Stomoxys* spp. e *Tabanus* spp, (PAIVA et al., 2000; KESSLER; SCHENK, 1998).

A infecção pode ainda ser transmitida por fômites contaminados como por exemplo agulhas, que são comumente reutilizadas nas rotinas de vacinação, aplicação de medicamentos e na rotina de ordenha (BASTOS et al., 2017). A transmissão transplacentária também é citada por Batista et al., (2012) como uma possível fonte de infecção.

3.2.6 Patogenia e Sintomatologia Clínica

O ciclo dos Trypanosomatídeos em geral, envolve dois hospedeiros sendo um invertebrado, que é o intermediário e um vertebrado, que é considerado o hospedeiro definitivo (SILVA et al., 2002). Nos insetos que realizam a transmissão biológica, a contaminação ocorre pela ingestão das formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo que nele, ficam alojadas no esôfago e laringe, quando se transformam em epimastigotas (SILVA; SANCHEZ; DÁVILA, 2003). Após 24 horas as epimastigotas migram para o canal alimentar e lá se multiplicam e, depois, seguem em direção a hipofaringe, local em que ocorre a transformação em tripomastigotas e em seguida, na forma metatripanosoma, que é a forma infectante (SILVA et al., 2002). Observa-se que o *T. vivax* fica limitado ao sangue do hospedeiro, não existindo nenhum estágio intracelular durante o processo parasitário (DONELSON, 2003).

Nos mamíferos o ciclo do *T. vivax* é iniciado pela inoculação da forma metatripanosoma, por meio do repasto sanguíneo do vetor intermediário (inseto) (LEAK, 1999). A patogenia será dependente de fatores relacionados diretamente ao animal infectado, tais como condição nutricional, idade, presença de fatores imunodebilitantes tais como gestação e lactação e, também ao ambiente em que está inserido. Nota-se grande variação sintomatológica em bovinos infectados pelo *T. vivax* e, de acordo como estágio da doença no qual o animal se encontra, é possível que sejam observadas as fases subaguda, aguda e crônica (LINHARES et al., 2006).

Sintoma frequente em casos de tripanossomíase, principalmente na fase aguda, a anemia pode ser explicada pela hemólise extravascular com queda na eritropoiese e presença de processos hemorrágicos (ANOSA; LOGAN-HENFREY; SHAW, 1992). Já os processos

hemorrágicos que também podem ser observados na doença são decorrentes da trombocitopenia e queda dos fatores de coagulação. A trombocitopenia por sua vez pode ser explicada pela fagocitose plaquetária, aglomeração plaquetária e coagulação intravascular disseminada, ambas decorrentes do processo parasitário (OLUBAYO; MUGERA,1985).

A fase subaguda resulta em morte do animal em poucas semanas após a instalação da infecção (GARDINER et al., 1989). Já a fase crônica é aquela em que a parasitemia é baixa ou ausente e, foi caracterizada por Pereira et al., (2018) como a fase em que animais mesmo com sintomatologia não evoluem para óbito. Apesar da sintomatologia ser evidente em grande parte dos casos, deve-se observar a possibilidade também de existirem animais assintomáticos (LOPES et al., 2018).

A presença do parasito no organismo por longos períodos de tempo, como ocorre na fase crônica, é justificada pela capacidade de produção de diferentes glicoproteínas variantes de superfície por parte do *T. vivax* e, tais variações resultam em não reconhecimento por parte do sistema imunológico do hospedeiro e, conseqüente manutenção do agente no organismo infectado (SILVA et al., 2002; DONELSON, 2003).

A presença de sintomas em determinados sistemas é justificada pela migração do parasito para aquele sítio (BEZERRA; BATISTA, 2008). Machado et al., (2021) observaram a migração do *T. vivax* para diferentes tecidos de caprinos infectados experimentalmente e, notaram que nos tecidos coletados (testículo, pele, linfonodos, fígado, baço e tecidos adiposos perirrenal e peritesticular) havia a presença de reação inflamatória mononuclear, observada na forma de infiltração de plasmócitos, macrófagos e linfócitos, além de todas as amostras teciduais terem sido positivas para a IFI (amostras obtidas através da vaporização em tampão), reforçando a ideia de que esses tecidos podem ser usados como um local de fuga para o parasito.

De forma geral, alguns dos sintomas observados podem compreender episódios de febre, apatia, mucosas pálidas, queda de produtividade, alterações reprodutivas, emagrecimento progressivo, sintomas neurológicos e, em casos severos a infecção pode resultar em morte do animal. Segundo Andrade Neto et al., (2019) períodos de seca, somados a escassez de alimentos em vacas lactantes, levam a baixa efetividade do sistema imune, o que pode levar a sintomas mais evidentes da doença.

A queda acentuada na produtividade bem como a perda de peso e problemas reprodutivos também foram sintomas observados por Pereira et al., (2018). Destaca-se ainda que a redução da produção de leite é um dos sintomas mais relatados em casos de surtos por *T.*

vivax (BASTOS et al., 2017; SOUZA et al., 2019; SANTANA et al., 2019). Bastos et al (2008) relataram queda de 15 litros diários de leite produzidos para 2 litros após os primeiros relatos da doença em uma propriedade.

Os problemas reprodutivos também são relevantes e, podem ser observados abortos, repetição de cio, retenção de placenta, infertilidade e morte de neonatos (OGWU; NJOKU, 1987). O nascimento de bezerras fracas em decorrência da tripanossomíase foi observado por Batista et al., (2008) e SCHIMITH et al., (2020). Silva et al., (2013) atribuíram a ocorrência de aborto pela febre que ocorre durante os picos de parasitemia, que podem acometer tanto o útero quanto no embrião, ou podem ocorrer também em decorrência do processo inflamatório gerado pela parasitemia na placenta.

Em estudo feito por Cadioli et al., (2012) a sintomatologia nervosa foi associada a infecção por *T. vivax* e, era notada na forma de ataxia, dismetria e fraqueza muscular. Batista et al., (2008) observaram ainda sintomas que incluíam salivação, opstótono, nistagmo, tremores, bruxismo e, todos os animais com esta sintomatologia morreram entre 4 e 8 dias após o início dos sinais clínicos. Segundo Batista et al., (2007) as alterações nervosas podem ser justificadas pela presença do parasito nos tecidos nervosos e no fluido cerebrospinal, o que resulta em distúrbios autoimunes, degeneração e inflamação tecidual nervosa.

Em machos também podem ser observados sintomas decorrentes da infecção por *T. vivax*, podendo ser notados quadros de febre, que resultam em redução no volume de ejaculado e redução de libido (BITTAR et al., 2015). Bezerra et al., (2008) relataram a presença do parasito em testículos e epidídimos de ovinos, gerando alterações macroscópicas como flacidez e palidez testicular, além de alterações microscópicas como degeneração testicular, hiperplasia do epitélio epididimário e epididimite multifocal.

3.2.7 Alterações Hematológicas

Com relação aos aspectos hematológicos de animais infectados, Pereira et al., (2018) relataram que pouco mais de 95% dos animais soropositivos apresentavam hematócritos com valores abaixo dos de referência. A anemia foi descrita por Silva et al., (2011) como a alteração hematológica mais associada a infecção por *T. vivax*. Lopes et al., (2018) observaram nas avaliações hematológicas em bovino com tripanossomíase a anemia normocítica normocrômica acompanhada de leucocitose. Estes aspectos também foram observados por Andrade Neto et al., (2019) que adicionaram ainda a neutrofilia. A leucopenia em associação a linfocitose é uma

característica da fase crônica da tripanossomíase, justificando também a ocorrência de outras enfermidades concomitantes (BATISTA et al., 2008).

Na avaliação bioquímica, foram constatados por LOPES et al., (2018) além da diminuição da glicose sanguínea, o aumento nos níveis de ureia, creatinina, fosfatase alcalina, asparato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). A queda nos níveis de triglicerídeos, glicose e colesterol é notada principalmente em animais com alta parasitemia e se justificam pelo gasto energético elevado e pela febre que o animal apresenta na fase aguda da doença, já a hipoglicemia é decorrente do uso da glicose como fonte energética do parasito (BARRET et al., 1998).

3.2.8 Diagnóstico

O diagnóstico da tripanossomíase em bovinos pode ser realizado por diferentes formas, incluindo o exame clínico do animal, porém, é necessário ressaltar que existem animais assintomáticos (HURTADO, CASTRO; GIRALDO RÍOS, 2016). As técnicas laboratoriais disponíveis podem ser divididas em diretas, indiretas e moleculares. Algumas delas mencionadas por Silva et al., (2002) são a Técnica de Woo, *Buffy Coat*, Imunofluorescência Indireta, ELISA e PCR e, os autores ainda salientam que a definição sobre o método a ser utilizado deve ser baseada na fase da doença em que o animal se encontra bem como a proximidade com laboratórios para que as amostras sejam enviadas ainda viáveis.

As técnicas parasitológicas como o *Buffy Coat*, Técnica da Gota Espessa e a Técnica de Woo são metodologias diretas, ou seja, fazem a observação direta do parasito e possuem alta especificidade, porém, na fase crônica da doença ou em períodos assintomáticos, em que a quantidade de parasitas no sangue é baixa, a sensibilidade dos testes diminui significativamente (NATULYA, 1990; SILVA; SANCHEZ; DÁVILLA, 2003; CADIOLI *et al.*, 2015). Segundo Junior et al., (2019) a Técnica da Gota Espessa e o *Buffy Coat* apresentam capacidade de detecção semelhantes e, não diferiram quanto a identificação de animais positivos.

Sabendo que os testes parasitológicos não são indicados para a fase crônica da doença ou em períodos de baixa parasitemia, uma alternativa é a utilização do teste sorológico, sendo que os principais exemplos deste tipo de teste são o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e a Imunofluorescência Indireta (SILVA *et al.*, 2002). O teste ELISA é um teste indireto altamente sensível para o diagnóstico do *T. vivax*, que possui a capacidade de fornecer informações epidemiológicas da tripanossomíase do rebanho (CASTILHO NETO et al., 2021). Apesar de

sua sensibilidade, o teste ELISA não possui a capacidade de distinguir quais animais estão em estágios ativos da doença daqueles que já foram curados e também, é ineficiente na detecção de animais nos primeiros dias da infecção (NANTULYA, 1990). Já a Reação de Imunofluorescência Indireta, também é considerada com alta sensibilidade, porém não é capaz de distinguir a espécie de *Trypanosoma*, identificar se o animal está em uma fase ativa da infecção ou se responde bem ao tratamento (CADIOLI, et al., 2015).

Outra alternativa diagnóstica é técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), uma técnica molecular que possui alta sensibilidade e especificidade e que se baseia na amplificação do material genético alvo do estudo em uma pequena amostra (MADRUGA et al., 2006). Este teste em estudo feito por Júnior et al., (2019) foi capaz de identificar 61% das amostras sabidamente positivas, enquanto o teste parasitológico detectou apenas 44,4% destas amostras.

Uma alternativa diagnóstica é a técnica LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop) que foi testada por Cadioli et al., (2015) que a compararam ao PCR em amostras de sangue bovino consideradas como aparasitêmicas e, nessas amostras, o PCR identificou 56,25% de positividade, já o LAMP detectou 93,73%, comprovando que esta é uma alternativa viável para quadros de baixa parasitemia, em que ainda assim o DNA do parasito é identificado. De forma geral, Junior et al., (2019) recomendaram que as técnicas moleculares sejam utilizadas de forma complementar às técnicas sorológicas, principalmente para a detecção de animais que não responderam de forma satisfatória ao tratamento evitando-se assim os resultados falso-negativos.

As alterações causadas pela Tripanossomíase também podem ser percebidas no processo de necropsia dos animais. Batista et al., (2008) encontraram as seguintes alterações: hiperplasia de baço e linfonodos, meningoencefalite, hidropericárdio e petéquias e equimoses no epicárdio. A hepatomegalia e esplenomegalia também foram achados feitos por Anosa, Logan-Henfrey, Shaw (1992).

É importante observar que a tripanossomíase bovina é geralmente uma doença secundária e por isso, nem sempre é a responsável pela sintomatologia, que é o ponto inicial para a investigação laboratorial, portanto, é importante ter em mente que o diagnóstico diferencial é imprescindível (PAIVA et al., 2000).

3.2.9 Tratamento e Controle

Atualmente no Brasil duas bases farmacológicas tem o uso liberado para o tratamento da Tripanossomíase bovina, sendo elas o Aceturato de Diminazeno e o Cloreto de Isometamídium (CASTILHO NETO et al., 2021). As drogas curativas disponíveis no mercado devem ser indicadas em situações nas quais poucos casos acontecem no rebanho e, geralmente são caracterizados por ocorrerem em períodos determinados do ano, como por exemplo a estação das chuvas (SILVA et al., 2002).

Antes da aprovação do Cloreto de Isometamídium como tripanocida do mercado brasileiro, o Aceturato de Diminazeno era utilizado com maior frequência e, de acordo com estudo realizado por Batista et al., (2008), foi eficiente de forma que após o tratamento não foi mais verificada a presença do parasita em esfregaços sanguíneos nem sintomatologia clínica nos animais antes afetados. Porém, atualmente o uso do Aceturato de Diminazeno é indicado em conjunto com o Cloreto de Isometamídium a fim de otimizar o potencial tripanocida do Cloreto de Isometamídium (CEVA SAÚDE ANIMAL, 2019).

Falhas no tratamento podem ser observadas em situações em que existe processo de tolerância do parasita às drogas disponíveis, uso incorreto dos tripanocidas e ao estado de saúde debilitado do animal (GIORDANI et al., 2016). O processo de resistência é uma ameaça para o efetivo controle da doença, daí a importância de ser realizado o correto diagnóstico dos animais, com o objetivo de estabelecer o uso racional dos medicamentos disponíveis naqueles animais que verdadeiramente necessitem de seu uso (CASTILHO NETO et al., 2021).

Cuidados devem ser tomados para que bovinos doentes não sejam introduzidos em um rebanho livre, por isso, é fundamental o cuidado na compra de animais (CADIOLI et al., 2012). Este cuidado foi comprovado por Batista et al., (2008), que evidenciaram a possibilidade de surtos em propriedades livres após a introdução de animais oriundos de fazendas em que existia a presença do *T. vivax*. No que diz respeito ao controle do vetor, o mesmo é feito principalmente com base no uso de inseticidas *pour-on* nos animais e, no uso de armadilhas. É importante ressaltar que o uso dos inseticidas deve ser feito com cautela já que o uso inadequado pode resultar na seleção de vetores resistentes ao tratamento químico (BARROS et al., 2012).

A profilaxia medicamentosa tem seu uso cada vez mais frequente e, é indicada em situações em que os animais do rebanho estão sob forte exposição ao vetor e quando a enfermidade é presente em altos níveis e durante todo o ano, sem que ocorram em períodos específicos como a época das chuvas (SILVA et al, 2002). Segundo o Laboratório Ceva (2019),

produtor do Vivedium® (Cloreto de Isometamidium), o protocolo profilático pode ser feito de duas maneiras distintas, sendo o primeiro com intervalo de 3 em 3 meses e o segundo com intervalos de 4 em 4 meses sendo a dose recomendada de 1mg/kg. O mesmo laboratório também recomenda o uso do Aceturato de Diminazeno duas semanas antes da aplicação da primeira dose profilática, a fim de potencializar a ação do medicamento.

Mesmo possuindo indicação profilática, o Cloridrato de Isometamidium em estudo realizado por Castilho Neto et al., (2021), não foi capaz de eliminar 100 % do agente no rebanho, mas, conseguiu diminuir a carga parasitária dos animais estudados. A prevenção da tripanossomíase no rebanho deve ser baseada em um conjunto de ações profiláticas, de forma que sejam englobados o cuidado com a entrada de novos animais, eliminação de vetores, cautela no uso de agulhas e uso racional dos medicamentos disponíveis (SILVA et al., 2002; BASTOS et al., 2013; HURTADO, CASTRO; GIRALDO-RÍOS, 2016).

A formulação de vacinas contra o *T. vivax* esbarra nos sofisticados mecanismos que o parasito possui, como por exemplo a variação antigênica. Apesar das dificuldades já conhecidas, a identificação de uma proteína de superfície denominada antígeno flagelado invariante de *T. vivax*, resultou em uma vacina produzida com proteína recombinante, que compreende tal região celular, gerando bons resultados em laboratório, sendo esta portanto, uma vacina candidata para controle da Tripanossomíase (AUTHEMAN, et al., 2021).

3.3 NEOSPOROSE BOVINA

3.3.1 Bases Biológicas

O agente etiológico da neosporose é denominado *Neospora caninum*, coccídeo intracelular obrigatório, formador de cistos, pertencente ao filo *Apicomplexa*, a classe *Coccidia*, a ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família *Sarcocystidae*, ao gênero *Neospora* e a espécie *Neospora caninum* (DUBEY et al., 1996). Este protozoário pode ser confundido com o *Toxoplasma gondii* em decorrência a sua similaridade estrutural e biológica (DUBEY et al., 1988). Os ruminantes entram no ciclo deste coccídeo atuando como hospedeiros intermediários, juntamente com equinos, cervos e ratos silvestres. Já os hospedeiros definitivos incluem raposas, coiotes e principalmente o cão (*Canis lupus familiaris*) (ANDREOTTI, et al., 2003).

3.3.2 Distribuição Geográfica e Epidemiologia

No estado do Rio Grande do Sul foram identificados anticorpos contra o agente em 11,4% dos bovinos avaliados (VOGEL; ARENHART; BAUERMAN, 2006). Já na sub-região denominada Estrado 1 do estado do Mato Grosso do Sul, a prevalência estimada para bovinos com anticorpos *anti-N. caninum* foi de 14,9% nos animais e em 69,8% dos rebanhos (OSHIRO et al., 2007). Na região de Uberaba-Minas Gerais, a prevalência para neosporose bovina foi de 26,98% (MENDES et al., 2009).

No estado do Tocantins, os primeiros registros da doença foram feitos em propriedades do município de Araguaína, em que foram identificadas prevalências que variaram entre 12,5% a 33,33% para bovinos soropositivos (MARTINS et al., 2011). Em propriedades leiteiras localizadas na região central do Sudoeste do Paraná, a prevalência para anticorpos *anti-N. caninum* foi de 24% sendo que dos animais positivos, 61% apresentavam pelo menos um problema reprodutivo (LANGONI et al., 2013).

Para Silva et al., (2008) fatores relacionados a ocorrência de Neosporose em propriedades localizadas no estado de Pernambuco, foram os seguintes: escore corporal ruim, nenhuma ou rara assistência veterinária, propriedades com animais de aptidão mista, sistema de criação extensivo, instalações alagadiças, quando trabalhadores não utilizam luvas para manejar fetos abortados e manutenção de animais com histórico de aborto nas propriedades. Corbellini et al., (2006) analisaram que o uso de *pool* de colostro para alimentar os bezerros aumentava em 1,79 vezes a chance de os animais serem soropositivos e, que para cada um cão adicional na fazenda as chances de existir pelo menos uma vaca soropositiva aumentava em 1,13 vezes. A presença de cães nas propriedades também foi um fator de risco apontado por Appelt et al., (2019) que adicionaram a este, a ausência de testes diagnósticos para introdução de novos animais na propriedade.

Já para Sousa (2012) o sexo dos animais, presença de áreas de mata ao redor da propriedade, presença de cães domésticos e animais silvestres e a água utilizada no manejo dos animais e da propriedade, não tiveram influência na ocorrência da doença nos rebanhos analisados, porém, o destino inadequado dos fetos abortados e a presença de animais oriundos de propriedades em que não é feito o sistema de criação consorciada constituem fatores de risco. O tamanho da propriedade também foi citado por Corbellini et al., (2006) como um fator relacionado a ocorrência da doença sendo que vacas de propriedades com território menor,

possuíam chances maiores de positividade quando comparadas as vacas de fazendas maiores e, a justificativa é relacionada ao maior contato de cães com vacas nas propriedades pequenas.

3.3.3 Ciclo Biológico e Patogenia

O ciclo deste protozoário envolve três estágios infecciosos que são: cistos com bradizoítos, taquizoítos e esporozoítos, sendo que os dois primeiros são estágios intracelulares nos hospedeiros intermediários, já os esporozoítos são aqueles que se desenvolvem dentro dos oocistos no processo de esporulação (DUBEY, 2003). Neste processo, o hospedeiro definitivo excreta oocistos do protozoário junto às fezes após cerca de cinco dias da ingestão de cistos com bradizoítos e, tais oocistos esporulam no ambiente cerca de 3 dias após sua eliminação (PARRA et al., 2008). Já esporulados, os oocistos são ingeridos pelo hospedeiro intermediário por meio de água ou alimentos contaminados e, no estômago desses animais, os oocistos são rompidos sendo liberados os esporozoítos infectantes, que ao atingirem as células da mucosa intestinal, transformam-se em taquizoítos, que se dividem e resultam na lesão celular e disseminação da infecção (VOGEL; ARENHART; BAUERMANN, 2006). Alguns esporozoítos utilizam as circulações linfática ou sanguínea para atingirem diversos órgãos do hospedeiro, podendo ser encontrados no cérebro, fígado, pulmões de fetos, coração, placenta e medula espinhal de bezerros (ANDREOTTI et al., 2003; DUBEY; BUXTON; WOUUDA, 2006).

A presença de taquizoítos é um indicativo de infecção aguda ou fase proliferativa, em que ocorre rápida multiplicação do parasito (ANDREOTTI et al., 2003). Em vacas prenhes, os taquizoítos atingem o feto, resultado em lesões fetais e necrose do placentoma, resultando em aborto (GONDIN et al., 1999). De forma eventual, o parasito pode também atingir a glândula mamária e ser eliminado através do leite produzido (DUBEY; LEATHERS; LINDSAY, 1989).

Quando o sistema imune começa a responder, taquizoítos passam a ser chamados de bradizoítos, sendo observados de forma agrupada em cistos teciduais, que ficam localizados em músculos e no sistema nervoso central e que podem ser reativados com o rompimento dos cistos, caso haja queda de imunidade do hospedeiro (ANDREOTTI et al., 2003).

O ciclo do parasito é completado quando o hospedeiro definitivo ingere cistos teciduais contendo bradizoítos localizados nos músculos ou tecido nervoso dos hospedeiros intermediários (DUBEY; BUXTON; WOUUDA, 2006). Uma vez ingeridos, os cistos atingem o estômago e após sofrerem ação das enzimas gástricas, são rompidos e os bradizoítos são liberados (MARGARIDO et al., 2008). A etapa seguinte compreende a invasão das mucosas

intestinais pelos bradizoítos, que após um processo de reprodução sexuada, resultam em oocistos esporulados que por sua vez, são eliminados junto às fezes no hospedeiro definitivo (CORBELLINI et al., 2006). A eliminação dos oocistos pode acontecer cinco dias ou mais após a infecção primária acontecer, e o processo de eliminação no ambiente pode ocorrer de forma esporádica e durar de um a vários dias (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

A patogenia da doença é complexa, existindo diversos fatores com capacidade para influenciar o aborto, que é o principal aspecto avaliado dentro dos rebanhos leiteiros, tais como idade, imunidade materna e época de infecção (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Em geral vacas soropositivas em estágio gestacional, não conseguem passar anticorpos anti-*N. caninum* para o feto, o que resulta em ocorrência de lesões fetais e consequente aborto (CARDOSO et al., 2008). Bruhn et al, (2012) explicaram que vacas soropositivas e gestantes apresentam aumento na taxa de anticorpos, que apenas a protegem, e não ao feto, o que possibilita que ocorra uma alta taxa de passagem dos parasitos pela placenta, favorecendo o aborto. Os resultados encontrados por Almería et al., (2010) sugeriram que a gravidade dessas lesões placentárias e a forte resposta de IFN-g, decorrente de uma tentativa de controlar a alta parasitemia no feto, pode ser a causa da morte e consequente aborto do bezerro.

O risco de aborto é elevado e a transmissão para o feto é baixa porém, quando ocorre infecção durante o terço final da gestação, o risco de aborto se torna menor mas, a chance de transmissão transplacentária é maior, resultando em transmissão congênita (QUINN et al., 2002). Este fato acontece em decorrência da baixa produção de progesterona e Th2, citocina responsável pela imunidade humoral durante os primeiros meses gestacionais. Aqueles bezerros que nascem com neosporose congênita geralmente possuem cistos contendo bradizoítos localizados no cérebro e/ou na medula espinhal (ANDREOTTI et al., 2003).

De forma geral, o número de parasitos encontrados nos tecidos abortados ou em tecidos fetais é baixo e, tal fato pode ser explicado pela expulsão fetal ocorrer antes que aconteça a multiplicação do parasito em grande escala no feto ou tecidos uterinos (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Debates sobre o *N. caninum* ser o verdadeiro agente causador do aborto ou se é apenas um agente oportunista existem, porém, evidências demonstram que o *N. caninum* é sim o patógeno primário (DUBEY, 2003).

3.3.4 Transmissão

A transmissão da neosporose bovina pode envolver os mecanismos horizontal e vertical. A transmissão horizontal é o resultado da ingestão de pastagem ou água contaminada com fezes de cães contendo oocistos ou através de restos placentários e fetos abortados (DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006). Já a transmissão vertical é aquela que se mostra mais relevante em um rebanho e, acontece quando o *N. caninum* é transmitido da mãe para o feto através da placenta (ANDREOTTI et al., 2003).

A transmissão vertical ou congênita foi inicialmente sugerida por Hein et al., (2012), que identificaram significativa associação entre a sorologia de mães positivas e suas filhas positivas. Segundo Cardoso et al., (2008) até 95% dos bezerros nascidos de vacas soropositivas foram infectados de forma congênita, não apresentando nenhuma sintomatologia após o nascimento sendo este o principal alvo de identificação através de exames laboratoriais visto que esses animais, podem disseminar a doença pelo rebanho sem que sejam percebidos.

É importante compreender também a forma de transmissão para os carnívoros, que são agentes importantes no ciclo da doença. Esses animais podem adquirir a infecção pela ingestão de tecidos contaminados, como restos placentários e de fetos abortados, daí a importância de que esses materiais sejam retirados do ambiente (DUBEY, 2003).

De forma experimental, bezerros recém-nascidos, alimentados com *pool* de colostro de vacas positivas, se tornaram soropositivos por um período de até 21 semanas, demonstrando que anticorpos colostrais podem gerar resultados falso positivos nesses animais (CARDOSO et al., 2008). Touros também podem ser agentes de transmissão para o *N. caninum* através do sêmen e, apesar do risco desta transmissão ser baixo, não deve ser desconsiderado (ORTEGA-MORA, 2003).

3.3.5 Sintomatologia

Em bovinos os principais aspectos clínicos relacionados à ocorrência de *N. caninum* são as falhas reprodutivas, que incluem abortos e os sinais neurológicos nos recém-nascidos (ANDREOTTI et al., 2003). Em vacas soropositivas, Langoni et al., (2013) observaram que o retorno ao estro, seguido de aborto foi uma característica relevante e frequente. Estupiñan et al., (2019) encontraram a repetição de cio como única variável reprodutiva com relação estatística para animais soropositivos.

Segundo Dubey (2003) o aborto causado pela neosporose pode ser observado em gado de leite e de corte, podendo ocorrer entre os três meses de gestação e até que o feto esteja a termo porém, a maior parte é observada entre os 5 e 6 meses de gestação Segundo Orlando et al., (2013) a morte fetal pode acontecer por lesões placentárias, lesões no feto ou em ambos.

Quando ocorre nos primeiros meses de gestação, a infecção pode resultar em morte fetal, absorção embrionária ou autólise do embrião já quando ocorre tardiamente, a infecção pode resultar em mumificação ou aborto (DUBEY, 2003). Quando nascem, bezerras que sofreram com a infecção intrauterina, podem apresentar sintomatologia que inclui dificuldade de locomoção, peso reduzido e sintomatologia neurológica ou serem congenitamente infectados, porém, sem sintomas (ALMERIA et al., 2009; DUBEY, 2003).

As lesões macroscópicas nos fetos abortados por *N. caninum* não foram observadas por Orlando et al., (2013) porém, as lesões microscópicas compatíveis com a doença foram observadas com maior frequência no coração, seguido de musculatura esquelética, encéfalo e fígado. No SNC a lesão característica da neosporose é percebida como um foco de infiltração de células mononucleares em torno de uma zona central de necrose DUBEY; BUXTON; WOUDA, 2006).

3.3.6 Diagnóstico

A detecção da Neosporose bovina deve ser feita com base em um conjunto de fatores, que englobam sintomatologia clínica, histórico de todo o rebanho e por fim, análises laboratoriais. Porém, ressalta-se que o diagnóstico final baseado apenas na análise clínica não apresenta precisão, visto que os animais podem ser assintomáticos e quando presentes, os sintomas são inespecíficos (ANDREOTTI et al., 2003). O diagnóstico laboratorial pode ser feito a partir de técnicas moleculares, histopatológicas, imuno-histoquímicas ou sorológicas sendo que a última, pode ser através da IFI, ELISA ou aglutinação direta (DUBEY; SCHARES, 2011).

A análise da presença do parasito em tecidos de fetos abortados é uma das formas de ser confirmada a doença e, pode ser feita a partir de técnicas como PCR e imuno-histoquímica (ORLANDO et al., 2013). Para os exames histopatológicos, podem ser coletadas amostras de tecido cerebral, de coração, pulmão e musculatura esquelética e, a presença de células inflamatórias mononucleares em associação a presença focal de necrose é o indicativo de positividade (CORBELLINI et al, 2002).

Para realizar o levantamento soroepidemiológico em bovinos no estado do Paraná, Camilo et al., (2010) utilizaram como técnica a IFI para detecção de IgG. Segundo Meirelles et al., esta técnica pode utilizar além do soro, o leite, como material biológico, sendo que a sensibilidade para o leite como material foi de 80,7% enquanto a especificidade foi de 100%, mostrando a viabilidade deste tipo de amostra.

Macêdo-Júnior et al., (2011) observaram que a IFI apresenta como limitação o fato da subjetividade de interpretação dos resultados por parte do responsável pela análise. Apesar da diversidade de técnicas, observa-se que os métodos sorológicos como a IFI e o ELISA não são capazes de comprovar que a causa do aborto foi em decorrência da presença do *N. caninum*, sendo esta confirmação feita apenas pela observação direta do parasito ou de seu material genético (ANDREOTTI et al., 2003).

3.3.7 Tratamento e Controle

Nenhum tratamento comercial está disponível para animais positivos para *N. caninum* (ANDREOTTI et al., 2017; MAJEWSKI et al., 2020). Apesar de não existir tratamento específico, corantes fenotiazínicos foram testados por Pereira et al., (2020) que concluíram que esses corantes representam um grupo com potencial para compor formulações para o controle da neosporose, sendo observados efeitos antiparasitários relevantes.

O controle da doença é feito com a identificação e descarte de animais positivos, adoção de manejo sanitário rigoroso, utilização de receptoras e doadores de material genético comprovadamente negativos e cuidado com os cães que vivem na propriedade (SILVA et al., 2008; PARRA et al., 2008; SOUSA, 2012). Segundo Andreotti et al., (2003) a estimativa de prevalência de animais positivos no rebanho é feita de forma eficiente através da testagem sorológica de 30 a 50 vacas em lactação, que são selecionadas de forma aleatória.

O produtor deve ter em mente que a introdução de novos animais ao rebanho é uma rota importante para o parasito entrar na propriedade e, por este motivo, recomenda-se que novos animais sejam previamente testados para serem colocados em contato com os outros animais da propriedade. (ANDREOTTI et al., 2003). A preocupação com os cães próximos ao rebanho da propriedade também é válida, visto que esses animais fazem parte do ciclo do parasito. Deve-se evitar que cães tenham contato principalmente com membranas placentárias, que podem apresentar grande quantidade do parasito e constituem fonte importante de contaminação para estes animais (DUBEY, 2003; CORBELLINI et al., 2006). Não existem vacinas capazes de

prevenir a eliminação de oocistos de *N. caninum* junto às fezes dos cães portanto, deve-se evitar que cães tenham acesso as fontes de água e alimentos fornecidos para os bovinos (MARGARIDO et al., 2008).

Bielsa; Romero; Heuer (2004) avaliaram o uso de uma vacina inativada de *N. caninum* e, chegaram à conclusão de que efeitos colaterais que podem acontecer com o uso de algumas vacinas, como por exemplo a redução da produção de leite, não foi percebida no referido estudo e, notou-se como benefício a redução nos índices gerais de abortos relacionados a doença. Porém até o momento não existem vacinas disponíveis para comercialização no mercado brasileiro, evidenciando a necessidade das medidas de controle da doença através de ações preventivas (ANDREOTTI et al., 2017).

3.4 LEPTOSPIROSE BOVINA

3.4.1 Bases Biológicas

A Leptospirose bovina é causada por bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira* spp., existindo diferentes sorotipos capazes de acometer bovinos e diversas outras espécies, inclusive os humanos (MADRUGA; DIEDERICHSEN; SCENK, 1982). É uma bactéria gram-negativa, aeróbia e por seu formato, recebe a classificação de espiroqueta. Duas espécies são atribuídas a esta bactéria: *Leptospira interrogans* que possui diversos sorovares patogênicos e a *Leptospira biflexa* cujos sorovares não causam doença, sendo classificados como saprófitas (FAINNE et al., 1999). Com relação aos sorovares, sabe-se que são variáveis de acordo com a região, porém, nos bovinos o que parece ter maior relevância pela ocorrência é o sorovar Hardjo (HERRMANN et al., 2012; SARMENTO et al., 2012).

As leptospiras são capazes de permanecerem viáveis no solo e na água por longos períodos, devido a temperatura ótima para seu crescimento ser de 30° C, porém, a resistência dessas bactérias a períodos de seca bem como luz solar, desinfetantes comuns e antissépticos é baixa (LANGONI, 1999; LEVETT, et al., 2006). Apesar de ser comumente associada a roedores, bovinos, suínos, equinos e cães, diversos animais silvestres também são reservatórios importantes da bactéria. O homem entra no ciclo como um hospedeiro terminal e acidental (BRASIL, 2014).

3.4.2 Distribuição Geográfica e Epidemiologia

A Leptospirose é uma zoonose comum principalmente nas regiões tropicais do mundo e, é listada como uma das principais enfermidades capazes de acometer bovinos (MATSUNAGA et al., 2007; FISCHER et al., 2018). No Brasil os primeiros registros de Leptospirose bovina datam de 1917, outros relatos foram feitos no ano de 1957, quando a doença foi percebida em bovinos leiteiros que apresentavam casos de aborto e queda de produtividade (FREITAS et al., 1957).

A prevalência de animais reagentes para Leptospirose, no Pantanal de Mato Grosso do Sul foi de 79,80%, sendo que os sorovares mais frequentes foram Hardjo seguido de Wolffi (MIASHIRO et al., 2018). Já no estado de São Paulo, a soroprevalência em vacas leiteiras com idade igual ou superior a 24 meses foi de 49,4% em que os principais sorovares responsáveis também foram Hardjo em associação ao sorovar Wolffi além de ser observado também que a *Leptospira* spp. está distribuída por todo estado de São Paulo (CASTRO et al., 2008).

Silva et al., (2012) observaram que os fatores de risco associados a presença de casos de Leptospirose em bovinos foram a presença de capivaras, rebanhos bovinos com 32 ou mais fêmeas adultas e presença de equinos. Para Figueiredo et al., (2009) os fatores de risco associados à ocorrência da infecção foi a exploração de bovinos de corte e em bovinos da raça zebu. A raça zebuína e a exploração de corte também foram relatadas como fatores de risco por Miashiro et al., (2018) que encontraram também como fator de risco o tamanho da propriedade, sendo que quanto maior a propriedade, maiores são os riscos envolvidos na ocorrência da leptospirose.

No que diz respeito a associação entre pluviosidade e prevalência de bovinos positivos, Mineiro et al., (2007) observaram que houve relação positiva entre a infecção e a pluviometria, sendo observado aumento de casos no período chuvoso, porém, não houve associação positiva entre temperatura e infecção. De forma contrária Matsunaga et al., (2007) indicaram que a osmolaridade e temperatura possuem sim influência positiva no processo de transcrição gênica relacionada a entrada de leptospiros advindas de uma fonte ambiental para o hospedeiro mamífero portanto, temperatura e osmolaridade auxiliam no processo da infecção.

3.4.3 Patogenia

A penetração da bactéria no organismo acontece através das mucosas nasal e oral, conjuntiva e pele, esteja ela íntegra ou não (ADLER, 2014). Após o rompimento da barreira

física da pele ou mucosas, as leptospiras dão início ao processo de multiplicação na linfa, sangue ou líquido, até que os órgãos alvo sejam atingidos (FAINE, 1982).

Durante este processo de migração e multiplicação, as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos sofrem com a ação mecânica das bactérias, resultando em lesão nos capilares, formação de trombos, bloqueio do fluxo sanguíneo, edema, hemorragia e coagulação intravascular disseminada (FAINE, 1982). Os distúrbios hemolíticos acontecem geralmente no segundo ou terceiro dia em que o animal apresenta febre e, pode coincidir com a diminuição da temperatura (FIGUEROA et al., 1984). Durante este processo de leptospiremia, todos os fluidos corporais podem conter a bactéria, mas, não são todos que representam uma via de infecção importante para o processo (JAMAS et al., 2020).

Com o início da resposta imune, as leptospiras começam a ser eliminadas da corrente sanguínea e dos órgãos, com exceção daqueles em que o sistema imunológico não consegue atuar de forma eficiente e, nesses locais, a bactéria se abriga e inicia o processo de multiplicação (FAINE et al., 1999). Alguns desses locais de abrigo da bactéria são o pulmão, coração, rins, sistema nervoso, baço e fígado (FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; HIGINO; AZEVEDO, 2014).

Nos rins, a bactéria realiza o processo de replicação nas células do epitélio renal e, como consequência, são observados distúrbios como a nefrose e nefrite intersticial (TOCHETTO et al., 2012). As espiroquetas passam então a serem eliminadas através da urina, sendo este um importante meio de contaminação para outros animais e humanos (EVANGELISTA; COBURN, 2011).

3.4.4 Transmissão

As fontes de infecção relacionadas aos bovinos são pastagens e alimentos em geral ou água infectados pela urina contendo *leptospira* ou fetos abortados e fluidos uterinos contaminados. A monta natural e a inseminação artificial também são fontes de transmissão caso o sêmen do animal utilizado no processo esteja contaminado (BROD; FEHLBERG, 1992; PEGORARO, 2018).

Bovinos também podem funcionar como fonte de infecção, tanto para outros animais como para humanos, principalmente trabalhadores rurais, suas famílias e magarefes que podem ter contato direto com os fluidos corporais dos animais (CORRÊA et al., 2013).

3.4.5 Sintomatologia

A depender da cepa infectante e de aspectos relacionados ao hospedeiro, a infecção pode resultar em diferentes sinais clínicos (BROD; FEHLBERG, 1992). De forma geral, a infecção pode ser diferenciada em fase aguda e crônica. Na forma aguda, que ocorre geralmente em animais jovens e vacas lactantes, podem ser observados sintomas como febre, icterícia, meningite, hemoglobinúria, nefrite, mastite e hematúria e, esses sintomas, podem resultar em morte do animal, já a forma crônica é observada como diversos distúrbios reprodutivos e no nascimento de bezerros fracos (FISCHER et al., 2018).

Geralmente são os problemas reprodutivos que chamam a atenção dos produtores, principalmente o aborto, que acontece com maior frequência entre o 5º e 6º mês de gestação (LANGONI et al., 1999). Fetos mumificados, aumento no intervalo entre partos, irregularidade no cio, infertilidade e retenção de anexos fetais também são problemas reprodutivos que podem ser relacionados a quadros de Leptospirose (PEGORARO, 2018).

Em bezerros com mais de um mês de vida, a sintomatologia observada pode ser febre, anorexia, hemorragias petequiais em mucosas, icterícia, dispneia, aumento da frequência cardíaca e apatia (FIGUEROA et al., 1984). Observa-se também a possibilidade de que a infecção permaneça inaparente nos hospedeiros de manutenção (MADRUGA; DIEDERICHSEN; SCHENK, 1982).

3.4.6 Diagnóstico

O diagnóstico da Leptospirose em bovinos é feito através de observação da sintomatologia clínica, histórico reprodutivo e exames laboratoriais (FISCHER et al., 2018). Em laboratório a identificação da Leptospirose pode ser feita através de métodos diretos e indiretos sendo que os diretos, compreendem a cultura bacteriológica e a reação em cadeia de polimerase (PCR) e os indiretos são baseados nas técnicas de ELISA e o teste de aglutinação microscópica (MAT) sendo este o método oficial (padrão ouro) para diagnóstico da doença.

Sabendo que o método MAT é baseado na reação entre antígeno e anticorpo, é importante que sejam utilizadas cepas de sorogrupos já conhecidos na região de origem do animal mas, aqueles sorovares de alta ocorrência nos bovinos, independente da região, também devem ser testados (PEGORARO, 2018). Ressalta-se, porém, que este método sorológico não é capaz de diferenciar anticorpos vacinais daqueles resultantes do processo infeccioso, sendo este fato confirmado por Tonin et al., (2009) que identificaram presença de novos sorovares,

em bovinos previamente testados, após a vacinação. Importante observar que um mesmo animal pode estar infectado por diversos sorovares ao mesmo tempo.

O teste ELISA que também pode ser empregado na identificação de animais soropositivos, possui alta sensibilidade e maior segurança para o operador por não utilizar cepas vivas, porém, deve ser empregado como um teste de triagem em inquéritos epidemiológicos, já que não é capaz de identificar os sorovares envolvidos e a intensidade da produção de anticorpos específicos (TOMICICH, et al., 2009). Já o PCR tem como característica a alta especificidade e sensibilidade, conseguindo diferenciar leptospiras de um mesmo grupo e seus sorovares (GANOZA et al., 2006).

A observação direta de *Leptospira* spp. também pode ser realizada e, é feita através de visualização da bactéria em microscópio de campo escuro, identificando o agente através da morfologia e da motilidade da bactéria. Os materiais biológicos utilizados para este exame são: urina, conteúdo gástrico e fetos abortados (LANGONI, 1999). Para a detecção de leptospiras no sêmen, Dias et al., (2006) utilizaram a técnica de eletroforese capilar já Heinemann et al., (1999) adotaram a técnica de PCR para realizar a mesma detecção.

Devido à similaridade de sintomas gerados pela infecção por *Leptospira* spp. com aqueles gerados por outras doenças, o diagnóstico diferencial se faz necessário. Nota-se também a possibilidade de existir a concomitância de doenças em um mesmo rebanho, como identificado por Junqueira et al., (2006) que observaram altas taxas de soropositividade para leptospirose, IBR e BVD em um mesmo grupo de animais. Zanatto et al (2019) fizeram a observação sobre a dificuldade em identificar um único patógeno responsável pela sintomatologia de aborto, notando que existe a possibilidade de uma associação de agentes infecciosos serem capazes de resultar neste distúrbio reprodutivo.

3.4.7 Tratamento e Controle

O tratamento de vacas positivas com dose única de Sulfato de Estreptomicina associado ao protocolo vacinal foi testado por Tonin et al., (2009) com o objetivo de melhorar os índices reprodutivos na propriedade e, os resultados obtidos demonstraram que tais medidas foram eficientes para melhorar o índice de prenhez, de vacas em lactação, de diminuir o número de abortos, redução do número de animais com cios irregulares e de bovinos que foram descartados, além de zerar o número de animais com icterícia. A eficiência deste mesmo medicamento foi comprovada por Girio et al., (2005), que observaram redução significativa da

leptospirose nos bovinos tratados. Resultados semelhantes também foram encontrados por Saldanha et al., (2007) sendo que 92% dos animais tratados com Sulfato de Estreptomicina em dose única retornaram a vida reprodutiva.

No que diz respeito a profilaxia, a adoção de programas de vacinação é considerada uma medida eficaz para proteção do rebanho e, conseqüente redução da transmissão para os seres humanos (FISCHER et al., 2018). Segundo Gaspar; Minho; Santos (2015) a vacinação para leptospirose deve ser feita após o desmame, com reforço após 4 a 6 semanas e revacinação anual.

Um ponto a ser observado sobre a vacinação é que mesmo que as vacinas comerciais não possuam todos os sorovares existentes, a proteção cruzada pode acontecer. Arduino et al., (2009) observaram que uma vacina sem o sorovar Wolffi foi capaz de induzir a produção de anticorpos aglutinantes contra este sorovar no organismo do bovino vacinado que foi analisado, reforçando a importância e a eficiência da vacinação.

Controlar as vias de infecção (água e alimentos contaminados, fômites e sêmen) e as fontes da infecção (cães, ratos, outros bovinos contaminados e animais silvestres) bem como aplicar as medidas profiláticas e de tratamento aos hospedeiros susceptíveis, constituem as principais ações para evitar a disseminação da doença no rebanho e, que trabalhadores ligados a produção sejam também infectados (SIMÕES et al.,2016). A assistência veterinária entra neste cenário como um importante aliado na saúde do rebanho e da saúde pública visto que este profissional é capaz de identificar todos os fatores envolvidos no ciclo da doença e indicar as formas de prevenção e tratamento (PEGORARO, 2018).

3.5 LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

3.5.1 Bases Biológicas

O agente causador da Leucose Enzoótica Bovina é um vírus RNA de fita simples, denominado Vírus da Leucose Bovina (VLB), pertencente à família *Retroviridae*, e ao gênero *Deltaretrovirus* (AGOTTANI et al., 2019). O VLB é ainda classificado como um retrovírus tipo C exógeno, que possui capsídeo icosaédrico envolvido por um envelope derivado da membrana celular do hospedeiro (FENNER et al., 1993).

Presente principalmente em bovinos leiteiros, o VLB não é capaz de permanecer viável fora do organismo de seus hospedeiros por longos períodos, sendo inativado em temperaturas

iguais ou superiores a 56°C por 30 minutos, além de serem sensíveis a produtos como éter, clorofórmio e álcool (FENNER et al., 1993).

3.5.2 Distribuição Geográfica e Epidemiologia

Exames realizados em vacas leiteiras da região de Garanhuns (PE) em 2013, identificaram prevalência de 20,7% da doença sendo que em 63,2% dos rebanhos analisados, foi identificado pelo menos um animal positivo (SANTOS et al., 2013). Amostras de 15 municípios da região Norte do estado do Tocantins, demonstraram prevalência de 37,0% da doença (FERNANDES et al., 2009).

No estado do Maranhão, a frequência da enfermidade foi estimada em 53,80% dos animais analisados sendo estes, distribuídos em 98,91% dos rebanhos (SANTOS et al., 2011). A prevalência da Leucose em bovinos na microrregião de Teresina (PI) foi estimada em 19,52%, com pelo menos um animal positivo nos 14 rebanhos analisados (RABÊLO et al., 2020).

Em três microrregiões do Triângulo Mineiro-MG (Uberaba, Araxá e Frutal), a soroprevalência de Leucose em bovinos foi estimada em 19,1% sendo que em 79,5% das propriedades, foi identificado pelo menos um animal positivo (MACÊDO; BITTAR; BITTAR, 2013).

Dentre os fatores de risco envolvidos na ocorrência da Leucose observados por Santos et al., (2013), foi evidenciado que os animais criados em sistema intensivo apresentavam 19,1% a mais de chances de se infectarem e, propriedades que utilizavam a palpação retal para diagnóstico gestacional também tinham maior número de animais doentes quando comparadas a propriedades que não realizavam esta técnica. Na região Norte do estado do Tocantins, Fernandes et al., (2009) identificaram que a presença de ordenha mecânica foi um fator relacionado a ocorrência da Leucose sendo que em propriedades que adotavam este sistema de ordenha, a prevalência da doença foi de 54,0%, contra 36,3% de positividade nas propriedades em que a ordenha era manual.

Santos et al., (2011) observaram que a prevalência da doença foi maior em animais com mais de 48 meses de idade e, dentre os fatores analisados que favoreceram a presença do vírus estava o uso compartilhado de agulhas e luvas de palpação, ausência de assistência veterinária e animais criados em sistema de estabulação. Contrariando Santos et al., (2011) Rabêlo et al., (2020) não encontraram relação entre a ocorrência da doença e o uso de agulhas e luvas

reutilizadas, porém, fatores como a exploração do tipo leiteira, regime de criação semi-intensivo, procedência do rebanho e a ausência de assistência veterinária foram associados significativamente à Leucose.

Para Macêdo; Bittar; Bittar (2013) a soroprevalência em animais do Triângulo Mineiro foi maior em fêmeas lactantes e naquelas propriedades que adotavam sistemas de manejo intensivo ou semi-intensivo, que tinham a prática de ordenha mecânica e que adotavam a inseminação artificial como manejo reprodutivo.

3.5.3 Patogenia

Possuindo como característica a evolução crônica, a Leucose Enzoótica Bovina possui caráter infectocontagioso e, uma vez que o animal entra em contato com o vírus, permanecerá positivo para o resto da vida (MALATESTINIC, 2003). O caráter crônico é, portanto, decorrente do fato de que o VLB é um retrovírus e, possui a capacidade de converter seu RNA viral em DNA pró-viral e, a partir daí, se integrar ao genoma das células do hospedeiro, o que dificulta o reconhecimento do vírus como um agente agressor (SANTOS et al., 2011).

O processo infeccioso começa a partir da interação entre as glicoproteínas presentes no envelope viral e os receptores da superfície celular do hospedeiro. O VLB possui como principal alvo os linfócitos B, porém, já foi observada também a presença do material genético do vírus em células T, monócitos e granulócitos (SILVA et al., 2008). A doença em sua forma clínica, pode ser percebida de duas maneiras distintas sendo elas a linfocitose persistente e a presença de linfossarcomas (ORLIK; SPLITTER, 1996).

A linfocitose persistente é notada pelo aumento de 40 a 80 % de linfócitos em relação aos valores normais (BURNBY et al., 1985). Segundo Souza et al., (2011) esta característica é uma consequência do aumento de linfócitos B e, acontece pela redução do processo de apoptose das células CD5+, que por sua vez são a maior população celular infectada durante o processo patogênico do vírus.

Já no organismo, o VLB possui tendência a invasão do sistema linfoide, resultando em desorganização de tecidos e órgãos, principalmente nos linfonodos, que tem seu tecido normal substituído por tecido neoplásico, gerando os linfossarcomas (SILVA et al., 2008). Os linfossarcomas podem ainda ser malignos, com formações multicêntricas nos animais adultos ou benignos, caracterizados por processos linfoproliferativos em diferentes estruturas do organismo (AGOTTANI et al., 2019).

Orlik; Splitter (1996) observaram que a linfocitose persistente resulta em falha no reconhecimento de proteínas virais, o que dificulta o processo de reconhecimento de antígenos além de ser observado também, que o VLB resulta em queda de eficiência das células T, disfunções na estrutura e funcionalidade dos anticorpos, além de diminuição do número de mioglobinas e das células que as produzem. Em decorrência dessas modificações, o sistema imunológico do bovino infectado é afetado e, a imunossupressão gerada pode resultar em processos infecciosos secundários de grande relevância (SILVA FILHO et al., 2011).

3.5.4 Transmissão

A transmissão do vírus pode acontecer de forma horizontal ou vertical sendo que ambas acontecem através da transmissão de linfócitos infectados. A transmissão horizontal acontece pelo contato com fluídos contaminados, principalmente com sangue, e, comumente ocorre através do uso de agulhas reutilizadas, transfusão sanguínea, compartilhamento de luvas de toque retal e a adoção da monta natural como forma de reprodução, sendo esta via descrita como principal no processo de disseminação da doença (SANTOS et al., 2011). Os artrópodes hematófagos também podem atuar como vetores mecânicos na transmissão do VLB (SANTOS et al., 2013).

A transmissão vertical acontece principalmente pela placenta, porém, representa não mais que 8% dos casos de infecção e, pode acontecer também através da ingestão de leite ou colostro contaminado (AGOTTANI et al., 2019). Lucas et al., (1980) comprovaram que o sêmen pode transmitir o VLB, entretanto, neste estudo existe a possibilidade de que o material analisado tenha sido contaminado com sangue, que por sua vez poderia conter linfócitos infectados. A viabilidade da contaminação através de amostras de sêmen misturado a linfócitos infectados com o VBL foi testada e, apenas uma em cada quatro novilhas foi infectada, sendo sugerido pelos autores que o sêmen fresco possui um fator inibitório que impede que o vírus estabeleça a infecção (ROBERTS et al., 1982).

3.5.5 Sintomatologia

É aceita a ideia de que uma vez positivos, os animais serão portadores do vírus por toda a vida, entretanto, nem sempre animais positivos apresentarão tumores ou formações tumorais que são características da enfermidade (SILVA et al., 2005). A linfocitose persistente é

considerada uma manifestação comum e pode ou não preceder o surgimento de estruturas tumorais (SILVA et al., 2008).

As formações tumorais (linfossarcomas) são estruturas com textura e tamanho variáveis, presentes em diversos órgãos e, são notadas geralmente entre 2 a 5 anos após a infecção (SILVA FILHO et al., 2011). A depender de sua localização, os linfossarcomas podem resultar em diferentes problemas como quando localizados no abomaso, podem gerar úlceras e obstruções, o que resulta em anorexia, diarreia, emagrecimento e timpanismo recorrente, já quando localizados atrás do globo ocular, pode ser percebida a exoftalmia (JIMENEZ FILHO; VALLE, 2013; SILVA et al., 2008). A dificuldade na hora da parição já foi outro aspecto relevante relacionado a presença de linfossarcomas quando estes estavam localizados na região dorsal do útero (SILVA FILHO et al., 2011).

Em estudo feito por Silva Filho et al., (2011) todos os animais abatidos com diagnóstico de Leucose apresentavam aumento de volume nos linfonodos superficiais. Podem também ser percebidos nos animais infectados a queda de produtividade, alterações reprodutivas, palidez, depressão e paralisia progressiva dos membros posteriores (SILVA et al., 2008; PEIXOTO et al., 2010; JIMENEZ FILHO; VALLE, 2013). Segundo Silva Filho et al., (2011) as manifestações neurológicas não são comuns e acontecem como consequência da compressão da medula pela presença do linfossarcoma na região.

3.5.6 Diagnóstico

O médico veterinário pode dispor de técnicas como a análise clínica, exames sorológicos (Imunodifusão em Ágar Gel e Ensaio Imunoenzimático - ELISA), análises moleculares como o PCR, avaliações histopatológicas através da análise de materiais coletados por biópsia, análise hematológica e observações feitas no exame *post-mortem* (CAMARGOS, 2001; AGOTTANI et al., 2019; LEITE; LOBATO). Observa-se, porém, a possibilidade de os animais infectados não apresentarem nenhuma alteração clínica ou hematológica (SILVA et al., 2005). Outro ponto a ser enfatizado no que diz respeito ao diagnóstico, é que os anticorpos são percebidos no soro dos animais após um período que varia entre 4 a 8 meses após o contágio portanto, existe a possibilidade de um resultado sorológico ser falso negativo caso seja feito dentro desta janela imunológica (OLIVEIRA et al., 1997). É possível também que sejam encontrados resultados falso positivos, quando a análise é feita em animais até 6 meses de idade, que tenham se alimentaram do colostro de vacas infectadas (AGOTTANI et al., 2019).

A análise através de sintomatologia clínica é possível, porém, devido a inespecificidade de alguns sintomas apresentados, a conclusão diagnóstica é dificultada, mas, quando somada aos achados *post-mortem*, como a presença de estruturas tumorais em órgãos ricos em tecido linfóide, resultam em um diagnóstico conclusivo (LEITE; LOBATO; CAMARGOS, 2001; SILVA et al., 2008). Na análise clínica feita por Peixoto et al., (2010) em um animal doente, foram observados sinais como apatia, anorexia, palidez de mucosas, dificuldade do animal em se manter em estação, porém, as frequências cardíacas e respiratórias estavam dentro dos limites normais.

As alterações macroscópicas que podem ser percebidas na necropsia de animais infectados compreendem linfonodos com aumento de volume, coloração alterada, áreas de necrose, ascite, coração com nódulos e de coloração pálida, esplenomegalia além de massas neoplásicas que podem ser observadas em diversos órgãos como por exemplo intestino, rins, útero e coração (SILVA et al., 2008; PEIXOTO et al., 2010).

As análises hematológicas são capazes de fornecer informações sobre a presença de linfocitose persistente, quadro altamente sugestivo de infecção causada pelo VLB, porém, ressalta-se que não encontrar a linfocitose não possibilita concluir que o animal não está infectado (BRAGA et al., 1998). Silva Filho et al., (2011) encontraram nos animais positivos, além da leucocitose persistente, leucocitose média e neutrofilia. A baixa nos níveis de glicose foi outro achado feito por Silva et al., (2008) que justificaram este fato devido a glicose ser utilizada como fonte de energia para o vírus.

As possibilidades de análises sorológicas são diversas e, após realizar a comparação entre a prova de ELISA e a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) para detecção da Leucose em bovinos, Molnár et al., (1999) concluíram que o método ELISA é mais sensível e por isso é a prova recomendada para o diagnóstico da doença. A IDGA também foi o método selecionado por diferentes inquéritos epidemiológicos da Leucose Enzoótica Bovina (FERNANDES et al., 2009; SANTOS et al., 2011; SANTOS et al., 2013; RABÊLO et al., 2020).

3.5.7 Tratamento e Controle

Não existe tratamento específico para tratar a infecção por VLB sendo instituídos protocolos terapêuticos de suporte, porém, caso já existam linfossarcomas, a terapia que busca fortalecer o sistema imune é insatisfatória (SILVA et al., 2008). A adoção de protocolos

vacinais também não é possível visto que não existe vacina disponível para a Leucose Enzoótica Bovina portanto, o controle da doença se dá principalmente através de medidas de controle e prevenção (BRAGA et al., 1997).

Santos et al., (2011) apontaram que o uso repetido de agulhas bem como de luvas obstétricas aumenta as chances de transmissão do vírus dentro do rebanho. Sendo assim, o cuidado com a utilização de quaisquer instrumentos que possam carrear o VLB deve ser uma constante nas propriedades (SILVA et al., 2008).

A obtenção de bezerros negativos, provenientes de animais positivos, foi observada através da substituição do colostro de animais positivos por aqueles de vacas sadias ou pelo tratamento pelo calor do leite materno que era fornecido aos bezerros, mostrando que a verificação do colostro e leite fornecidos é importante para o controle da doença dentro do rebanho (BRAGA et al., 1997). Fato foi corroborado por Santos et al., (2013) que evidenciaram a eficiência do tratamento térmico do colostro na prevenção de novos casos de Leucose.

Sabendo da importância dos insetos hematófagos na disseminação mecânica do vírus, Santos et al., (2013) comprovaram que em propriedades que realizavam o controle de moscas, o fator de proteção conferido ao rebanho foi significativo. Sendo este também o veículo de outras doenças como o caso da tripanossomíase bovina, é fundamental que o controle seja feito de forma rigorosa e estratégica nas propriedades (SILVA et al., 1997)

Braga et al., (1997) demonstraram que a eliminação daqueles animais positivos, em propriedades com baixos níveis de infecção, foi uma medida eficiente para erradicar a infecção. Porém, em surto observado por Meirelles et al., (2009) em um rebanho leiteiro criado em sistema intensivo, o descarte apenas de animais soropositivos que tinham baixa produtividade, foi insuficiente para controle da Leucose. A partir dessas considerações, nota-se que o critério de eliminação dos animais positivos deve ser rigoroso já que se não for bem elaborado, pode resultar em continuidade da presença da doença no rebanho.

A segregação dos animais positivos daqueles animais negativos, também foi uma alternativa testada por Braga et al., (1997) porém, foi observada a dificuldade de realizar dois manejos distintos dentro de um mesmo rebanho e o risco de novas contaminações, mas, os autores enfatizam que os resultados observados neste caso são satisfatórios e representam uma alternativa para que os produtores não precisem descartar todos os animais.

A introdução de novos animais na propriedade também deve ser cuidadosa. Segundo Braga et al., (1997) o sucesso dos protocolos de controle e erradicação da doença dentro de um

rebanho implicam na necessidade de serem utilizados para substituição, apenas animais comprovadamente negativos e, que como forma de precaução, esses animais devem ser mantidos isolados até que um reteste seja feito. A assistência veterinária também é importante, visto que a análise criteriosa e constante do rebanho, pode identificar de forma precoce, a ocorrência da doença bem como os fatores de risco que a favorecem (SANTOS et al., 2011).

3.6 RINOTRAQUEITE INFECCIOSA BOVINA (IBR)

3.6.1 Bases biológicas

O agente causador da Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR) é o Hesperivirus Bovino (BoHV) pertence à Família *Herpesviridae*, Subfamília *Alphaherpesvirinae* e ao gênero *Varicellovírus*, sendo classificado como um vírus envelopado, cujo genoma viral consiste em DNA de dupla cadeia e que tem os subtipos BoHV-1.1, BoHV 1.2a e BoHV- 1.2b (COSTA et al., 2017). Quadros relacionados a problemas respiratórios e reprodutivos são geralmente associados ao subtipo BoHV-1.2a, enquanto sintomas respiratório leves, balanopostite pustular e vulvovaginite pustular infecciosa são associados ao subtipo BoHV- 1.2b. Porém, Spilki et al., (2004) não identificaram diferenças com relação a patogenicidade dos subtipos 1 e 2a sobre o trato respiratório.

3.6.2 Distribuição Geográfica e Epidemiologia

No Brasil o primeiro relato da doença data do ano de 1962 no estado da Bahia, já no ano de 1978 aconteceu o isolamento do vírus BoHV-1 pela primeira vez, sendo este, feito a partir de pústulas vaginais de vacas também na Bahia (ROCHA et al., 1999). No mesmo ano, o vírus foi isolado em um rim de feto bovino, proveniente de uma vaca abatida em São Paulo (MUELLER et al., 1978).

No ano de 2009, inquérito soropidemiológico feito na região de Uberaba-MG, apontou soroprevalência de 80,15% de animais positivos (MENDES et al., 2009). Vieira et al., (2003) analisaram amostras de soro bovino no estado de Goiás e, através de ensaio imunoenzimático, encontraram frequência de 83% de anticorpos para o BHV-1.

No ano de 2013, no estado da Paraíba, estimou-se prevalência de 65,5% de positividade para IBR (FERNANDES et al., 2016) enquanto em rebanhos de diferentes mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul, a prevalência da doença variou de 54,4 a 60,3% (SOUZA et al.,

2017). Almeida et al., (2021) analisaram vacas leiteiras da região do Caparaó- ES e, encontraram positividade de 26% no teste ELISA.

Barbosa et al., (2019) analisaram os fatores de risco relacionados à ocorrência da infecção por BoHV-1 que foram os seguintes: rebanhos superiores a 100 fêmeas, presença de ordenha mecânica, não realização de protocolos de inseminação artificial e a compra de animais sem uma frequência específica. Em avaliação feita no município de Senador Guiomard, localizado no estado do Acre, notou-se que a variável ausência de assistência veterinária nas propriedades analisadas foi o fator de associação com maior significância estatística para ocorrência da infecção (ARRUDA et al., 2019).

3.6.3 Patogenia

A replicação viral ocorre nas células epiteliais localizadas nas mucosas respiratória, genital ou conjuntival e, a disseminação do agente pode ocorrer por via sanguínea, nervosa ou tecidual e, nas terminações nervosas, o vírus BoHV-1 fica em estado latente nos gânglios (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001). Uma vez infectado primariamente, o animal se torna portador por toda vida, atuando como possível fonte de infecção (BORTOT; BARIANI; ZAPPA, 2009).

Este estado de latência é uma característica pertencente aos vírus da Subfamília *Alphaherpesvirinae* e, pode ser interrompido por processos de estresse ou queda imunológica sendo caracterizado pela presença do material genético viral nos neurônios sem que haja qualquer tipo de expressão gênica, replicação e conseqüente aparecimento de sinais clínicos (ZANELLA; FLORES, 1995). Tal habilidade de latência é atribuída ao fato de que o vírus induz a uma imunidade de curta duração no hospedeiro (PAULA et al., 2014).

A disseminação para os tecidos oculares também acontece a partir da cavidade nasal através do ducto lacrimal e, resulta principalmente em conjuntivite (VIU et al., 2014 a). O acometimento de tecidos nervosos também é possível e, ocorre a partir da contaminação da mucosa nasal através do nervo trigêmeo e resulta em meningoencefalite (ACKERMANN; ENGELS, 2006).

Nas fêmeas gestantes, a infecção pode se limitar a vaca ou comprometer o desenvolvimento do embrião, resultando em abortos, principalmente no primeiro trimestre gestacional, nascimento de bezerros com anomalias caso a infecção aconteça após o quinto mês e, caso a infecção aconteça no final da gestação os bezerros podem nascer normais, porém com

títulos de anticorpos presentes (PELLEGRIN et al., 1997). Em touros isolados virais já foram percebidos em até 361 dias após infecção experimental e, a sintomatologia começou a ser percebida cerca de 13 dias após o primeiro isolamento viral feito nos animais (WEIBLEN et al., 1991).

A possibilidade de inexistência de sintomas também existe, acontecendo quando o vírus está em estado de latência nos gânglios linfáticos e, acredita-se que a reativação do vírus ocorre por meio de seu transporte via sistema nervoso, a partir dos gânglios periféricos, de forma que ele retorne ao foco primário da infecção e lá gere os sintomas (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

3.6.4 Transmissão

A transmissão do BoHV-1 pode acontecer de forma direta, através do contato com mucosa ou secreções de animais contaminados (secreções nasais, genitais, oculares, sêmen e/ou contato com anexos fetais de animais contaminados) ou de forma indireta, que ocorre através de aerossóis ou fômites (ACKERMANN; WYLER, 1984; KUPFERCHMIED et al., 1986). Embrião e feto também podem ser contaminados pela via transplacentária (PAULA et al., 2014). No que diz respeito a transmissão por fômites, sabe-se que a inseminação artificial possui importante papel e, quando ocorre, pode implicar em problemas reprodutivos nas vacas que passaram pelo protocolo, resultado em infertilidade, absorção embrionária, abortos e endometrite (ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999).

Biotecnologias da reprodução como a transferência de embriões ou inseminação artificial, também são potenciais transmissores do vírus, quando utilizam materiais, gametas ou embriões contaminados (KUPFERCHMIED et al., 1986; VIU et al., 2014 a; COSTA et al., 2017). Sabe-se que no sêmen, o BoVH-1 tem a capacidade de permanecer viável por até sete dias quando conservado em temperaturas de 4°C, sendo considerados os processos de criopreservação seminal utilizados nas biotecnologias da reprodução, ideais para a preservação do vírus (ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999).

3.6.5 Sintomatologia

A depender da via de penetração do vírus no organismo, o agente causará um grupo de sintomas, que podem ser diferenciados entre sintomas respiratórios ou síndrome genital, sendo elas denominadas de Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR) ou Vulvovaginite/Balanopostite

Pustular Infecciosa (IPV/IPB) (ACKERMANN; WYLER, 1984; VIU et al., 2014 a). Observa-se ainda que em casos de primo-infecção, o vírus possui a capacidade de permanecer em estado de latência, com conseqüente possibilidade de ausência de sintomatologia clínica (MÉDICE; ALFIERI; ALFIERI, 2000).

Takiuchi; Alfieri; Alfieri (2001) citam como sintomas a presença de lesões erosivas na mucosa nasal, rinite, dispnéia e aumento da temperatura corporal. Podem ainda ser observados a salivação excessiva, queda de produtividade e corrimento nasal que pode ser seromucoso ou mucopurulento (OPAS/OMS, 2007). A manifestação clínica também pode ser percebida através de problemas oculares e esta forma, pode ser ou não associada a forma respiratória (VIU et al., 2014 a). Os sintomas percebidos neste caso podem incluir conjuntivite, geralmente biocular com presença de descarga transparente (SANCHES et al., 2000).

Já a forma genital, nas fêmeas, pode ser observada clinicamente pelo surgimento de vesículas que variam entre 1 e 2 mm de diâmetro e que em seguida evoluem para a forma de pústulas e erosões na área vaginal e vulvar (ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999). O epitélio vulvar pode se apresentar edemaciado, com áreas de hiperemia e com presença de secreções que podem apresentar aspecto purulento em decorrência a infecções secundárias (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001). Na forma genital em machos, o vírus possui a capacidade de replicação principalmente na mucosa prepucial e na uretra, vindo daí a capacidade de contaminação do sêmen durante o processo de ejaculação e, nesses animais, podem ser encontrados processos de aderência do prepúcio ao pênis além de poderem ser observados pequenos nódulos na mucosa prepucial e no pênis, que evoluem para pústulas (ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999).

O vírus em questão possui também a capacidade de gerar problemas reprodutivos, sendo estes a causa de grande perda econômica e, pode ser observado na forma de infertilidade temporária, endometrite necrosante, hemorragia ovariana, absorção embrionária e aborto (PAULA et al., 2014; COSTA et al., 2017). Quando a infecção acontece após o quinto mês gestacional, é possível que os bezerros nasçam com alterações congênitas, como por exemplo dificuldade na locomoção (PELLEGRIN et al., 1997).

3.6.6 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo do processo infeccioso pode ser feito a partir do isolamento viral, por meio da detecção de antígeno/material genético do vírus ou sorologia sendo que esta,

é capaz de fornecer informações epidemiológicas relevantes sobre a prevalência da doença no rebanho estudado (MÉDICE; ALFIERI; ALFIERI, 2000). As técnicas sorológicas empregadas para detecção do BoHV-1 compreendem a soroneutralização viral e o teste ELISA. Já um exemplo de detecção de DNA viral é o PCR, que é capaz de identificar animais positivos na forma latente da doença (SILVA et al., 2009). Porém, Costa et al., (2017) constataram que a observação do material genético viral durante o estágio de latência é possível apenas quando as amostras utilizadas são originárias dos sítios de latência viral.

Para realizar o isolamento viral deve-se coletar amostras de secreções nasais, genital e/ou oculares, além de serem utilizados também amostras de tecidos de fetos abortados e dos anexos fetais (COSTA et al., 2017). O diagnóstico baseado em sintomatologia clínica é difícil e isso, é devido ao fato da diversidade de sinais clínicos e a similaridade desses mesmos sinais com outras doenças de cunho parasitário ou infeccioso, o que dificulta o diagnóstico conclusivo (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001).

3.6.7 Tratamento e Controle

O controle da IBR deve ser feito com base na identificação de animais positivos, cuidado na introdução de novos animais no rebanho, controle rigoroso dos protocolos de biotecnologias da reprodução adotadas na propriedade bem como do material genético utilizado (ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999). Sabendo que uma vez contaminado o animal se torna positivo para o resto da vida, é recomendado que os animais positivos, quando possível, sejam eliminados do rebanho ou que sejam isolados, porém, tal manejo é oneroso e pouco atrativo aos produtores (PAULA et al., 2014).

Os protocolos de vacinação são adotados e recomendados em propriedades com alta prevalência da enfermidade, visto que possuem a capacidade de reduzir a eliminação do vírus além de prevenir o desenvolvimento de sintomatologia clínica, porém, não impedem que o vírus fique em estado de latência (VIU et al., 2014 a). As vacinas podem ser encontradas em apresentações distintas: inativada, atenuada termossensível, recombinante, atenuada convencional, vírus marcado e atenuada, sendo no Brasil autorizadas para comercialização as inativadas ou termossensíveis atenuadas, bivalentes (IBR/VIP e BVD) e polivalentes (IBR/VIP, BVD, Parainfluenza bovina tipo 3 e *Leptospira* spp.) (PITUCO, 2009; VIU et al., 2014a). O protocolo de vacinação dentro da propriedade, deve ainda se ater ao fato de que algumas vacinas

disponíveis no mercado não devem ser aplicadas em vacas gestantes visto que as mesmas podem induzir ao aborto (CAVALCANTE, 2000).

Não existe tratamento específico para a IBR, sendo utilizados medicamentos para combater os sintomas e controlar possíveis infecções secundárias, sendo indicados para isso, antibióticos de amplo espectro, antitérmicos, mucolíticos e anti-inflamatórios (CAVALCANTE, 2000; BARTOT; BARIANI; ZAPPA, 2009).

3.7 DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD)

3.7.1 Bases Biológicas

Denominado Vírus da Diarreia Viral Bovina- BVDV, o agente causador da Diarreia Viral Bovina pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Pestivirus* (RIDPATH, 2010). Este agente possui como principal componente a glicoproteína E2 que é o maior alvo de resposta imune protetora contra a infecção causada pelo BVDV, visto que esta glicoproteína ancora à membrana das células infectadas pelo vírus (NELSON et al., 2012).

O vírus da BVDV possui dois biotipos que são diferenciados conforme sua replicação em culturas celulares, sendo eles: citopatogênico e o não citopatogênico e, possui também dois genótipos principais que são denominados BVDV-1 e BVDV-2 (BROWNLIE et al., 1987). O tipo não-citopatogênico possui a importante característica de ser capaz de atravessar a barreira placentária e estabelecer no feto a infecção persistente (BIELEFELDT-OHMANN, 1995). Já o tipo citopatogênico é menos frequente e é considerado uma mutação do tipo não-citopatogênico (SAMARA; DIAS; MOREIRA, 2004). É importante ressaltar que em um mesmo animal, os tipos do vírus podem ser isolados ao mesmo tempo, como já comprovado por Bianchi et al., (2011).

Exames sorológicos não são capazes de distinguir qual o biotipo responsável pela infecção, mas, de forma molecular esta diferenciação é possível, utilizando para tanto a identificação da proteína p80, que é produzida pelo vírus citopatogênico (FINO et al., 2012).

3.7.2 Distribuição Geográfica e Epidemiologia

A doença é descrita no Brasil desde a década de 60 e desde então, tem se mostrado disseminada por todo o país (FLORES et al., 2005). O vírus é capaz de infectar ruminantes

doméstico, silvestres e suínos, sendo que os bovinos são considerados os hospedeiros naturais do BVDV (FINO et al., 2012).

A prevalência da doença é variável, sendo dependente de fatores como a densidade de animais, sistema de criação, programa de vacinação, manejo adotados na propriedade, medidas de biossegurança e aptidão do rebanho (FINO et al., 2012). Em estudo feito em 376 vacas lactantes não vacinadas, provenientes de 10 propriedades localizadas na região Sul de Minas Gerais e Nordeste de São Paulo, foram identificadas vacas reagentes em todas as fazendas, sendo que a frequência de positividade dentro dos rebanhos variou entre 12,28 a 100,00% (DIAS; SAMARA, 2003). Saliki; Dubovi (2004) estimaram que os animais persistentemente infectados representam menos de 1% da população bovina.

A prevalência de animais positivos para BVDV, no teste ELISA em animais provenientes de propriedades leiteiras nas regionais de Pedreiras e Bacabal, no estado do Maranhão, foi de 69,44% (CHAVES et al., 2009). Isolados do vírus causador da BVD foram avaliados genotipicamente em amostras provenientes do Rio Grande do Sul, coletadas entre os anos de 2000 e 2010 e, o resultado encontrado foi de que 95% das amostras pertenciam ao biotipo não-citopatogênico, e, em uma amostra (5%) foram encontrados os biotipos não-citopatogênico e o citopatogênico (BIANCHI et al., 2011).

Em animais com histórico de problemas reprodutivos, no município de Uberlândia-Minas Gerais, a prevalência de anticorpos neutralizantes anti-BVDV foi de 45,1% (BARBOSA et al., 2019). Levantamento realizado em rebanhos leiteiros por Freitas et al., (2021) entre maio de 2015 e agosto de 2018 no estado do Paraná, a soroprevalência de animais persistentemente infectados no estado foi de 1,78%, oscilando entre 0,3 e 8,9% nos 37% de rebanhos com animais positivos. Em Caparaó- Espírito Santo, a soroprevalência de BVDV foi estimada em 26% (ALMEIDA et al., 2021).

Chaves et al., (2009) observaram que fatores comumente relacionados à ocorrência da BVD, tais como a idade dos animais, assistência veterinária, manejo de reprodução, presença de alterações reprodutivas, tipo de ordenha e produção leiteira, não tiveram relação com a ocorrência da doença nas propriedades analisadas no estudo. Já Barbosa et al., (2019) concluíram que os fatores de risco associados à infecção por BVDV foram a aptidão mista dos animais (corte/ leite), ausência de quarentena para animais recém introduzidos na propriedade, não utilização de inseminação natural, presença de ordenha mecânica e presença de piquete de parição

3.7.3 Patogenia

Diversos fatores possuem relação direta com a patogenia da BVD, dentre eles podem ser citados a condição física e nutricional dos animais, condições sanitárias e de manejo aos quais estão submetidos, estado imunológico e biotipo viral envolvido (MOREIRA; GONÇALVES; SILVA, 2020). Após penetrar no organismo pelas vias nasal e oral, o vírus multiplica-se nas células epiteliais das tonsilas e nos tecidos linfoides da faringe e da boca e, após esse estágio inicial, segue para a corrente sanguínea através dos vasos linfáticos (MARQUES, 2003). Ao atingir os sistemas circulatório e linfático, o vírus induz a necrose celular, causando morte e danos funcionais às células (FLORES et al., 2005). Linfócitos e megacariócitos são alvos importantes do vírus (POTGIETER, 2004).

Com a aderência do vírus às células alvo, ocorre a interação entre glicoproteínas E2 presente no vírus com os glicosaminoglicanos e proteínas de membrana das células alvo (KREY et al., 2006). Sabe-se que a glicoproteína E2 é o principal componente viral de indução a síntese de anticorpos neutralizantes. Outro aspecto relevante ao mecanismo de ação do vírus BVDV é que o mesmo é capaz de prejudicar a produção de interferon e das células apresentadoras de antígenos, sendo que o organismo animal passa a reconhecer às proteínas virais como antígenos próprios, o que gera destruição de linfócitos B e T (VIU et al., 2014 b).

Quando ocorre a infecção em vacas prenhes pela cepa não-citopatogênica durante os primeiros 180 dias de gestação, não acontece a morte e conseqüente aborto porém, os animais nascem persistentemente infectados, ou seja, serão positivos para o resto da vida (VIU et al., 2014 b). É possível que os animais sejam acometidos pela infecção assintomática, de forma que desenvolvam um quadro imunossupressor com grande propensão a adquirir doenças secundárias em tratos respiratório e gastrointestinal, além de ser possível a ocorrência de distúrbios hemorrágicos (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995). Em casos severos de diarreia causados pelo vírus, sabe-se que estes são decorrentes de ulcerações teciduais no epitélio digestivo do animal e, tais lesões podem ser encontradas também no sistema respiratório e tegumentar dos animais em questão, justificando também a sintomatologia respiratória (FLORES et al., 2005).

Naqueles animais imunocompetentes, a formação de anticorpos ocorre entre duas e três semanas após a infecção acontecer, e esses anticorpos são então capazes de realizar a neutralização do vírus e impedir que ele chegue aos órgãos alvo ou ao feto (BROWNLIE,

2002). Já o feto na ausência de imunocompetência, pode ser abortado entre 10 dias até meses após a infecção acontecer (FINO et al., 2012).

3.7.4 Transmissão

A transmissão do vírus acontece através de saliva, secreções oculares e nasais, fezes, sêmen, placenta, fômites, sangue e até mesmo através de embriões (MARQUES, 2003). Sabe-se que a partir 180 dias de gestação, o feto torna-se imunocompetente portanto, quando ocorre a contaminação transplacentária antes desse período, pelo biotipo não-citopatogênico, o feto torna-se persistentemente infectado e conseqüentemente, um transmissor permanente do vírus (BIELEFELDT-OHMANN, 1995).

Sêmen e embriões representam uma importante forma de transmissão do vírus da BVD, sendo que o mesmo pode ser eliminado no sêmen de touros persistentemente infectados e/ou imunotolerantes (GROOMS, 2004). Bielanski et al., (2009) observaram que receptoras que receberam embriões expostos ao vírus BVDV, foram infectadas após a transferência do embrião e não tiveram êxito na gestação.

3.7.5 Sintomatologia

A infecção causada pelo BVDV pode resultar em ampla variedade de sintomas clínicos que são relacionados a problemas reprodutivos, respiratórios e digestivos. Naqueles animais imunocompetentes e não prenhes, a doença comumente ocorre de forma subclínica ou assintomática (FINO et al., 2012).

A apresentação aguda da doença das mucosas é caracterizada por febre, queda de apetite, taquicardia, diarreia aquosa, queda da produção de leite, acidose, desidratação, lesões erosivas na mucosa oral e conseqüente morte (FLORES et al., 2005). Em casos graves podem ser observadas também hemorragias em superfícies serosas de vísceras, leucopenia e linfadenomegalia sendo que a leucopenia é decorrente da necrose de linfócitos dentro do centro germinativo das placas de Peyer (SILVA et al., 2011).

Já em infecções de caráter crônico a sintomatologia não é específica e, inclui a perda de apetite e de peso, apatia, diarreia intermitente, timpanismo crônico, ulcerações na mucosa oral e na pele, secreções nasais e oculares (OPA/OMS, 2007). Em animais persistentemente infectados, as formas agudas e crônica das mucosas, que são aquelas causadas pelas amostras citopatogênicas, são consideradas fatais (VIU et al., 2014b).

Os sintomas reprodutivos são percebidos em forma de abortos, teratogenia e mumificações dos fetos, perdas embrionárias e nascimento de bezerros fracos. Podem ser observadas também alterações no sistema reprodutor feminino, como infertilidade transitória (dado o tropismo do vírus pelo ovário), reações inflamatórias em útero e oviduto (FLORES et al., 2005). Nos machos o vírus é relacionado com defeitos morfológicos do espermatozoide, diminuição da mobilidade espermática, queda na concentração de espermatozoides e diminuição na qualidade do sêmen (GROOMS, 2004). No feto a sintomatologia será dependente do estágio em que o mesmo foi contaminado, podendo ser observadas hiperplasia cerebelar, hipoplasia de retina e neurite de nervos ópticos (HIRSH; ZEE, 2003).

3.7.6 Diagnóstico

A doença pode ser diagnosticada a partir do histórico clínico e da observação de lesões macro e microscópicas típicas da enfermidade, porém, o diagnóstico definitivo deve ser laboratorial (SALIKI; DUBOVI, 2004). O padrão ouro para identificação da doença é o isolamento viral em cultivos celulares seguidos da técnica de imunofluorescência e/ou imunoperoxidase para identificação das cepas, sendo este método o recomendado pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) para o trânsito internacional de animais (OIE, 2009).

O patógeno pode ser também identificado através de técnicas como ELISA ou PCR, que são consideradas metodologias de rápida execução e de bom desempenho (HANON et al., 2014). A técnica de ELISA tem a capacidade de identificar animais persistentemente infectados, sendo recomendado para mensurar a prevalência da BVD em rebanhos leiteiros e, pode utilizar como material biológico amostras de soro, leite, sangue total e plasma (RADOSTITS, et al., 2007). Já o RT-PCR é uma técnica capaz de detectar ácidos nucleicos virais a partir de amostras biológicas individuais ou em *pools* de soros sanguíneos de um mesmo rebanho, podendo também ser empregado na identificação de animais persistentemente infectados (PILZ et al., 2007). Segundo Hanon et al., (2014) após a comparação das duas técnicas, o teste RT-PCR se mostrou mais eficiente do que o ELISA para detecção de animais persistentemente infectados.

Observado as diferentes técnicas indiretas para detecção de anticorpos anti-BVDV, tem-se que a soroneutralização é o teste padrão para determinação da ocorrência de títulos desses anticorpos, porém ressalta-se que as titulações podem variar de acordo com o laboratório, estirpe viral analisada e as células empregadas no teste (DIAS; SAMARA, 2003; FINO et al.,

2012). O emprego da soroneutralização em amostras de soro de leite foi testado por Peter et al., (2016) que identificaram a viabilidade deste tipo de material, porém essas amostras fornecem titulação de anticorpos neutralizantes menor quando comparados ao soro sanguíneo, sendo o teste portanto, indicado como triagem para a detecção de possíveis animais doentes. Este teste apresenta como limitação o fato de indicar apenas que o animal teve uma exposição prévia, portanto, em propriedades que fazem a vacinação, este teste é limitado a identificar a eficácia da vacina e o status sorológico do rebanho (FINO et al., 2012). Deve-se salientar o fato de que animais persistentemente infectados podem não ser identificados em triagens sorológicas, já que a titulação de anticorpos pode ser abaixo do ponto de corte do teste ou até mesmo serem nulas (SALIKI; DUBOVI, 2004).

Ainda a respeito dos testes indiretos, tem-se no mercado testes rápidos de ELISA para pesquisa de antígenos e, tais testes utilizam como material biológico amostras de soro, plasma, sangue total e tecido proveniente de incisão na orelha do animal (IDEXX, 2011). A utilização desses testes facilita o diagnóstico da real situação da enfermidade nos rebanhos já que quando utiliza o leite de conjunto do tanque de expansão, permite identificar a real situação epidemiológica do grupo de animais (DIAS; SAMARA, 2003). Aos testes rápidos são atribuídas a alta sensibilidade e especificidade (SALIKI; DUBOVI, 2004).

De maneira geral, considera-se que as metodologias indiretas possuem como facilitadores o baixo custo e a facilidade de execução quando comparadas às metodologias diretas para detecção do BVDV (SILVA et al., 2011). Bezerros podem apresentar anticorpos para BVDV após a ingestão de colostros de vacas vacinadas portanto, o diagnóstico sorológico deve-se ater a este fato (GOMES; SILVA; BACCILI, 2014).

3.7.7 Tratamento e Controle

Não existe tratamento específico para animais infectados com o BVDV, sendo recomendada a utilização de medicamentos para tratamento sintomático e que evitem infecções secundárias (VIU et al., 2014b). Apesar de ainda não serem comercializadas drogas específicas para combater o vírus, estudos que buscam alternativas para o tratamento são contínuos e, dentre eles está a análise feita por Cueto et al., (2011) que identificaram o potencial antiviral do própolis. A atividade antiviral e virucida da melitina, componente presente no veneno de abelhas, em associação a apamina, também foi comprovada frente ao BVDV (PICOLI et al., 2018).

Devido aos diversos prejuízos causados pela ocorrência da BVD em um rebanho, principalmente aqueles relacionados a reprodução, a adoção de medidas de controle e monitoramento da doença, baseados na aplicação de medidas de biossegurança e de contenção da enfermidade e em alguns casos, da vacinação, são medidas indispensáveis (FINO et al., 2012).

No contexto de contenção da doença e prevenção de novas infecções, a identificação dos animais persistentemente infectados é fundamental, visto que esses animais constituem o principal mecanismo de transmissão dentro da propriedade (SALIKI; DUBOVI, 2004).

Ao serem identificados os persistentemente infectados, a recomendação é de eliminação dos mesmos do rebanho, mas, caso esses animais sejam de alto valor zootécnico, pode-se adotar a separação do animal e constante verificação da evolução da doença através de exames laboratoriais (SALIKI; DUBOVI, 2004). Medidas que objetivem controlar o nascimento dos animais PI também são recomendadas, como por exemplo o isolamento de vacas prenhes com suspeita da doença daquelas saudáveis e, em caso de utilização de técnicas de reprodução como inseminação artificial e transferência de embriões, utilizar material genético comprovadamente negativo (CANÁRIO et al., 2009)

O cuidado na introdução de novos animais ao rebanho também deve ser alvo de constante cuidado por parte dos proprietários e colaboradores. Fino et al., (2012) consideraram que a introdução de novos animais a rebanhos negativos, é a principal forma de entrada de animais persistentemente infectados nas propriedades rurais.

O monitoramento da propriedade deve ser feito de forma periódica, utilizando testes laboratoriais que permitam demonstrar a ausência da circulação viral dentro do rebanho ou identificar de forma precoce sua presença e para isso, Saliki; Dubovi (2004) recomendaram a utilização de testes sorológicos, que são capazes de avaliar o status do rebanho quanto à exposição ao vírus BVDV além de ser capaz também de avaliar a eficácia vacinal em rebanhos que adotam este protocolo.

A vacinação é recomendada para aqueles rebanhos livres da doença, mas que estão localizados em regiões endêmicas, sendo que o protocolo vacinal é capaz de reduzir a possibilidade de surtos da doença mas, de modo geral, a vacinação é preconizada para rebanhos com sorologia positiva e histórico de sintomatologia clínica comprovadamente relacionada ao vírus (FINO et al., 2012). Nota-se que a vacina em gestantes, semanas antes do parto, é capaz de estimular a imunidade materna, conferindo proteção para a mãe e o feto, através do mecanismo de imunidade passiva (FULTON, 2005).

No Brasil é permitida a comercialização de vacinas com vírus inativado e com vírus vivo modificado. A resposta imune conferida por vacinas modificadas é considerada eficaz e duradoura além de serem consideradas eficientes em conferir a proteção intrauterina contra o BVDV (FINO et al., 2012). A vacinação utilizando uma vacina viva modificada não deve ser feita em animais estressados visto que nesses animais, a vacina pode causar a imunossupressão do organismo (KELLING, 2004). Já a vacina inativada traz como vantagens a segurança de administração, principalmente para fêmeas gestantes, visto que não promove infecção viral no feto e não são imunossupressoras e suas desvantagens incluem a resposta imune de curto prazo (VIU et al., 2014b). A seleção da vacina a ser utilizada dentro de um rebanho deve ser baseada no histórico do rebanho, condições associadas ao manejo, resposta imunitária, capacidade de proteção fetal, possibilidade de imunossupressão, duração da imunidade entre outros (KELLING, 2004).

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, D.C. et al., Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no Estado de Minas Gerais. **Ciência Animal Brasileira**, p. 672-676, 2009.
- ACKERMANN, M; WYLER, R. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. **Veterinary Microbiology**, v.9, 1984.
- ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 3-4, 2006.
- ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Veterinary Microbiology**, v.172, n.3-4, 2014.
- AGOTTANI, J.V.B. et al., Leucose Enzoótica Bovina. Diagnóstico, Prevenção e Controle. **Veterinária Preventiva**, 2019. Disponível em: <https://www.veterinariapreventiva.com.br/wp-content/uploads/2019/04/artigo1.pdf>. Acesso em: 30 set. 2021.
- ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n.2, 1978.
- ALMEIDA, I.C. Soroprevalência e fatores associados à rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina em vacas leiteiras na região do Caparaó, Espírito Santo, Brasil. **Ciência Rural**, v.51, n.12, 2021.
- ALMERIA, S et al. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, 2009.
- ALMERÍA, S. et al., Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 day of gestation. **Veterinary Parasitology**, v, 169, 2010
- ANDRADE NETO, A.Q. et al., Diagnostic, Clinical and Epidemiological aspects of dairy cows naturally infected by *Trypanosoma vivax* in the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.41, 2019.
- ANDREOTTI, R. et al., **Diagnóstico e Controle da Neosporose em Bovinos**. Campo Grande: EMBRAPA, 2003, 56p.
- ANDREOTTI, R. et al., **Situação atual das estratégias para desenvolvimento de antígenos para o controle da neosporose em bovinos**. Brasília: EMBRAPA, 2017, 50p.
- ANOSA, V.O; LOGAN-HENFREY, L.L; SHAW, M.K. A Light and Electron Microscopic Study of Changes in Blood and Bone Marrow in Acute Hemorrhagic *Trypanosoma vivax* Infection in Calves. **Veterinary Pathology**, v.29, p.33-45, 1992.
- APPELT, M.A. et al., Colinesterase as AN inflammatory marker of subclinical infection of dairy cows infected by *Neospora caninum* and risk factors for diseases. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.66, 2019.
- ARDUINO, G.G.C. et al., Agglutinating antibody titers induced by commercial vaccines against bovine leptospirosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.7, 2009.
- ARRUDA, E.F. et al., Prevalence of bovine alphaherpesvirus type 1 (BoHV-1) and risk factors associated with dairy properties of the municipality of Senador Guiomard, Acre, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.86, 2019.
- AUTHEMAN, D. et al., An invariant *Trypanosoma vivax* vaccine antigen induces protective immunity. **Nature**, v. 595, n.1, 2021.
- BAHIA, M.T. et al., Utilização do eluato de sangue dessecado em papel filtro no diagnóstico sorológico da toxoplasmose caprina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.32, n.2, 1995.
- BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, n.3, 1995.

- BARBOSA, V.M. et al., Fatores de risco associados à infecção viral (BoHV-1 e BVDV) em rebanhos leiteiros mestiços com problemas reprodutivos no município de Uberlândia, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.4, 2019.
- BARRET, M.P. et al., Trypanosome glucose transportes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.9, p.195-205, 1998.
- BARROS, A.T.M. et al., **Mutucas (Diptera: Tabanidae) do Pantanal: Abundância Relativa e Sazonalidade na Sub-região da Nhecolândia**. Corumbá: EMBRAPA, 2003, 20p.
- BARROS, A.T.M. et al., Susceptibility of the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae), to insecticides in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. Jaboticabal, v.21, n.2, 2012.
- BARTOT, D.C; BARIANI, M.H; ZAPPA, V. Rinotraqueíte infecciosa bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.12, 2009.
- BASTOS, T.S.A. et al., Surto de tripanossomose bovina desencadeado após manejo inadequado durante aplicação de medicamento endovenoso. **Ars Veterinária**, v.29, n.4, p.63, 2013.
- BASTOS, T.S.A. et al., First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.26, n.3, 2017.
- BATISTA, J.S. et al., Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.1, 2008.
- BATISTA, J.S et al., Tripanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.2, p.174-181, 2007
- BATISTA, J.S. et al., Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infectious in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, v.110, n.1, p.73-80, 2012.
- BATISTA, J.S. et al., Risk factor for trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle raised in Rio Grande do Norte state. **Animal Parasitology**, v. 85, 2018.
- BEARD, C.W; BRUGH, M. Use of the Nobuto blood sampling paper strip for Newcastle disease serology. **American Association of Avian Pathologists**, v.21, n.4, p.630-636, 1977.
- BEZERRA, F.S.B. et al., *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n.1, 2008.
- BIANCHI, E. et al., Perfil genotípico e antigênico de amostras do vírus da diarreia viral bovina isoladas no Rio Grande do Sul (200-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.8, 2011.
- BIELANSKI, A. et al., Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring, **Theriogenology**, v.71, n.3, 2009.
- BIELEFELDT-OHMANN, H. The pathologies of bovine viral diarrhoea virus infection - a window on the pathogenesis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, 1995.
- BIELSA, J.M; ROMERO, J.J; HEUER, C. **Controle da neosporose em bovinos com Bovilis® Neoguard: A experiência de campo**. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, 2014.
- BITTAR, J.F.F. et al., Evaluation of parameters related to libido and semen quality in Zebu bulls naturally infected with *Trypanosoma vivax*. **BMC Veterinary Research**. v.11, n.261, 2015.

- BOULHOSA, J. **Informação Científica**, Brasília: Boletim Técnico do Ministério da Agricultura, 1946, p.21-26.
- BOWMAN, D.D. **Georgi's Parasitology for Veterinarians**, 9. ed. Missouri: Saunders, 2009.
- BRAGA, F.M. et al., Avaliação de métodos de controle da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina. **Ciência Rural**, v.27, n.4, 1997.
- BRAGA, F.M. et al., Infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV). **Ciência Rural**, v.28, n.1, 1998.
- BRAGA, M.M.D. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.5, p.419-424, 1998.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico**. Brasília, 46p.2014.
- BROD, C.S; FEHLBERG, M.F. Epidemiologia da leptospirose em bovinos. **Ciência Rural**, n.22, v.2,1992.
- BROWNLIE, J. et al., Pathogenesis and epidemiology of bovine virus diarrhoea virus infection of cattle. **Annals of Veterinary Research**, v.18, n.2, 1987.
- BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine diarrhoea virus infections. **Revue Scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v.9, n.1,1990.
- BROWNLIE J. **Bovine virus diarrhoea virus: pathogenesis and control**. In: PROC. XXII WORLD BUIAT. CONG., Hannover, 2002. p.24-30
- BRUHN, F.R.P. et al., Neosporose em ruminantes, **PubVet**, v.6, n.2, 2012.
- BURNY, A. et al., Bovine Leukaemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.52, 1985
- CADIOLI, F.A. et al., First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.21, n.2, p.118-124, 2012.
- CADIOLI, F.A. et al., Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and during aparasitemic periods. **Veterinary Parasitology**. v. 214, n.30, 2015. p.174-177.
- CAMILO, G. et al., Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, 2010.
- CAMUS, E. History of *Trypanosoma vivax* in the world. **Proceedings of first symposium on new world Trypanosomes**. p.1, 1996.
- CARDOSO, J.M.S, et al., Perfil sorológico dos anticorpos colostrais para *Neospora caninum* em bezerros livres de Infecção. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.45, n.5, 2008.
- CARVALHO, A.U. et al., Occurrence of *Trypanosoma vivax* in Minas Gerais state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.6, n.3, 2008.
- CASTILHO NETO, K.J.G.A.C. et al., Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. Jaboticabal, v. 30, n.1, 2021
- CASTRO, V. et al., Soroprevalence of bovine leptospirosis in reproductive-age female bovines in the state of São Paulo, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.1,2008.
- CARDOSO, G.F.M. **Tripanosomíase bovina em rebanhos leiteiros no estado de Mato Grosso**. 2017. 22f. Trabalho de Conclusão (Programa de Residência Uniprofissional em

- Medicina Veterinária- Patologia Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2017.
- CAVALCANTE, F. A. Instruções técnicas – Rinotraqueíte infecciosa bovina (nariz vermelho), diagnóstico e controle. **Embrapa**, n.28, p.1-2, 2000
- CEVA SAÚDE ANIMAL (VIVEDIUM). Tripanocida Injetável para Bovinos à Base de Cloreto de Isometamidium. (Bula). **Ceva Saúde Animal**. 8 p. 2019.
- CHAVES, N.P. et al., Frequência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos leiteiros não vacinados nas regionais de Bacabal e Pedreiras, Estado do Maranhão. **Ciência Animal Brasileira**, 2009.
- COCCA, M; ARIENZO, L.D; D’ORAZIO, L. Effects of different artificial agings on structure and properties of Whatman Paper Samples. **International Scholarly Research Network**, v.2011, p.1-7, 2011.
- CORBELLINI, L.G. et al., Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, 2002.
- CORBELLINI, L. G. et al. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 74, n. 2-3, 2006.
- CORRÊA, J.M.X. et al., Investigação molecular de *Leptospira* spp. em rins bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, 2013.
- COSTA, E.P. et al., BoHV-1 (o vírus da IBR) e sua relação com estruturas e órgãos genitais da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.41, n.1, 2017.
- CUETO, A.P. et al., Antiviral activity of própolis extracts against feline calicivirus, canine adenovírus 2, and bovine viral diarrhea virus. **Ciência Rural**, v.41, n.10, 2011.
- DABUS, D.M.M; CAMPOS, D.F; NEVES, M.F. *Trypanosoma vivax*. **Revista Científica Eletrônica**, v.7, n.161, 2011.
- DIAS, F.C; SAMARA, S.I. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, n.3, 2003.
- DIAS, F.E.F. et al., Detecção de *Leptospira pomona* em sêmen bovino por eletroforese capilar fluorescente. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.43, n.3,2006.
- DONELSO, J.E. Antigenic variation and the African trypanosome genome. **Acta Tropica**, v.85, 2003.
- DUBEY, J.P et al., Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Reports of Original Studies**, v.193, n.10, 1988.
- DUBEY, J. P., LEATHERS, C.W; LINDSAY, D. S. *Neospora caninum*-like protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. **Journal of Parasitology**, v.75, 1989.
- DUBEY, J.P. et al., Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, n.3, 1996.
- DUBBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v.41, n.1, 2003.
- DUBEY, J.P; BUXTON, D; WOUDA, W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, 2006.
- DUBEY, J. P; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, 2007.
- DUBEY, J.P; SCHARES, G. Neosporosis in animals- The last five Years. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.4, 2011.
- EDELBOEK, P. et al., Dried Bold Spot Methods in Therapeutic Drug Monitoring: Methods, Assays, and Pitfalls. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.31, n.3, p.327-336, 2009.

- ESTUPIÑAN, S.C. et al., Serological diagnosis of *Neospora caninum* in cows of Tuta, Boyacá. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, v.66, n.3, 2019.
- EVANGELISTA, K.V; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology pathogenesis ant host immune responses. **Future Microbiology**, v.5, n.9, 2011.
- FAINE, S. et al., **Guidelines for the control of leptospirosis**. 2.ed. Geneve: World Health Organization. 1982.
- FAINE, S. et al., **Leptospira and Leptospirosis**. 2.ed. Melbourne: Medisci Press, 1999.
- FELIPE, C.F.R; KATAOKA, A. Tripanossomíase bovina: uma breve revisão. **Scientific Electronic Archives**, v.12, n.1, p.159-168, 2019.
- FENNER, J.F. et al. **Veterinary Virology**, 2.ed. San Diego: Academic Press, 1993.
- FERNANDES, C.H.C. et al., Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da Leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do Estado do Tocantins, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.3, 2009.
- FERNANDES, L.G. et al., Herd-level prevalence and risk factors for bovine viral diarrhea virus infection in cattle in the State of Paraíba Northeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.48, n.1, 2016.
- FIGUEROA, M. et al., **Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica**. 2.ed. San José: Ened, 1984.
- FIGUEIREDO, A.O. et al., Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.5, 2009.
- FINO, T.C.M. et al., Diarreia bovina a vírus (BVD). **Revista brasileira de Medicina Veterinária**, v.34, n.2, 2012.
- FISCHER, G. et al., **Principais doenças da bovinocultura leiteira**. In: Biosseguridade na Bovinocultura Leiteira. EMBRAPA GADO DE LEITE: Brasília, 2018.
- FLORES, E.F. et al. Infecção pelo vírus da diarreia viral bovina no Brasil –histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.
- FONSECA, F. et al., Avaliação do uso de sangue em papel-filtro para detecção e quantificação de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.2, p.319-324, 2007.
- FREITAS, D.C. et al., Identificação da leptospirose bovina no Brasil. **Revista de Medicina Veterinária de São Paulo**, v. 6, 1957.
- FREITAS, A.M.F. et al., Prevalence of bovines persistently infected with bovine viral diarrhea virus (BVDV) in dairy cattle herds in Paraná State, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.41, 2021
- FULTON, R. W. Vaccines. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1 ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005, p. 209-222.
- GANOZA, C.A. et al., Determing risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface Waters for pathogenic *Leptospira*. **Plos Medicine**, v.3, n.8, 2006.
- GARDINER, P.R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, v.28, 1989.
- GASPAR, E.B; MINHO, A.P; SANFOS, L.R. Manual de Boas Práticas de Vacinação e Imunização de Bovinos. EMBRAPA Pecuária Sul: Bagé. Circular Técnica nº47, 2015.
- GERMANO, P.H. et al., Prevalência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no município de Patos de Minas/MG. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v.15, n.2, p.433-434, 2017.
- GIORDANI, F. et al., The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology**, Cambridge, v. 143, n.14, 2016.

- GIRIO, T.M.S. et al., Uso de estreptomicina na eliminação da leptospirose em touros (*Bos Taurus Indicus*) naturalmente infectados pelo sorovar Hardjo **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.2, 2005.
- GOMES, A.H.S. et al., Avaliação da capacidade de absorção e distribuição de amostras de sangue total em diferentes tipos de papel-filtro. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.63, n.2, p.262-268, 2004.
- GOMES, V; SILVA, B.T; BACCILI, C.C. Vacinação de Bezerras: O que levar em consideração? **Revista Leite Integral**, agosto, 2014.
- GONDIN, L.F. et al., Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.86, 1999.
- GROOMS, D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 20, n.1, 2004.
- GUIMARÃES, M.C.S. et al., Almacenamiento a largo plazo de IgG e IgM em papel filtro para su uso em encuestas seroepidemiológicas de enfermedades parasitarias. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.100, n.2, 1986.
- HANON, J.B et al., Distinction between persistente and transiente infection in a bovine viral diarrhoea (BVD) control programme: Appropriate interpretation of Real Time RT-PCR and Antigen-ELISA test results. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.61, n.2, 2014.
- HEIN, H.E. et al., Neosporose bovina: avaliação da transmissão vertical e fração atribuível de aborto em uma população de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.5, 2012.
- HEINEMANN, M.B. et al., Detection of *Leptospira* spp. from pure cultures and from experimentally contaminated bovine semen by polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 36, n.1, 1999.
- HERRMANN, G.P. et al., Soroprevalência de leptospirose em bovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.1, 2012.
- HIGINO, S.S.S; AZEVEDO, S.S. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica atual no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.1, 2014.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003. p. 360-361.
- HOARE, C.A. **The trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972.
- HURTADO, J.B; CASTRO, P.D.J; GIRALDO-RÍOS, C. Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella)vivax*. **Veterinary Parasitology**. v. 229, p.54-59, 2016.
- IDEXX Laboratories. **BVDV Testing Strategy Guide- Beef, 2011**. Disponível em: <https://www.idexx.com.br/files/bvdv-strategy-guide-beef.pdf>>. Acesso em 27 ago 2021.
- JAMAS, L.T. et al., Leptospirose Bovina. **Veterinária e Zootecnia**, v.27, 2020.
- JIMENEZ FILHO, D.L; VALLE, C.R. Leucose enzoótica bovina- revisão. **PubVet**, v.7, n.21, 2013.
- JÚNIOR, O.L.F. Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.28, n.2, 2019.
- JUNQUEIRA, J.R.C. et al., Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.3, 2006.
- KELLING, C.L. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus vaccines. **The veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v.20, 2014.

- KESSLER, R.H; SCHENK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. EMBRAPA: Campo Grande, 1998.
- KO, A.I; GOARANT, C; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature**, v.7, 2009.
- KREY, T. et al., Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. **Journal of Virology**, v.80, n.8, 2006.
- KUPFERSCHMIED, H.U, et al., Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. **Theriogenology**, v.25, n.3, 1986.
- LANGONI, H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. v.2, 1999.
- LANGONI, H. et al., Avaliação sorológica para *Neospora caninum* em fazendas com gado leiteiro apresentando alterações reprodutivas. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.1m 2013.
- LEAK, S.G.A. **Tsetse Biology and Ecology**, 1.ed. Oxford: Cabi Publishing, 1999.
- LEITE, R. C.; LOBATO, Z. I. P.; CAMARGOS, M. F. Leucose Enzoótica Bovina. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 24, 2001.
- LEVETT, P.N. et al., *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, 2006.
- LIN-WANG, H.T.L; MANRIQUE, R. Aplicação da técnica de imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT) para dosagem de ciclosporina na amostra de sangue absorvido em papel-filtro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, n.4, p.7-12, 2002.
- LINHARES, G.F.C. et al., Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.4, p.455-460, 2006.
- LOPES, S.T.P. *Trypanosoma vivax* em bovino leiteiro. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.46, n.287, p.1-5, 2018.
- LUCAS, M.H. et al., Enzootic bovine leucosis virus in semen. **Veterinary Record**, v.106, 1980.
- MACÊDO-JÚNIOR, A.G. et al., Caracterização de antígenos de *Neospora caninum* para produção de insumos com valor diagnóstico, profilaxia e proteção na neosporose. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.9, n.3, 2011.
- MACÊDO, D.M.R; BITTAR, J.F.F; BITTAR, E.R. Análise de fatores de risco e prevalência da Leucose Enzoótica Bovina em três microrregiões do Triângulo Mineiro. **Revista Encontro de Pesquisa em Educação**, v.1, n.1, 2013.
- MACHADO, R.Z. et al., Detection of *Trypanosoma vivax* in tissues of experimentally infected goats: what is the role of adipose tissue in the life cycle of this protozoon? **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.30, n.4, 2021.
- MADRUGA, C.R; DIEDERICHSEN, W; SCHENK, M.A.M. **Efeito da infecção natural da *Leptospira interrogans* sp. sobre o desempenho reprodutivo de vacas nelore**. EMBRAPA: Campo Grande, Comunicado técnico, nº15, 1982.
- MADRUGA, C.R. et al., **Comparação de métodos de extração do DNA e avaliação de reações da polimerase em cadeia (PCR) para o diagnóstico de *Trypanosoma (Duttonella) vivax***. Embrapa Gado de Corte. Circular Técnica nº 34, 2006.
- MAJEWSKI, R.L. et al., Use of the rapid ELISA portable kit for researching *Neospora caninum* in milk cattle of small rural properties. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.10, 2020.
- MALATESTINIC, A. Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma. **The Canadian Veterinary Journal**, v.44, 2003.

- MARGARIDO, R.S. et al., Neosporose. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.11, 2008.
- MARQUES, D.C. **Criação de Bovinos**. 7. Ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. p.517-519.
- MARTINS, N.E.X. et al., Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em vacas lactantes do município de Araguaína, Estado do Tocantins, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.40, n.3, 2011.
- MATSUNAGA, J. et al., Resposta de *Leptospira interrogans* à Osmolaridade Fisiológica: Relevância da Sinalização da Transcrição Ambiente-para-Hospedeiro. **Infection and Immunity**, v.75, n.6, 2007.
- MÉDICE, K.C; ALFIERI, A.A; ALFIERI, A.F. Ensaio imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. **Ciência Rural**, v.30, n.2, 2000.
- MEI, J.V. et al., Use of Filter Paper for the collection and analysis of Human Whole Blood Specimens. **American Society for Nutritional Sciences**, v.1, p.1361-1636, 2001.
- MEIRELLES, C. et al., Evolução da soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina em um rebanho bovino leiteiro universitário. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.3, 2009.
- MEIRELLES-BARTOLI, R.B; SOUSA, D.B. Leucose enzoótica bovina: importância do desenvolvimento da enfermidade na eliminação viral. **PubVet**, v.7, n.11, 2013.
- MEIRELLES, A.C.F. et al., *Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v.44, n.12, 2014.
- MENDES, M.B. et al., Determinação da Prevalência das principais doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba-MG. **Ciência Animal Brasileira**. IN: Anais do VIII Congresso de Buiatria, 2009.
- MIASHIRO, A.F. et al., Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n.1, 2018.
- MINEIRO, A.L.B.B. et al., Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condição climática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.,59, n.5, 2007.
- MOREIRA, F.A.V.F; GONÇALVES, M.M.A; SILVA, M.C. Impacto do vírus da diarreia viral bovina sobre a reprodução. **Ciência Animal**, v.30, n.4, 2020.
- MUELLER, S.B.K et al., Isolamento e identificação do vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos em um rim de feto bovino (IPV/IBR). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.45, n.3, 1978.
- NANTULYA, V.M. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. **Revue Scientifique et technique**. v. 9, n.2, p.357-367, 1990.
- NELSON, G. et al., Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: A candidate antigen for new Generation of veterinary vaccines. **Vaccine**, v.30, n.22, 2012.
- OGWU, D; NJOKU, C.O. Effect of pregnancy on clinical manifestations of bovine tripanosomiasis. **Veterinary Parasitology**. v.24, n.1-2, p.25-33, 1987
- Oie. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2009**. Organização Mundial de Saúde Animal. Disponível em: < <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>>. Acesso em: 27 ago 2021.
- OLIVEIRA, A.R. et al., Epidemiologia da leucose bovina: ocorrência em várias faixas etárias. **Revista brasileira de Medicina Veterinária**, v.19, n.6, 1997.

- OPAS/OMS. **Manual de procedimentos para a atenção às ocorrências de febre aftosa e outras enfermidades vesiculares.** Projeto BID/PANAFTOSA- OPAS/OMS para países do MERCOSUL Ampliado. Rio de Janeiro: PANAFTOSA- OPAS/OMS, 2007.
- ORLANDO, D.R. et al., Abortos por *Neospora caninum* em bovinos do sul de Minas Gerais, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.11, 2013.
- ORLIK, O; SPLITTER, G.A. Progression to persistent lymphocytosis ant tumor development in bovine leucemia vírus (BLV) - Infected cattle correlates with impaired proliferation of CD4+ T cells in response to *gag*- and *env*- Encoded BLV proteins. **Journal of Virology**, v.70, n.11, 1996.
- ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v.117, 2003.
- OSHIRO, L.M. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.16, n.3, 2007.
- PAIVA, F. et al., *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: I- Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.9, v.2, p.135-141, 2000.
- PARRA, B.C. et al., Neosporose uma doença que acomete abortos em bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.10, 2008.
- PAULA, E.M.N. Principais causas virais de abortamento em bovinos. **PubVet**, v.8, n.16, 2014
- PEIXOTO, T.C. et al., Leucose juvenil multicêntrica bovina- Relato de Caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.32, n.1, 2010.
- PEGORARO, L.M.C. **Biosseguridade na Bovinocultura leiteira.** EMBRAPA: Brasília, 2018.
- PELLEGRIN, A.O. et al., **Doenças da reprodução em bovinos no Pantanal: ocorrência de animais soropositivos para o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia bovina à vírus e Língua azul.** Comunicado Técnico. Corumbá: EMBRAPA, n.20, 1997, p.1-7.
- PEREIRA, H.D. et al., Clinical and epidemiological aspects and diagnosis of *Trypanosoma vivax* in a cattle herd, stat of Maranhão, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 38, n.5, p.896-901, 2018.
- PEREIRA, L.M. et al., Ação inibitória de corantes fenotiazínicos contra *Neospora caninum*. **Scientific Reports**, v. 10, 2020.
- PETER, C.M. et al., Pesquisa de anticorpos contra diarreia viral bovina em soro de leite. **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.3, 2016.
- PICOLI, T. et al., Antiviral and virucidal potential of melittin and apamin against bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhea virus. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n.4, 2018.
- PILZ, D. RT-PCR em pools de soros sanguíneos para o diagnóstico da infecção aguda e de animais persistentemente infectados pelo vírus da diarreia viral bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, 2007.
- PITUCO, E.M. Aspectos clínicos, prevenção e controle da IBR. São Paulo: **Centro de pesquisa e desenvolvimento de sanidade animal**, n.94, 2009.
- POTGIETER, L. N. D. **Bovine Viral diarrhea and mucosal disease: In: Infectious Diseases of Livestock.** 2 ed. Oxford University Press Southerly África, Cape Town. 2004, v. 2, p. 946-969.
- QUINN, H. E.; ELLIS, J. T.; SMITH, N. C. *Neospora caninum*: a cause of immune imediated failure of pregnancy? **Trends in Parasitology**, v. 18, p.391-394, 2002.

- RABÊLO, P.J.V. et al., Prevalence and risk facts the Enzoitic Bovine Leukosis in cattle from microregion Teresina, state of Piauí, Brazil. **Revista Agrária Acadêmica**, v.3, n.6, 2020.
- RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007, 2156 p.
- RIBEIRO, D. Papel de Filtro. **Revista Ciência Elementar**, v.3, n.1, p.88, 2015.
- RIDPATH, J. F. Bovine Viral Diarrhea. Virus: Global Status. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 26, 2010.
- ROBERTS, D.H. et al., Uma investigação sobre a suscetibilidade do gado ao vírus da leucose bovina após inoculação por várias vias. **The Veterinary Record**, v.110, n.10, 1982.
- ROCHA, M.A.; GOUVEIA, A.M.G; LEITE, R.C. Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. **Ciência Rural**, v.29, n.2, 1999.
- SALDANHA, G.M. et al., Sorologia positiva para *Leptospira butembo* em bovinos apresentando problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, 2007.
- SALIKI, J.T; DUBOVI, E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.20, 2004.
- SANCHES, A.W.D. et al., Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.3, 2000.
- SANTANA, A.J. et al., Complexo tristeza parasitária e tripanossomíase em bovinos de Nossa Senhora da Glória- SE. In: SEMANA DE MEDICINA VETERINÁRIA SEMVET-UFAL, IV, 2019, Viçosa. (**Anais de congresso**), Viçosa: UFAL, 2019, v.2, p.1-2.
- SANTOS, H.P. et al., Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos da bacia leiteira do Estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.3, 2011.
- SANTOS, G.R. et al., Análise epidemiológica da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), na microrregião Garanhuns, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n.4, 2013.
- SAMARA, S.I; DIAS, F.C; MOREIRA, S.P.G. Ocorrência da diarreia viral bovina nas regiões do Sul do Estado de Minas Gerais e nordeste do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, 2004.
- SARMENTO, A.M.C. Emprego de estirpes *Leptospira spp.* isolados no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.7, 2012.
- SCHIMITH, R. et al., *Trypanosoma vivax*. Epizootic Infection in Cattle from Espírito Santo State, Brazil. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**. v.8, n.6, 2020.
- SHAW, J.J; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v.66, n.1, 1972.
- SILVA, A.R.B. et al., Perfil sanitário de bovinos da raça curraleiro: sorologia para Leucose Enzoótica Bovina e Diarreia Viral Bovina (Resultados Parciais) In: **Anais eletrônicos do XII Seminário de Iniciação Científica**, Goiânia, UFG, 2005.
- SILVA, A.S. et al., Primeiro Registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2550-2554, 2009.
- SILVA, A.S. et al., Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n.1, 2011.
- SILVA, C.C. **Estudo parasitológico, sorológico e molecular de amostras de sangue de bovinos encaminhadas ao Hospital Veterinário de Uberaba com suspeita clínica de Tripanossomíase por *Trypanosoma vivax***. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos) – Universidade de Uberaba, Uberaba, 2018.

- SILVA, F.J. et al., Prevalence and risk factors of bovine leptospirosis in the State of Maranhão, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.4, 2012.
- SILVA, M.I.S. et al., Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.2, 2008.
- SILVA, M.V.M. et al., Diarreia Viral Bovina: Patogenia e diagnósticos- Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.16, 2011.
- SILVA FILHO, A.P. et al., Lymphosarcoma in cattle from the hinterland of Pernambuco state. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.7, 2011.
- SILVA, R.M. Análise TG-ROC de testes de imunofluorescência no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Revista Saúde Pública**, v.43, n.6, 2009.
- SILVA, R.A.M. et al., Surto de tripanossomíase por *Trypanosoma vivax* em bovinos do Pantanal, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.2, p.13-141, 1996.
- SILVA, R.A.M. et al., **Tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax* no Brasil e Bolívia: sintomas clínicos, diagnósticos e dados epizootiológicos**: EMBRAPA Gado de Corte, 1997. 17 p.
- SILVA, R.A.M.S. et al., *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*. **Biologia, Diagnóstico e Controle**. Corumbá: EMBRAPA, 2002. 137 p.
- SILVA, R.A.M.S., SANCHEZ, V., DÁVILA, A.M.R. **Métodos de Diagnósticos Parasitológicos das Tripanossomoses Bovinas e Equinas**. Corumbá: EMBRAPA, v.1, n.3, 2003.
- SILVA, R.A.M.S. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia**. v.75. Corumbá: EMBRAPA, 2004.
- SILVA, T.M.A. et al., Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. **Ciência Rural**, v. 39, n.9, 2009.
- SILVA, T.M.F. et al., Patogênese da falha reprodutiva induzida por *Trypanosoma vivax* em ovelhas prenhes experimentalmente infectadas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 44, n.1, 2013.
- SIMÕES, L.S. et al., Leptospirose-Revisão. **PubVet**, v.10, n.2, 2016.
- SOUSA, M.E. Seroprevalence and risk factors associated with infection by *Neospora caninum* of dairy cattle in the state of Alagoas, Brazil, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.10, 2012.
- SOUZA, A.L. et al., Tripanossomose bovina em um rebanho leiteiro no município de Monte Carmelo, Minas Gerais: relato de caso. **PubVet**, v.13, n.10 p.1-5, 2019.
- SOUZA, F.N. et al., Apoptosis of CD5+ cells and lymphocyte proliferation in bovine leukemia virus infected dairy cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.5, 2011.
- SOUZA, G.N. et al., **Situação epidemiológica e fatores de risco para problemas reprodutivos em bovinos leiteiros localizados em diferentes mesorregiões do Estado do Rio Grande do Sul 2016/2017**, Embrapa Gado de Corte, 2017.
- SPILKI, F.R. et al., Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.1, 2004.
- TAKIUCHI, E; ALFIERI, A.F; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, 2001.
- TOCHETTO, C. et al., Aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães: 53 casos (1965-2011). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.5, 2012.
- TOMICH, R.G.P. et al., **Ensaio Imunoenzimático (ELISA) com antígeno recombinante para triagem de bovinos positivos para leptospirose**. EMBRAPA: Corumbá, Circular Técnica nº86, 2009.

- TONIN, A.A. et al., Sulfato de estreptomicina como auxiliar no tratamento de leptospirose melhorando índices reprodutivos em bovinocultura de leite. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.3, 2009.
- VIEIRA, S. et al., Anticorpos para o Herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n.2, 2003.
- VIU, M.A.O. et al., Rinotraqueíte infecciosa bovina: revisão. **PubVet**, v. 8, n.4, 2014 a.
- VIU, M.A.O. et al., Diarreia viral bovina: revisão. **PubVet**, v.8, n.3, 2014 b.
- VOGEL, F.S.F; ARENHART, S; BAUERMANN, F.V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.36, n.6, 2006.
- WEIBLEN, R. et al., Balanoposthitis in bulls due to bovine herpesvirus in South Brazil. **Brazilian Journal of Medical and biological research**, v.24, n. 8, 1991
- ZANATTO, D.C.S. et al., *Coxiella burnetii* associated with BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus), BoHV (Bovine Herpesvirus), *Leptospira spp.*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma vivax* in reproductive disorders in cattle. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.28, n.2, 2019.
- ZANELLA, J.R.C; FLORES, E.F.F. Vacinas com marcadores antigênicos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina e o vírus da doença de Aujeszky. **Ciência Rural**, v.25, n.2, 1995.

CAPÍTULO II

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI *TRYPANOSOMA VIVAX* EM AMOSTRAS DE SORO BOVINO ELUIDAS DE PAPEL FILTRO EMPREGANDO A METODOLOGIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Resumo

A tripanossomíase bovina é uma doença difundida por todo território brasileiro, mas, sua sintomatologia pouco específica dificulta o diagnóstico clínico, sendo necessária a realização de exames laboratoriais para a confirmação da enfermidade. A busca por métodos diagnósticos que sejam confiáveis é constante, porém, observa-se ainda a dificuldade no envio de amostras em tempo hábil aos centros laboratoriais, principalmente em regiões distantes dos laboratórios de referência. O presente estudo teve por objetivo a padronização e validação do uso do papel filtro (PF) impregnado com soro bovino para detecção de anticorpos anti-*T. vivax* por Imunofluorescência Indireta (IFI) e a validação da técnica a campo. Durante a padronização da técnica observou-se que a gramatura ideal de PF foi de 250 G, a quantidade de soro dispensada no PF deveria ser de 100 µL e os eluatos deveriam ser obtidos através de 12 círculos de 3mm cada, eluidos em 350 µL de solução tampão fosfato salina (PBS) + 3% de soro fetal bovino (SFB), observando a diluição ideal de conjugado a ser utilizada de 1:250. O processo também identificou a viabilidade do PF mantido em temperatura ambiente por até 4 meses. Já a validação da técnica foi feita utilizando amostras de sangue de 83 bovinos, fêmeas, meio sangue holandês, com idade igual ou superior a 24 meses, que foram coletadas em tubos sem anticoagulantes e mantidas em temperatura ambiente (TA) para obtenção dos soros que em seguida, foram parte transferidos para tubos plásticos com tampa do tipo eppendorf (500 µL) e congelados e outra parte foi aplicado em PF e que posteriormente foram adsorvidos. Os resultados da validação a campo foram baseados na comparação entre resultados de IFI obtidos através do soro congelado e de amostras eluidas em PF. Tomando como base o teste de IFI com soro convencional, a técnica de IFI utilizando como material eluato de PF apresentou 72 (86,75%) resultados semelhantes aqueles apresentados pela IFI com soro congelado enquanto 11 amostras (13,25%) apresentaram resultados divergentes entre os dois métodos avaliados. O índice Kappa encontrado foi de 0,64, indicando concordância substancial entre os dois testes avaliados, demonstrando a boa aplicabilidade do PF para realização de IFI na pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. vivax*.

Palavras-chave: Tripanossomíase bovina. Bovinocultura. Sorologia. Diagnóstico.

Abstract

Bovine trypanosomiasis is a disease spread throughout the Brazilian territory, but its non-specific symptoms make clinical diagnosis difficult, requiring laboratory tests to confirm the disease. The search for diagnostic methods is constant, however, there are difficulties related to sending samples to the reference laboratory in a timely manner, especially in regions far from the reference laboratories. The present study aimed to detect the standardize and validate the use of filter paper (FP) impregnated with bovine serum to detect anti-*T. vivax* by Indirect Immunofluorescence (IIF) and the validation of the technique in the field. During the standardization of the technique, we observed that the ideal weight of Pf was 250 grams, the amount of serum dispensed in the PF should be 100 μ L and the eluates should be obtained through 12 circles of 3 mm each, eluted in 350 μ L of Phosphate buffer saline solution (PBS) + 3% fetal bovine serum (FBS), observing the ideal dilution of conjugate to be used of 1:250. The process also identified the viability of PF kept at room temperature for up to 4 months.. The validation of the technique was performed using blood samples from 83 bovine females, Dutch crossbreed, 24 months or more of age, which were collected in tubes without anticoagulants and kept at room temperature to obtain the sera, which then were partially stored in plastic tubes and frozen and partially applied in paper filter and adsorbed. Based on the IFI test with conventional serum, the IFI technique using PF eluate as sample showed 72 (86.75%) similar to those shown by the IFI with frozen serum while 11 samples (13.25%) presented divergent results among the two evaluated methods. The Kappa index found was 0.64, indicating substantial agreement between the two tests evaluated, demonstrating the good applicability of the PF for performing the IIF in the search for IgG anti-*T. vivax*.

Key-words: Bovine trypanosomiasis. Cattle farming. Serology. Diagnosis.

INTRODUÇÃO

Causada pelo *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*) a tripanossomíase bovina é uma enfermidade disseminada por todo o Brasil e que pode assumir caráter agudo, subagudo ou crônico, resultando em sintomas inespecíficos como por exemplo: anemia, emagrecimento, queda de produtividade, disfunções reprodutivas além de também existirem animais assintomáticos (OGWU; NJOKU, 1987; ANDRADE NETO et al., 2019). Pela inespecificidade sintomatológica, o diagnóstico clínico é dificultado, sendo indispensável a análise laboratorial para que a doença seja constatada de forma correta.

O médico veterinário pode dispor de métodos sorológicos, parasitológicos e moleculares para fechar o diagnóstico (SILVA et al., 2002). Porém como são variáveis a sensibilidade e a especificidade dos testes, a escolha de qual metodologia deverá ser utilizada é fundamentada principalmente de acordo com o estágio da doença (SILVA; SANCHEZ; DÁVILA, 2003).

Independentemente do método diagnóstico escolhido pelo profissional, é indispensável que as amostras sejam enviadas para os centros laboratoriais, ainda viáveis, para que os resultados obtidos sejam os mais assertivos possíveis (GOMES, 2004). Segundo o Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico Laboratorial Veterinário, amostras de sangue devem ser enviadas ao laboratório resfriadas e no menor tempo possível, mas, caso este tempo exceda 72 duas horas, é necessário que o soro seja separado, congelado, e enviado sob refrigeração, não sendo indicado o aceite de amostras hemolisadas, devido ao risco de comprometerem os resultados (CENCI et al., 2011).

Neste contexto, a busca por facilidades na coleta, armazenamento de amostras biológicas e envio para os centros laboratoriais é constante e, o uso do papel filtro (PF) para armazenamento de amostras de soro se mostra uma alternativa vantajosa visto que representa facilidades de envio para o laboratório, diminui os custos do transporte e não exige o armazenamento em baixas temperaturas (GOMES et al., 2004; FONSECA et al., 2007).

Já utilizado para coleta de material para identificação da doença de Newcastle e na Leishmaniose Visceral Canina, o PF é potencialmente empregável na adsorção de amostras para detecção de anticorpos por métodos sorológicos para outras doenças (FONSECA et al., 2007; SILVA et al., 2009).

Dado este potencial, o presente estudo teve por objetivo padronizar a detecção de anticorpos anti-*T. vivax* em amostras eluídas de PF empregando a metodologia de Imunofluorescência Indireta e, validá-la através da comparação entre amostras de soro

adsorvidas em PF à campo, mantidas em temperatura ambiente e amostras de soro mantidas em eppendorfs e armazenadas a -20°C .

MATERIAIS E MÉTODOS

PADRONIZAÇÃO USO PAPEL FILTRO E SUA VIABILIDADE EM CONSERVAR OS SOROS (ANTICORPOS).

Para a padronização testou-se inicialmente as gramaturas de PF (250G^1 e 88G^2) (Fig. 1A,1B), a quantidade de soro referência positivos ($n=11$) e negativos ($n=11$) dispensados nos PF (50 e $100\ \mu\text{L}$) e a diluição do anticorpo anti-IgG bovino 3 ($1:200$, $1:250$ ou $1:300$). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o número 004/2020 (ANEXO 1).

Inicialmente, as amostras de soro referência ($50\ \mu\text{L}$ ou $100\ \mu\text{L}$) foram adicionadas em PF (88G ou 250G) (Fig. 1A,1B), e mantidas por 4h a temperatura ambiente (T.A.) para secagem. Posteriormente, os PF contendo as amostras foram embalados em papel alumínio e armazenados em sacos plásticos hermeticamente fechados em embalagem do tipo “zip lock”. Os PF foram mantidos em T.A. por 03, 07, 15 dias e 120 dias para posterior análise.

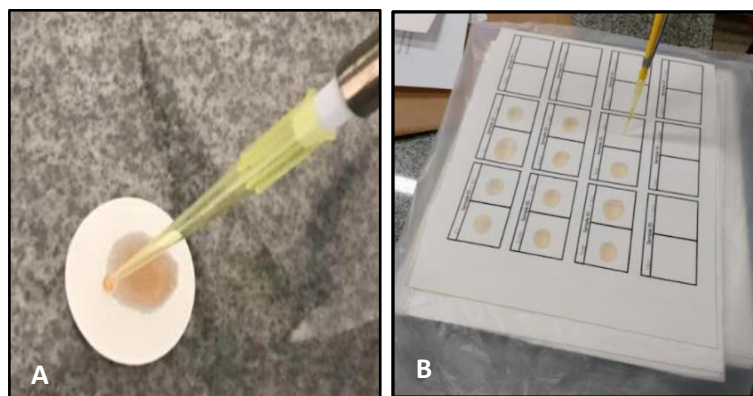


Figura 1: Adsorção de soro bovino em papel filtro com gramaturas de 250G (A) e 88G (B) utilizados na padronização de pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. vivax* por imunofluorescência indireta, sendo que para o papel de $250\ \text{G}$ foram impregnados $100\ \mu\text{L}$ de soro enquanto no PF de $88\ \text{G}$ foram dispensados $50\ \mu\text{L}$ de soro.

Para a obtenção dos anticorpos adsorvidos em PF (eluato) foram utilizados 12 círculos de PF, de três mm de diâmetro cada, obtidos através de perfurador metálico 4 , contendo soro de

1 Papel filtro qualitativo DAJOTA $^{\text{®}}$ $250\ \text{G}$ $500\times 500\ \text{MM}$

2 Papel filtro qualitativo WHATMAN $^{\text{®}}$ $88\ \text{G}/\text{m}^3$ $25\ \text{MM}$

3 Conjugado anti- IgG Bovino FTIC SIGMA $^{\text{®}}$

4 Furador Alicate Círculo 3 Mm Toke e Crie $^{\text{®}}$

referência positivo ou negativo para *T. vivax* (Fig. 2A). Posteriormente os picotes foram transferidos para tubos plásticos com tampa do tipo eppendorf de 1,5 mL contendo 350 μ L de PBS (PBS de NaH₂PO₄ 40 mM, pH 7.5 e NaCL 150 mM) + 3% de SFB⁵ (Fig. 2B) e incubados a 4°C sob homogeneização constante em agitador⁶ por 12 horas (Fig. 2C) conforme metodologia descrita por Vale (2019) com modificações.

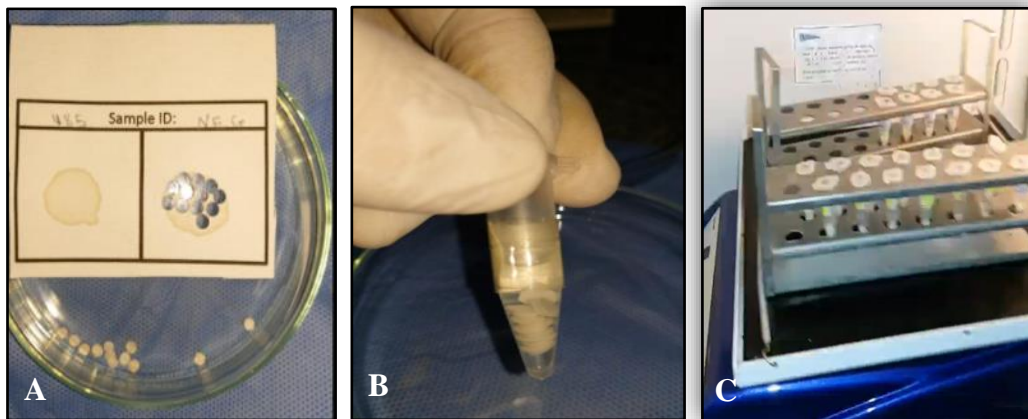


Figura 9: Procedimentos laboratoriais para obtenção de eluato de PF onde: (A) Picotagem do papel filtro (PF) em 12 círculos de 3 mm cada utilizando perfurador metálico, dentro de uma placa de petri; (B) Acondicionamento dos picotes de PF em tubos plásticos com tampa do tipo eppendorf contendo 350 μ L de PBS-SFB 3%; (C) Homogeneização overnight a 4°C por 12 horas.

Após a centrifugação dos tubos plásticos (10.000g por 5 minutos, T.A.), os eluatos obtidos foram diluídos nas proporções 1:80 e 1:160 em PBS, transferidos para as lâminas de IFI contendo o antígeno de *T. vivax*, em duplicata e, incubados a 37°C por 30 minutos em estufa para cultura bacteriológica⁷ (CUGLOVICI et al., 2010 com modificações). As lâminas foram lavadas por imersão (PBS e água destilada) e secas em T.A. O conjugado diluído nas proporções 1:200, 1:250 e 1:300 (diluído em Azul de Evans + PBS) foi adicionado às lâminas e, após a incubação e lavagens com PBS e água destilada, realizou-se a leitura em microscópio epifluorescente⁸ no aumento de 400X para observar as reações obtidas. Soros de bovinos controles foram utilizados como controles positivos e negativos respectivamente, na diluição 1:80. A leitura das lâminas foi realizada por um único observador durante todo o processo.

⁵ Soro Fetal Bovino GIBCO®

⁶ Agitador orbital constante KASVI® 200 RPM

⁷ Estufa para Cultura Bacteriológica OLIDELF CZ®

⁸ Microscópio de Epifluorescência NIKON ECLIPSE® 400X

VALIDAÇÃO DO USO DO PAPEL FILTRO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS OBTIDAS POR MÉDICO VETERINÁRIO A CAMPO

Para validação do PF amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante⁹ de 83 animais com suspeita clínica de *T. vivax* (Fig. 3A) e mantidas em T.A. em posição vertical por 60 minutos para obtenção do soro (Fig. 3B). Posteriormente, utilizando uma seringa de 1mL, 100 µL de soro foram aspirados e transferidos para o PF, que foi mantido em T.A por 4 horas para secagem (Fig. 3C). Em seguida o PF impregnado com soro foi embalado em papel alumínio e acondicionado em saco plástico do tipo “ziplock”, sendo mantidos em T.A até o momento de realização da IFI (Fig. 3D). Amostras dos mesmos soros foram acondicionadas também em tubos plásticos com tampa e congeladas a -20°C. A IFI foi realizada conforme metodologia descrita acima, sendo realizadas as diluições 1:80 e 1:160, adotando como ponto de corte a diluição 1:80.



Figura 13: Imagens representativas do esquema realizado para obtenção das amostras biológicas sendo em A observada a coleta de sangue através da venopunção de jugular em tubo estéril sem anticoagulante, em B a coleta do soro após 60 minutos de decantação do sangue na posição vertical em T.A, utilizando para tanto uma seringa de 1mL. Na imagem C observa-se a transferência do soro coletado para o PF, sendo dispensados 100 µL de soro e, em D, observa-se o PF já embalado em papel alumínio e acondicionado em saco plástico, após 4 horas de secagem em temperatura ambiente.

Para avaliação do desempenho e aplicabilidade da IFI utilizando eluato, inicialmente construiu-se uma tabela de contingência (Tab.1) para avaliar descritivamente as classificações fornecidas por ambas as técnicas [IFI com soro (teste padrão) ou IFI com eluato]. Calculou-se, então o índice Kappa de Cohen para verificação do grau de concordância (Quadro 1) ao nível de 5% de significância considerando todas as classes (LANDIS, KOCH, 1977). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.4.2 (R CoreTeam, 2017).

⁹ Tubo para coleta de sangue a vácuo tampa vermelha 9 mL VACUETTE ®

Tabela 1:Tabela de contingência

		Método teste: IFI soro	
		Positivo	Negativo
Método padrão: IFI eluato	Positivo	A	B
	Negativo	C	D

Quadro 1: Grau de concordância índice Kappa

Kappa	Grau de concordância
<0,00	Não concordância
0,00-0,20	Concordância Mínima
0,21-0,40	Concordância Razoável
0,41-0,60	Concordância Moderada
0,61-0,80	Concordância substancial
0,81-1,00	Concordância perfeita

Em seguida, calculou-se a acurácia, sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPredPos) e o valor preditivo negativo (VPredNeg) para cada uma das classes da tabela de contingência (ALTMAN, BRAND, 1994a;b; OLIVEIRA et al., 2019).

$$\text{Acurácia} = (A + D)/(A + B + C + D)$$

$$\text{Sensibilidade (Sens)} = A/(A + C)$$

$$\text{Especificidade (Espec)} = D/(B + D)$$

$$\text{Prevalência (Prev)} = (A + C)/(A + B + C + D)$$

$$\text{VPredPos} = (\text{sens} \cdot \text{prev}) / ((\text{sens} \cdot \text{prev}) + ((1 - \text{espec}) \cdot (1 - \text{prev})))$$

$$\text{VPredNeg} = (\text{espec} \cdot (1 - \text{prev})) / (((1 - \text{sens}) \cdot \text{prev}) + ((\text{espec}) \cdot (1 - \text{prev})))$$

RESULTADOS

Na análise da gramatura de PF e quantidade de soros dispensados, padronizou-se a utilização de 50 µL para o PF de 88G e 100 µL para o de 250G, pois nessas quantidades os soros foram absorvidos pelos respectivos PF sem extravasamento e foi possível obter os 12 círculos necessários para a obtenção do eluato em PBS.

Durante a leitura das IFI's comparando os resultados entre soros positivos e eluatos obtidos de PF de 88G ou 250G impregnados com soros positivos, notou-se que 81,81% (9/11)

dos eluatos de PF 250G e 63,63% (7/11) dos eluatos de PF de 88G foram concordantes aos resultados dos testes com soro. Já com relação as amostras negativas testadas com soro e os eluatos obtidos das duas gramaturas de PF os resultados foram semelhantes em ambos os testes.

Notou-se que a diluição do conjugado na proporção 1:250 permitiu melhor identificação das amostras positivas e negativas para *T. vivax* (Fig. 4). Assim os experimentos em relação aos dias de armazenamento foram realizados somente com o PF de 250G e utilizando a diluição 1:250 do conjugado.

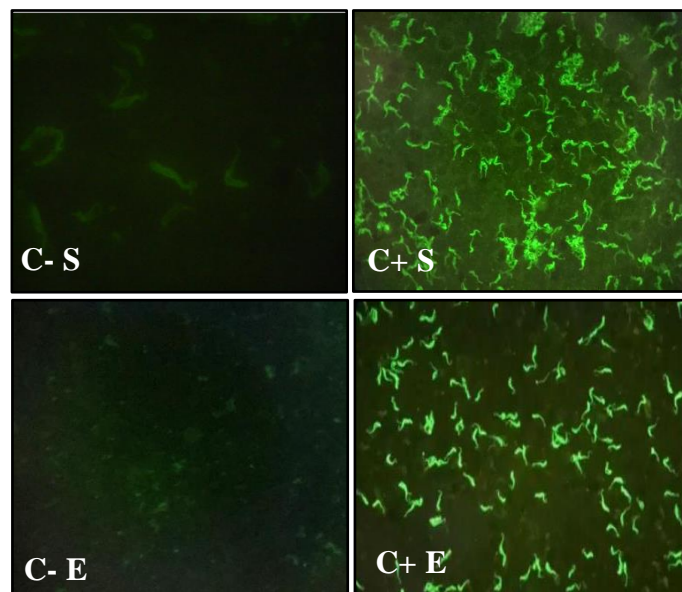


Figura 22: Comparação da visualização de controles positivos e negativos obtidos através de soro e eluato, observados em microscópio de epifluorescência no aumento de 400X. Sendo que a sigla C- S se refere ao controle negativo utilizando amostras de soro congeladas a -20°C enquanto a sigla C+ S faz referência a amostra de controle positivo utilizando como material soro congelado a -20° . Já a imagem identificada como C- E foi obtida através da visualização do controle negativo utilizando amostras de soro eluidas em PF, armazenadas em T.A, enquanto a imagem identificada como C+ E é referente ao controle positivo de soro eluido em PF. Observa-se maior facilidade na identificação do controle negativo como uma amostra verdadeiramente negativa, sem a presença de formas semelhantes aquelas observadas em amostras positivas. Já as amostras positivas de eluato, quando comparadas ao soro congelado, proporcionaram menor quantidade de aglomerados, o que também é um facilitador durante o momento da leitura.

Com relação aos dias de viabilidade do PF em T.A, observou-se que aos 3, 7, 15 e 120 dias pós pipetagem do soro, a positividade foi respectivamente de 100% (11/11), 90,9% (10/11), 100% (11/11), 100% (11/11). Todas as amostras de PF negativos testados, durante todos os períodos mencionados, foram 100% concordantes com o resultado utilizando amostras congeladas nos respectivos momentos avaliados.

No processo de validação do protocolo, das 83 amostras de soro ou eluato que foram submetidas a IFI, 86,74% delas (72/83) tiveram resultados concordantes sendo que 69,87%

(58/83) positivas nos dois testes e 16,86% (14/83) negativas nos dois testes. Já 13,25% (11/83) tiveram resultados divergentes, sendo que 4,84% (4/83) foram negativas no eluato e positivas no soro e 8,43% (7/83) foram positivas no eluato e negativas no soro (Tab.2). Na análise de consistência dos diagnósticos pelo método Kappa notou-se forte concordância entre os testes (Kappa 0,63; $p > 0,0001$) (Quadro 2) (LANDIS, KOCH, 1977), além de elevada acurácia (86,74%).

Tabela 2: Tabela de contingência dos dados

		Método teste: IFI soro	
		Positivo	Negativo
Método padrão: IFI eluato	Positivo	58	7
	Negativo	4	14

Quadro 2: Análises realizadas por classe pelo método Kappa

Parâmetros	Resultados
Acurácia	86,74%
Kappa	0,63
Valor p.Kappa	<0,0001
Sensibilidade	93,54%
Especificidade	66,66%
Vpred Pos	89,23%
Vpred Neg	77,77%

DISCUSSÃO

O uso de PF impregnado com soro/sangue já é usual para algumas doenças em animais e, a ampliação desta utilização é importante quando considerados benefícios de facilidade na manipulação e transporte, além da redução de custos para o envio aos centros laboratoriais (BAHIA et al., 1995; FONSECA et al., 2007).

Segundo Gomes et al., (2004) a técnica empregada no uso do PF deve se ater as recomendações do fabricante do papel, porém, informações relevantes como a quantidade de material que pode ser adsorvida não foram encontradas nas recomendações dos PF utilizados no presente estudo. Assim, a padronização da gramatura do PF, bem como a quantidade de soro dispensada no material são processos fundamentais a serem padronizados previamente a implementação da técnica dentro de um centro laboratorial. Neste contexto, um ponto crítico

identificado no processo de aplicação do soro em PF foi a quantidade de soro dispensada, sendo que quando aplicados 100 μL de soro no PF de 88G, ocorria extravasamento de soro além de ser observada dificuldade no processo de secagem e, por outro lado, quando reduzida a quantidade de soro para 50 μL aplicados no PF de gramatura 250G, não era possível obter picotes em quantidade suficiente para posterior obtenção de eluato. Portanto, a quantidade ideal de soro aplicada no PF de 88G foi de 50 μL e para o PF de 250G 100 μL .

Outro aspecto importante observado é que o tempo necessário para secagem total do PF foi de 4 horas, o que contradiz a recomendação de Braga et al., (1998), que indicam o tempo de secagem ideal de 50 minutos. Segundo Cocca; Arienzo; Orazio (2011) e Mei et al., (2001), a secagem total do PF, bem como a necessidade de armazenamento do material sob o abrigo de luz e umidade são medidas capazes de evitar a proliferação de bactérias e consequente comprometimento de amostras, recomendações que vão de encontro à metodologia de armazenamento aplicada no presente protocolo.

Apesar de existirem diferentes técnicas descritas quanto a picotagem do papel, como a feita por Braga et al., (1998) que utilizavam círculos picotados ou por Fonseca et al., (2007) que apenas dividiam o papel em partes iguais, o presente estudo observou a necessidade de picotar o PF em porções iguais para que sempre exista conformidade na quantidade de amostras a serem eluídas, assim como recomendado por Fonseca et al., (2007).

Durante o teste de viabilidade do PF, pôde-se observar um resultado divergente do dia 7. Esta divergência de resultados pode ser atribuída ao fato de que a detecção de anticorpos através da técnica de imunofluorescência indireta pode ser gerada pela subjetividade de leitura por parte do observador, como já mencionado por Macêdo-Junior et al., (2011).

Em análise feita por Fonseca et al., (2007) as amostras de PF foram eluídas após 45 dias de armazenamento, observando, portanto, o potencial de armazenagem deste material por longos períodos. Essa observação corrobora com os achados do presente estudo, onde a positividade foi notada tanto em eluato mantido em T.A. por quatro meses.

Para validação da técnica a campo, o uso da seringa de 1mL, que é comumente utilizada para aplicação de ocitocina na rotina de ordenha de vacas leiteiras, se mostrou uma ferramenta útil e de fácil manejo para aplicação do soro no PF. A necessidade de simplificação do processo, como a mencionada anteriormente, é validada por Mei et al., (2001), que sugeriram que os erros no uso do PF são em sua maioria observados em decorrência à alta complexidade da

padronização da técnica, sendo portanto, indispensável minimizar os erros pré-analíticos para o sucesso do protocolo.

CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos pode-se concluir que:

-A utilização do papel filtro (250G) para a conservação de amostras de soro demonstrou índice de desempenho adequado para sua aplicação no diagnóstico da tripanossomíase bovina.

-O uso do papel filtro (250G) para pesquisa de anticorpos anti-*T.vivax* por Imunofluorescência Indireta é viável, viabiliza a análise de amostras de soro por períodos de até quatro meses e, pode ser facilmente utilizado a campo após simples treinamento.

REFERÊNCIAS

- ALTMAN, D.G., BLAND, J.M. Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity, **British Medical Journal**, vol 308, 1552 1994a.
- ALTMAN, D.G., BLAND, J.M. “Diagnostic tests 2: predictive values,” **British Medical Journal**, vol 309, 102, 1994b.
- ANDRADE NETO, A.Q. et al., Diagnostic, Clinical and Epidemiological aspects of dairy cows naturally infected by *Trypanosoma vivax* in the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.41, p.1-15.
- BAHIA, M.T. et al., Utilização do eluato de sangue dessecado em papel filtro no diagnóstico sorológico da toxoplasmose caprina. **Brazilian Journal of veterinary research and animal Science**. v.32, n.2, 1995.
- BASTOS, C.V. et al., Manutenção *in vitro* de células IDE8 em dois tipos de soro bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59, n.2, 2007.
- BRAGA, M.M.D. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.5, p.419-424, 1998.
- CENCI, A. et al., Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico Laboratorial Veterinário. **Boletim Técnico nº20**. Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio Rio Grande do Sul- Brasil, 2011.
- COCCA, M; ARIENZO, L.D; D’ORAZIO, L. Effects of different artificial agings on structure and properties of Whatman Paper Samples. **International Scholarly Research Network**, v.2011, p.1-7, 2011.
- CUGLOVICI, D. A. et al., Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.11, n.3-4, 2010.
- FONSECA, F. et al., Avaliação do uso de sangue em papel-filtro para detecção e quantificação de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.2, p.319-324, 2007.
- GOMES, A.H.S. et al., Avaliação da capacidade de absorção e distribuição de amostras de sangue total em diferentes tipos de papel-filtro. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.63, n.2, p.262-268, 2004.
- LANDIS, J.R., KOCH, G.G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**. v.33, p.159-174, 1977
- MACÊDO-JÚNIOR, A.G. et al., Caracterização de antígenos de *Neospora caninum* para produção de insumos com valor diagnóstico, profilaxia e proteção na neosporose. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, V.9, N.3, 2011.
- MINUZZI, A.L.M. **Análise comparativa entre testes de ELISA convencional (soro) e papel filtro (sangue seco) para detecção de toxoplasmose IgM**. 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- MEI, J.V. et al., Use of Filter Paper for the collection and analysis of Human Whole Blood Specimens. **American Society for Nutritional Sciences**, v.1, p.1361-1636, 2001.
- MELLO, V.V.C. **Ocorrência e caracterização molecular de hemoplasmas em bovinos de corte no pantanal brasileiro, área endêmica para tripanossomiase bovina na América do Sul**. 2019. 29 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2019.
- OGWU, D; NJOKU, C.O. Effect of pregnancy on clinical manifestations of bovine tripanosomiasis. **Veterinary Parasitology**. v.24, n.1-2, p.25-33, 1987.

- OLIVEIRA, S.R. et al., Validação do teste sorológico para toxoplasmose em papel filtro. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.51, n.1, 2019.
- SILVA, R.M. Análise TG-ROC de testes de imunofluorescência no diagnóstico de leishmaniose visceral canina. **Revista Saúde Pública**, v.43, n.6, 2009
- SILVA, R.A.M.S. et al., *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*. **Biologia, Diagnóstico e Controle**. Corumbá: EMBRAPA, 2002. 137 p.
- SILVA, R.A.M.S., SANCHEZ, V., DÁVILA, A.M.R. **Métodos de Diagnósticos Parasitológicos das Tripanossomoses Bovinas e Equinas**. Corumbá: EMBRAPA, v.1, n.3, 2003.
- VALE, I.N.P.C. **Diagnóstico da doença de chagas em amostras eluídas de papel filtro, empregando a metodologia fc-triples chagas/leish-IgG1**. 2019. Dissertação. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde- Doenças Infecciosas-Parasitárias e crônicas não transmissíveis) - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2019.

CAPÍTULO III

PREVALÊNCIA E SAZONALIDADE DA TRIPANOSSOMÍASE BOVINA E DE COINFECÇÕES EM BOVINOS COM SINTOMATOLOGIA CLÍNICA SIMILAR A POR *TRYPANOSOMA VIVAX*

RESUMO

A tripanossomíase bovina gera prejuízos relevantes para a bovinocultura, relacionados principalmente com a queda de produtividade e dos índices reprodutivos. Como os sinais clínicos observados nos animais são inespecíficos (anemia, apatia, emagrecimento, claudicação, etc.) e comuns a outras doenças (Leptospirose, IBR, BVD, Neosporose e Leucose), o presente trabalho objetivou estudar a sazonalidade da Tripanossomíase e de outras enfermidades, bem como entender se há ou não coinfeção para assim estabelecer medidas de controle mais eficazes. Para isso, realizou-se a análise retrospectiva de 1443 fichas clínicas de bovinos, fêmeas, com alterações clínicas, de produtividade e/ou reprodução, cuja principal suspeita clínica era Tripanossomíase bovina, sendo analisados também os resultados referentes ao diagnóstico diferencial feito para Leptospirose, IBR, BVD, Neosporose e Leucose, entre os anos de 2013 a 2020. Foram observados além da prevalência das doenças mencionadas, a relação de coinfeção e de sazonalidade. Das 1443 fichas avaliadas, notou-se que as fêmeas bovinas com suspeita clínica de Tripanossomíase apresentaram soroprevalência para *T. vivax* (57,10%) inferior ($p < 0,05$) a IBR (87,78%) e BVD (70,73%). Maior taxa de coinfeção foi percebida entre Tripanossomíase e IBR (42,53%) e a menor entre Tripanossomíase e Leucose (14,71%) mas, notou-se também coinfeção também com Neosporose e BVD. As estações do ano favorecem o aparecimento de coinfeções, assim diagnósticos diferenciais entre *T. vivax*, Neosporose, IBR e BVD devem ser solicitados pelos médicos veterinários principalmente no verão, inverno e primavera para aqueles animais que apresentarem sinais clínicos de tripanossomíase e/ou títulos baixos para *T. vivax*. E por fim, vale ressaltar que a sazonalidade das enfermidades auxiliará na escolha dos diagnósticos diferenciais necessários para se preconizar as corretas medidas terapêuticas e de controle das enfermidades.

Palavras-chave: Doenças Infecciosas. Bovinocultura. Comorbidade. Análise Laboratorial. Epidemiologia.

ABSTRACT

The bovine trypanosomiasis generates relevant losses to the cattle industry, mainly related to the decrease in productivity and reproductive indexes. As the clinical signs observed in infected animals are non-specific (anemia, apathy, weight loss, lameness, etc.) and common to other diseases (Leptospirosis, IBR, BVD, Neosporosis and Leukosis), the present study aimed to study the seasonality of trypanosomiasis and other diseases, as well as understanding whether

or not there is coinfection aiming to establish more effective control measures. For this, a retrospective analysis of 1443 clinical records of bovine females with clinical, productivity and/or reproduction alterations, whose main clinical suspicion was Trypanosomiasis, was conducted, and the results referring to the differential diagnosis made for Leptospirosis, IBR, BVD, Neosporosis and Leukosis, between the years 2013 and 2020, were also analyzed. In addition to the prevalence of the mentioned diseases, the existence of coinfection and seasonality were observed. The 1443 records evaluated showed that bovine females with clinical suspicion of Trypanosomiasis had seroprevalence for *T. vivax* (57.10%) lower ($p < 0.05$) than IBR (87.78%) and BVD (70.73%). The highest rate of coinfection was found for Trypanosomiasis and IBR (42.53%) and the lowest for Trypanosomiasis and Leukosis (14.71%), but coinfection was also found with Neosporosis and BVD. The year season promote the appearance of co-infections and for this reason differential diagnosis for *T. vivax*, Neosporosis, IBR and BVD should be requested by veterinarians, especially in summer, winter and spring for those animals that show clinical signs of trypanosomiasis and / or low titers for *T. vivax*. Finally, it is important to mention that the seasonality of the diseases will help in the choice of differential diagnoses necessary to prescribe the best treatments and disease control

Keywords: Infectious Diseases. Cattle farming. Comorbidity. Laboratorial Analysis. Epidemiology.

INTRODUÇÃO

A tripanossomíase bovina é uma enfermidade que implica em prejuízos relevantes, tanto para a bovinocultura de corte quanto a de leite e que são relacionados a queda de produtividade e de índices reprodutivos, tais como fertilidade e natalidade (BASTOS et al., 2017; BATISTA et al., 2018; PEREIRA et al., 2018). Além de anemia, sintomas neurológicos, petéquias, emagrecimento e em casos graves morte do animal, também são sintomas que podem ser observados (OGWU; NJOKU, 1987; CADIOLI et al., 2012).

Sabendo que outras doenças da reprodução como por exemplo IBR, BVD, Leptospirose e Neosporose são amplamente disseminadas nos rebanhos nacionais e, causam sintomas semelhantes daqueles percebidos em infecções por *T. vivax*, é importante a realização de diagnósticos diferenciais para essas patologias para que medidas corretas de tratamento e de controle sejam aplicadas na propriedade rural (MENDES et al., 2009; ZANATTO et al., 2019; MOREIRA et al., 2020). Porém, nota-se que muitas vezes os proprietários rurais iniciam o tratamento para Tripanossomíase sem os diagnósticos laboratoriais confirmatórios.

Segundo Pereira et al., (2018) e Zanatto et al., (2019), a Tripanossomíase pode ser apresentada de forma isolada ou em conjunto com outras enfermidades, o que torna difícil a determinação da verdadeira causa dos sintomas somente através da análise clínica. Sabendo ainda que o *T. vivax* promove leucopenia, nos animais parasitados existe a predisposição para que outras doenças surjam (BATISTA et al., 2008; PEREIRA et al., 2018; ANDRADE NETO et al., 2019; ZANATTO et al., 2019). Neste sentido, é importante observar que a Leucose Enzoótica bovina também deve ser considerada como diagnóstico diferencial, visto que além de gerar sintomas semelhantes à Tripanossomíase, compartilha o fato de poder ser transmitida mecanicamente através de dípteros hematófagos, além de gerar queda de imunidade nos animais acometidos, o que facilita o surgimento de doenças concomitantes como a tripanossomíase (SILVA et al., 1997; MEIRELLES-BARTOLI; SOUSA, 2013; SANTOS et al., 2013; BASTOS et al., 2017).

Neste contexto o presente estudo objetivou avaliar a prevalência da Tripanossomíase bovina e das principais doenças que impactam a bovinocultura em animais com sinais clínicos da doença, bem como avaliar a ocorrência de coinfeções e a sazonalidade das principais doenças que afetam a bovinocultura. Tais análises são importantes quando observado o fato de que uma vez compreendidos a ocorrência, presença de coinfeções e fatores sazonais relacionados, o manejo de diagnóstico (diagnósticos diferenciais a serem solicitados) e posterior adoção de medidas preventivas específicas por parte de produtores e médicos

veterinários, é facilitado (DUBEY et al., 2003; FAVA; PITUCO; GENOVEZ, 2007; SILVA FILHO et al., 2011; MEIRELLES-BARTOLI; SOUSA, 2013; ZANATTO et al., 2019).

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (CEEAA-004/2020), foi feito com base em uma pesquisa transversal, qualitativa e quantitativa, de informações do sistema integrados de dados do Hospital Veterinário de Uberaba (HVU) da Universidade de Uberaba (UNIUBE) no período compreendido entre os anos de 2013 a 2020.

Foram obtidas informações referentes aos resultados sorológicos de 1443 fêmeas bovinas leiteiras, provenientes da região de Uberaba-MG, com idade igual ou superior a 24 meses (24 a 108 meses), pertencentes a rebanhos com suspeita clínica de tripanossomíase e/ou apresentando sinais clínicos relacionados a doença, tais como problema reprodutivos, apatia, febre, anorexia e queda de produtividade.

Amostras de soro dos referidos animais foram submetidas a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. vivax* através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) e, foram considerados positivos aqueles animais com títulos iguais ou superiores a 80 (CUGLOVICI et al., 2010).

Informações referentes aos resultados dos diagnósticos diferenciais para outras enfermidades, como Neosporose (n=31), Leptospirose (n=948), Leucose (BLV) (n=428), IBR (n=221) e BVD (n=123), que os animais suspeitos para *T. vivax* foram submetidos, também foram avaliados.

Os anticorpos anti-*Neospora caninum*, IBR e BVD foram detectados em ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) quantitativo e, anticorpos anti-vírus da Leucose Enzoótica Bovina através da Imunodifusão em gel de ágar (IDGA), ambos realizados em laboratório veterinário terceirizado de referência com experiência nas referidas análises. Foram considerados positivos animais com resultados descritos pelo laboratório como “reagentes”.

Anticorpos anti-*Leptospira* spp foram pesquisados pela técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) segundo metodologia descrita por Meyres (1985) e, animais com títulos a partir de 100 foram considerados positivos.

Os dados para estudo da sazonalidade e coinfeções também foram obtidos através do sistema integrado de dados do Hospital Veterinário de Uberaba. As informações coletadas foram analisadas inicialmente em relação a descrição da prevalência de anticorpos anti as doenças estudadas. Posteriormente, foram realizados os ajustes dos dados em relação ao total de amostras avaliadas.

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software GraphPad Prism 8.0.2. Para análise dos dados foram empregados o teste T- student e análise de variância. (ANOVA). Para análises de frequência, foram realizados o teste Qui Quadrado (Chi Square). Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

No período analisado, notou-se prevalência positiva igual a 57,10% (824/1443) para Tripanossomíase, 87,78% (194/221) para IBR, 70,73% (87/123) para BVD, 54,84% (17/31) de Neosporose, 38,82% (368/948) para Leptospirose e 33,88% (145/428) para Leucose (Fig.1A). Apesar dos animais terem a suspeita clínica inicial de tripanossomíase, as prevalências de IBR e BVD foram estatisticamente superiores ($p < 0,05$) as demais doenças analisadas (Fig. 1A).

As coinfeções percebidas entre Tripanossomíase e as demais enfermidades (Fig.1B) foram superiores para Neosporose (35,48% - 11/31), IBR (42,53% - 94/221) e BVD (29,27% - 36/123), ressaltando a importância destas doenças serem adicionadas nos diagnósticos diferenciais para tripanossomíase, enquanto para Leptospirose e Leucose, a monoinfecção por *T. vivax* apresentou maior prevalência. Já quando observada a monoinfecção que não seja aquela causada por *T. vivax*, IBR apresentou 45,24% de positividade (100/221) já a monoinfecção por BVD foi de 41,46% (51/123).

No estudo da sazonalidade com os dados já ajustados para cada doença (Fig. 1C), percebeu-se que o outono foi a estação de pico ($p < 0,05$) da Tripanossomíase (29% - 68/123) e baixa ocorrência ($p < 0,05$) para Neosporose (12,31% - 35/287) e Leptospirose (20,35% - 32/155). Leucose teve maior ocorrência ($p < 0,05$) no outono (31,40% - 42/134) e no inverno (31,87% - 43/134), enquanto IBR (28,15% - 95/337) e BVD (29,06% - 76/262) tiveram similaridade sazonal, sendo os picos ($p < 0,05$) observados no inverno.

Observando o comportamento das enfermidades estudadas em relação às estações do ano (Fig. 1D), nota-se perfil muito semelhante entre Tripanossomíase, Leptospirose, IBR e BVD durante todo o ano. Já para BLV o perfil apresentado foi isolado em relação às outras enfermidades, sendo observada a menor prevalência no verão e na primavera, enquanto as maiores prevalências foram notadas no outono e inverno. Já com relação a Neosporose, é possível observar que também houve isolamento em relação às outras enfermidades no outono, estação de maior prevalência da enfermidade, porém, nas outras estações, o perfil de prevalência foi similar a IBR, BVD, Leptospirose e Tripanossomíase, observando a necessidade de inclusão nos diagnósticos diferenciais.

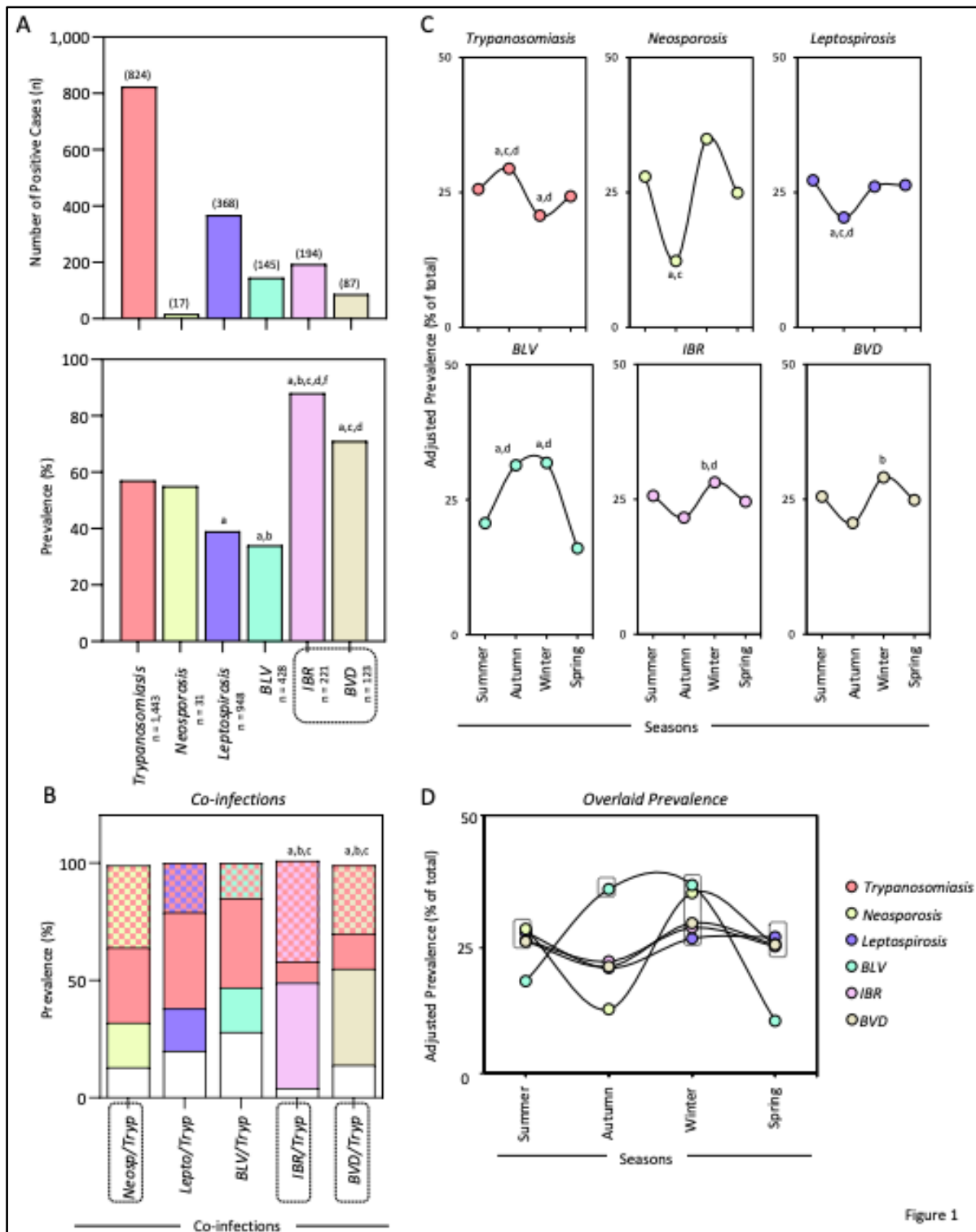


Figure 1

Figura 1: Prevalência geral e percentual da tripanossomíase e de seus diagnósticos diferenciais, provenientes de amostras sorológicas enviadas ao HVU entre os anos de 2013 a 2020 (Fig. A). As legendas do eixo x destacadas com retângulos indicam as doenças mais prevalentes ($p < 0,05$) (Fig. A). Prevalência de coinfeções entre a tripanossomíase bovina e seus principais diagnósticos diferenciais, onde cores sólidas distintas significam doenças distintas apresentadas como monoinfeções e cores mescladas significam coinfeções (Fig. B). As legendas do eixo x destacadas com retângulos indicam as coinfeções mais prevalentes ($p < 0,05$) (Fig. B) Perfil sazonal identificado através da prevalência das doenças avaliadas ao longo das estações do ano (Fig. C) e distribuição de todas as doenças ao longo das estações do ano, sendo possível observar os momentos em que as doenças exibem o mesmo perfil, sendo considerados portanto, momentos onde o diagnóstico diferencial se torna indispensável

(pontos circundados por retângulos) (Fig. D). As letras sobre as colunas (Fig. A e B) ou pontos (Fig. C e D) indicam diferença significativamente entre os respectivos itens avaliados na sequência apresentada nos gráficos ao nível de 5% de probabilidade.

Na análise do impacto da sazonalidade sobre a prevalência de mono e coinfeções de *T. vivax* (Fig. 2), nota-se que a tripanossomíase está muito associada ($p < 0,05$) a coinfeções com Neosporose, IBR e BVD (Fig. 2A) praticamente em todas as estações do ano, porém a coinfeção com Neosporose ocorre principalmente no verão (80% - 4/5) ($p < 0,05$), enquanto as coinfeções com IBR (57,58% 19/33) e BVD (46,15% 6/13) se dão no outono ($p < 0,05$). Outro ponto interessante é que no outono, a prevalência de monoinfeção por *T. vivax* é superior frente a Neosporose e BVD. Nota-se também que IBR e BVD aparecem com elevada prevalência de monoinfeção por no mínimo três estações do ano (IBR- out/inv/prim; BVD- ver/inv/prim).

Nota-se que que Leptospirose e Leucose apresentam prevalência de coinfeção com Tripanossomíase constante durante as estações do ano, porém a monoinfeção por *T. vivax* prevalece, com variação de 32,96% (59/179) a 53,36% (127/238) na análise com leptospirose e de 22,22% (26/117) a 53,16% (42/79) com leucose (Fig. 2A).

Na observação das mono e coinfeções das doenças estudadas de acordo com a estação do ano (Fig. 2B) nota-se que no verão, inverno e primavera são prevalentes ($p < 0,05$) as coinfeções entre Neosporose e Tripanossomíase (ver:80% - 4/5; inv: 50% - 1/2, prim: 42,86% 3/7) e IBR e Tripanossomíase (ver:45,45% - 9/22; inv:41,23% - 47/114; prim:36,54% - 19/52). No outono, o perfil apresentado, é de prevalência de coinfeções para IBR (57,58% - 19/33) e BVD (46,15% - 6/13) ($p < 0,05$).

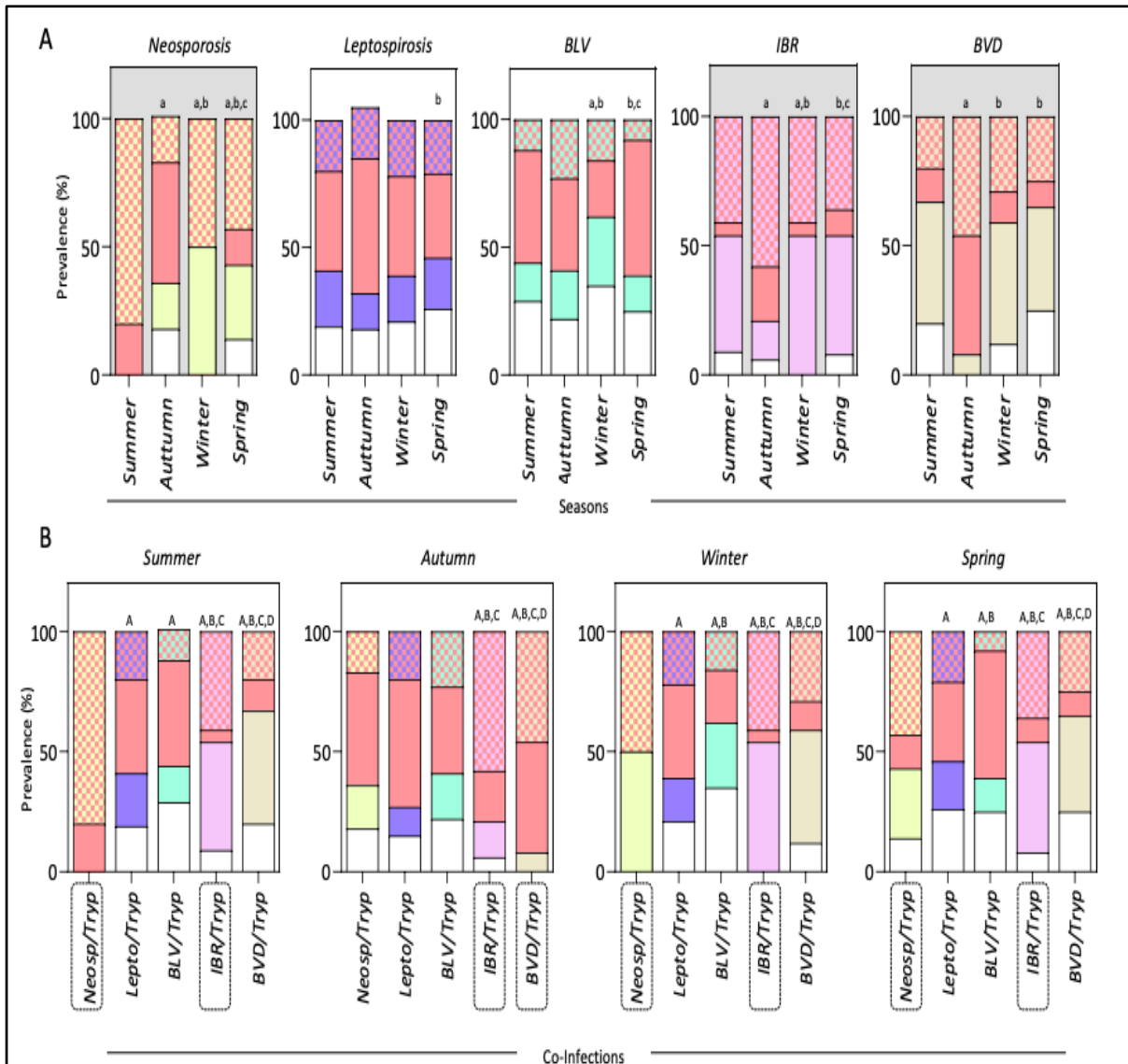


Figura 2: Impacto da sazonalidade sobre a prevalência de mono e coinfeção em fêmeas bovinas com suspeita clínica de tripanossomíase encaminhadas para o Hospital Veterinário de Uberaba (HVU) no período entre 2013 e 2020 de acordo com as estações do ano. Na imagem A são observadas o perfil sazonal dividido por doença, onde as cores sólidas representam monoinfecções, cor branca representa os animais testados que foram negativos e as cores mescladas indicam o perfil de coinfeção entre tripanossomíase e a doença analisada. Os gráficos com fundo cinza escuro indicam as doenças que diferem entre si estatisticamente em relação as coinfeções (figuraA). O perfil sazonal das doenças avaliadas em forma de coinfeções ou monoinfecções, divididos de acordo com cada estação do ano, é apresentado na imagem B, onde cores sólidas representam monoinfecções, cor branca representa animais com sorologia negativa para a doença avaliada e cores mescladas indicam a prevalência de coinfeções entre as doenças avaliadas e a tripanossomíase. As legendas do eixo x destacadas com retângulos indicam as coinfeções mais prevalentes ($p < 0,05$). As letras sobre as colunas (figuras A e B) indicam diferença significativamente entre os respectivos itens avaliados na sequência apresentada nos gráficos ao nível de 5% de probabilidade.

Na análise da prevalência das coinfeções das doenças infecciosas estudadas (Fig. 3A), com destaque para neosporose (52,38%), IBR (83,18%) e BVD (65,45%), em relação aos títulos de anticorpos anti-*T. vivax* (Fig. 3B), notou-se que a maior ocorrência dessas doenças em associação a tripanossomíase, se deu entre os títulos 80 e 160 (Fig. 3B) e menor ocorrência em títulos altos de anticorpos anti-*T. vivax* (1280).

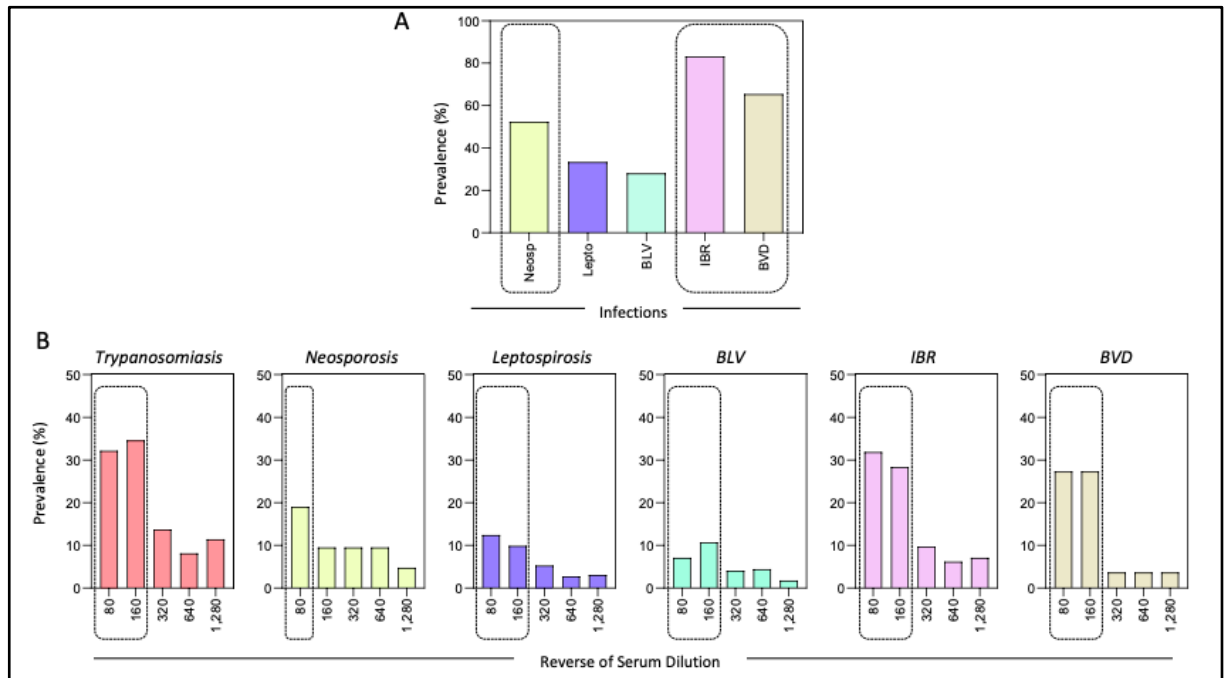


Figura 3: Prevalência das doenças infecciosas em relação aos títulos de anticorpos anti-*T. vivax* detectados em IFI de fêmeas bovinas com suspeita clínica de Tripanossomíase encaminhadas ao HVU no período entre 2013 e 2020. Na figura A são identificadas as principais prevalências das coinfeções com tripanossomíase. Na figura B nota-se as titulações sorológicas para tripanossomíase em comparação as doenças concomitantes.

DISCUSSÃO

Sabe-se que as doenças avaliadas estão disseminadas por todo o rebanho brasileiro e, os resultados do presente trabalho corroboram esta ideia, dados os altos índices de anticorpos encontrados para todas as doenças. O valor de positividade para Tripanossomíase encontrado (57,10%) foi menor que aquele encontrado em avaliação com animais da mesma região em estudo (78,48%) avaliada por Silva (2018). Para IBR (87,78%) e BVD (70,73%) as prevalências encontradas no presente estudo foram maiores do que aqueles observados por Barbosa et al., (2019) (62,5% para IBR e 45,1% para BVD), já para Leptospirose a porcentagem de positividade de 38,82% observada neste estudo, foi menor do que a identificada por Urzêda et al., (2020) cuja porcentagem de animais positivos foi de 64,91%, assim como a soroprevalência de Leucose (33,88%) foi menor que aquela observada por Barros Filho et al., (2010) cuja porcentagem de animais positivos foi de 56,34%. Para Neosporose, a positividade observada no presente estudo (54,84%) foi maior do que os 18,2% de positividade encontrados por França et al., (2021).

Sabendo que as estações indicadas por Rosa, Nogueira, Júnior (2017) para que sejam realizadas as técnicas da reprodução são a primavera e o verão (novembro a março), os partos tendem a ser concentrados no inverno e primavera, estações onde a seca ainda é prevalente, a oferta de alimentos é reduzida, fatores somados à debilidade gerada pelo parto, sendo estas

condições que quando presentes, podem propiciar o surgimento de sintomas clínicos de processos patológicos previamente instalados, percebidos segundo Rezende (2019) principalmente pela pouca produção leiteira e dificuldade no retorno a atividade reprodutiva. Tal informação corrobora os achados de prevalência do presente trabalho no que diz respeito às altas taxas de mono infecção por neosporose, IBR e BVD no inverno e primavera e coinfeção entre tripanossomíase e neosporose e IBR nas duas estações.

Os picos de Tripanossomíase e Leucose no outono podem ser justificados em decorrência da pluviosidade e temperatura típicos desta estação, características estas que favorecem a ocorrência os insetos hematófagos transmissores das duas enfermidades e do início da seca, que também é observado na referida estação, que favorece a redução na oferta de alimentos e conseqüentemente resulta em diminuição da competência imunológica no controle de agentes infecciosos, surgindo sintomas clínicos, que são na maior parte das vezes, o ponto inicial na busca por um diagnóstico laboratorial conclusivo (PAIVA et al., 2000; SILVA et al., 2002; MADRUGA, 2009).

O perfil semelhante de sazonalidade observado para IBR, BVD e Neosporose pode ser justificado quando observado que as três doenças analisadas podem ser desencadeadas por fatores estressantes semelhantes tais como, aqueles gerados pela seca que é característica muito presente no inverno e que implica em redução de pastagens e oferta de água além da aglomeração de animais (LEAK, 1999; SILVA et al., 2008; FELIPE; KATAOKA, 2019; MOREIRA; GONÇALVES; SILVA, 2020).

Os aspectos sazonais observados para Leptospirose vão de encontro ao fato de que no verão, quando a doença apresentou seu pico, fatores como umidade, temperatura e pluviosidade são abundantes no estado de Minas Gerais, corroborando as características de sazonalidade já atribuídas a esta doença por Mineiro et al., (2007); Matsunaga et al., (2007); INMET (2017). É importante salientar que as leptospirosas conseguem sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente, podendo ser esta a justificativa para a ocorrência da Leptospirose no inverno e primavera (LEVETT, et al., 2006; LANGONI, 1999). Entretanto, a queda brusca da prevalência da Leptospirose no outono merece também atenção e, a justificativa é encontrada quando avaliado o fato de que esta foi a estação na qual foi percebida a prevalência para monoinfecção por *T. vivax* no presente estudo.

O fato de Neosporose ser uma enfermidade encontrada de forma isolada no outono e inverno e a Leucose ser observada também de forma isolada em todas as estações do ano,

corroboram a ideia de Dubey et al., (2003); Silva Filho et al., (2011); Meirelles-Bartoli; Sousa (2013) e Zanatto et al., (2019) que indicam que as duas doenças são infecções primárias.

As coinfeções entre IBR, BVD, Neosporose e a Tripanossomíase foram importantes em todas as estações do ano sendo que no verão, inverno e primavera, deve-se pensar principalmente em diagnósticos diferenciais entre Tripanossomíase, Neosporose e IBR, enquanto no outono os principais diagnósticos diferenciais devem incluir IBR e BVD. É importante observar que a necessidade do diagnóstico diferencial incluindo essas doenças já foi descrito porém, a partir do exposto, nota-se a necessidade de evidenciar que estas enfermidades podem ainda estar presentes como coinfeções, como mencionado por Mendes et al., (2009) e Teixeira (2019) e não apenas em quadros de monoinfeções.

Sabendo da importância de IBR, BVD e Neosporose no que diz respeito à quadros de coinfeção com Tripanossomíase, é necessário mencionar que as quatro doenças têm como ponto em comum o fato de serem favorecidas em situações de manejo sanitário incorreto dentro de um mesmo rebanho portanto, conhecendo os impactos negativos nos rebanhos afetados bem como as altas prevalências encontradas no presente estudo, medidas manejo que aumentem a condição sanitária adequada são essenciais bem como a conscientização dos produtores e funcionários sobre a importância da adoção de tais medidas (DUBEY, 2003; MARQUES 2003; ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999; BASTOS et al., 2017).

Segundo Cantos et al., (2000) altas titulações sorológicas indicam doença ativa e, consequentemente sintomas resultantes daquela doença em específico que está sendo avaliada. Este fato pode ser notado quando observado que as altas titulações para *T. vivax* foram percebidas principalmente em casos de monoinfeção, já quando as titulações para *T. vivax* eram baixas, foram percebidas maiores porcentagens de coinfeções. Portanto, em situações de positividade para Tripanossomíase em que as titulações sorológicas foram baixas (1:80 e 1:160), deve-se pensar na possibilidade e consequente pesquisa laboratorial de coinfeções.

A observação sobre o perfil de positividade e sazonalidade para IBR, BVD e Neosporose indica a importância dessas doenças serem incluídas como diagnósticos diferenciais importantes para Tripanossomíase, visto que essas enfermidades exibiram perfil de mono e/ou coinfeção relevantes. Esta identificação é validada quando observado que o grupo de doenças infectocontagiosas capazes de gerar sintomas produtivos e reprodutivos é amplo e, delimitar um grupo de enfermidades cuja relação com a Tripanossomíase é maior, é um grande facilitador no momento da solicitação dos exames laboratoriais, assim como mencionado por Del Fava; Pituco; Genovez (2007) e Zanatto et al., (2019). Somado a isto, a correlação entre as titulações

para *T. vivax* e a ocorrência de coinfeções também é um aspecto capaz de auxiliar na decisão de realizar diagnósticos diferenciais para outras enfermidades. Animais com sinais clínicos e títulos baixos para *T. vivax* devem ser submetidos a diagnósticos diferenciais para Neosporose, IBR e BVD, por exemplo.

CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos pode-se concluir que:

- Doenças como IBR e BVD são mais prevalentes em animais com suspeita clínica de tripanossomíase, sendo necessário a realização de diagnósticos diferenciais.

- Diagnósticos diferenciais entre *T. vivax*, Neosporose, IBR e BVD devem ser solicitados pelos médicos veterinários principalmente no verão, inverno e primavera para aqueles animais que apresentarem sinais clínicos de tripanossomíase.

- Animais com suspeita clínica de tripanossomíase associada a títulos baixos de anticorpos para *T. vivax* devem ser submetidos a outros diagnósticos diferenciais principalmente para Neospora, IBR e BVD.

- A avaliação da sazonalidade é uma boa forma para limitar os diagnósticos diferenciais necessários durante a pesquisa laboratorial.

- A alta prevalência das doenças avaliadas indica a necessidade de serem adotadas medidas de controle dentro das propriedades rurais, principalmente no que diz respeito a implementação de práticas sanitárias.

REFERÊNCIA

- ANDRADE NETO, A.Q. et al., Diagnostic, Clinical and Epidemiological aspects of dairy cows naturally infected by *Trypanosoma vivax* in the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.41, 2019.
- BARBOSA, V.M. et al., Fatores de risco associados à infecção viral (BoHV-1 e BVDV) em rebanhos leiteiros mestiços com problemas reprodutivos no município de Uberlândia, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.4, 2019.
- BARROS FILHO, I.R. et al., Soroprevalência de anticorpos para o vírus da Leucose Enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, 2010.
- BASTOS, T.S.A. et al., First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.26, n., 2017.
- BATISTA, J.S. et al., Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.1, 2008.
- BATISTA, J.S. et al., Risk factor for trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle raised in Rio Grande do Norte state. **Animal Parasitology**, v. 85, 2018.
- CADIOLI, F.A. et al., First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.21, n.2, p.118-124, 2012.
- DEL FAVA; C; PITUCO, E.M; GENOVEZ, M.E. Diagnóstico Diferencial de Doenças da Reprodução em Bovinos: Experiência do Instituto Biológico. **Biológico**, v.69, n.2, 2007.
- DUBBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, v.41, n.1, 2003.
- FAVA, C.D.F; PITUCO, E.M; GENOVEZ, M.E. Diagnóstico Diferencial de Doenças da Reprodução em Bovinos: Experiência do Instituto Biológico. **Instituto Biológico**, v. 6, n.2, 2007.
- FELIPE, C.F.R; KATAOKA, A. Tripanossomíase bovina: uma breve revisão. **Scientific Electronic Archives**, v.12, n.1, p.159-168, 2019.
- FRANÇA, C.A.B. et al., Prevalência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em vacas leiteiras procedentes da agricultura familiar no estado de Pernambuco. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v.15, n.3, 2021.
- INMET- Instituto Nacional de Meteorologia. Nota técnica 004/17, de 2017. Estação chuvosa em Minas Gerais. **5º Distrito de Meteorologia**. Disponível em: https://portal.inmet.gov.br/uploads/notastecnicas/Nota_tecnica_CEDEC_04_17.pdf. Acesso em: 14 nov.2021.
- LANGONI, H. Leptospirosis, n.e: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. v.2, 1999.
- LEAK, S.G.A. **Tsetse Biology and Ecology**, 1.ed. Oxford: Cabi Publishing, 1999.
- MADRUGA, C.R. Epidemiologia do *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, 1, 2009. Disponível em: www.revistas.ufg.br/vet/article/view/7668. Acesso em: 16 nov.2021.
- MENDES, M.B. et al., Determinação da prevalência das principais doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba-MG. **Ciência Animal Brasileira**. 2009.
- LEVETT, P.N. et al., *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, 2006.
- MARQUES, D.C. **Criação de Bovinos**. 7. Ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. p.517-519.
- MATSUNAGA, J. et al., Resposta de *Leptospira interrogans* à Osmolaridade Fisiológica: Relevância da Sinalização da Transcrição Ambiente-para-Hospedeiro. **Infection and Immunity**, v.75, n.6, 2007.

- MEIRELLES-BARTOLI, R.B; SOUSA, D.B. Leucose enzoótica bovina: importância do desenvolvimento da enfermidade na eliminação viral. **PubVet**, v.7, n.11, 2013.
- MENDES, M.B. et al., Determinação da prevalência das principais doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba-MG. **Ciência Animal Brasileira**. 2009.
- MINEIRO, A.L.B.B. et al., Infecção por *Leptospira* em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condição climática. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.,59, n.5, 2007.
- MOREIRA, F.A.V.F; GONÇALVES, M.M.A; SILVA, M.C. Impacto do vírus da diarreia viral bovina sobre a reprodução. **Ciência Animal**, v.30, n.4, 2020
- MYERES, D.M. **Manual de métodos para el diagnostico de laboratorio de la leptospirosis**. OPS: Centro Panamericano de Zoonoses, 1985 (Nota técnica nº30).
- OGWU, D; NJOKU, C.O. Effect of pregnancy on clinical manifestations of bovine tripanosomiasis. **Veterinary Parasitology**. v.24, n.1-2, p.25-33, 1987
- PAIVA, F. et al., *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: I- Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.9, v.2, p.135-141, 2000.
- PEREIRA, H.D. et al., Clinical and epidemiological aspects and diagnosis of *Trypanosoma vivax* in a cattle herd, stat of Maranhão, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 38, n.5, p.896-901, 2018.
- REZENDE, E.V. **Impacto das doenças no pós-parto sobre a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras e mestiças**. 2019, 81 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- ROCHA, M.A; GOUVEIA, A.M.G; LEITE, R.C. Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. **Ciência Rural**, v.29, n.2, 1999.
- ROSA, A.N.F; NOGUEIRA, E; CAMARGO JÚNIOR, P.P. **Estação de Monta em Rebanhos de Gado de Corte**: EMBRAPA: Campo Grande, Comunicado Técnico nº 134, 2017.
- SANTOS, G.R. et al., Análise epidemiológica da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), na microrregião Garanhuns, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n.4, 2013.
- SILVA, C.C. **Estudo parasitológico, sorológico e molecular de amostras de sangue de bovinos encaminhadas ao Hospital Veterinário de Uberaba com suspeita clínica de Tripanossomíase por *Trypanosoma vivax***. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos) – Universidade de Uberaba, Uberaba, 2018.
- SILVA, R.A.M. et al., **Tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax* no Brasil e Bolívia: sintomas clínicos, diagnósticos e dados epizootiológicos**. Corumbá: EMBRAPA Gado de Corte, 1997. 17 p.
- SILVA, R.A.M.S. et al., ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax***. **Biologia, Diagnóstico e Controle**. Corumbá: EMBRAPA, 2002. 137 p.
- SILVA FILHO, A.P. et al., Lymphosarcoma in cattle from the hinterland of Pernambuco state. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.7, 2011.
- SILVA, M.I.S. et al., Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.2, 2008.
- TEIXEIRA, C.C.L. Prevalência de Leptospirose em vacas leiteiras no Município de João Pinheiro, Minas Gerais. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso- Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Gama, 2019.
- URZÊDA, M. et al., Soroprevalência de Leptospirose em fêmeas bovinas na microrregião do Vale do Rio dos Bois, Goiás, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.9, 2020.
- ZANATTO, D.C.S. et al., *Coxiella burnetii* associated with BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus), BoHV (Bovine Herpesvirus), *Leptospira spp.*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*

and *Trypanosoma vivax* in reproductive disorders in cattle. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.28, n.2, 2019.

Ofício CEEA-004/2020

Uberaba, 25 de setembro de 2020.

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 004/2020 relativo ao projeto intitulado **“Diagnóstico de anticorpos anti trypanosoma vivax em amostras eluidas de papel filtro e de outras enfermidades que se assemelham a tripanosomiase e impactam o desenvolvimento da pecuária”** que tem como responsável a **Profª. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 004/2020 related to the project entitled **“Diagnosis of anti trypanosoma vivax antibodies in samples eluted from filter paper and other diseases resemble trypanosomiasis and impact livestock development”**, under the supervision of **Prof. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,



Profª. Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Coordenadora do CEEA-UNIUBE