

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
CAMILA CRISTINA DA SILVA

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*.

UBERABA, MG  
2018



CAMILA CRISTINA DA SILVA

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*.

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 Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba.

Orientadora: Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar

UBERABA, MG  
2018

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

S38e Silva, Camila Cristina da.  
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* / Camila Cristina da Silva. – Uberaba, 2018. 70 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 Ferreira Figueiredo Bittar.

1. *Trypanosoma vivax*. 2. Bovino. 3. Diagnóstico. I. Bittar, Joely Ferreira Figueiredo. II. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 614.53

CAMILA CRISTINA DA SILVA

**ESTUDO PARASITOLÓGICO, SOROLÓGICO E MOLECULAR DE AMOSTRAS  
DE SANGUE DE BOVINOS ENCAMINHADOS AO HOSPITAL VETERINÁRIO DE  
UBERABA COM SUSPEITA CLÍNICA DE TRIPANOSSOMÍASE POR T. VIVAX**

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: 14/05/2018

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª. Dr.ª. Joely Ferreira F. Bittar - Orientadora  
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar  
Universidade de Uberaba



Prof.ª. Dr.ª. Alessandra Ap. Medeiros Ronchi  
Universidade Federal de Uberlândia



*Cultive sinceridade, aceitando-se como é e  
acolhendo os outros como os outros são,  
procurando, porém, fazer sempre o melhor ao  
seu alcance”*

*Francisco Cândido Xavier*





## AGRADECIMENTOS

Tenho muitas pessoas para agradecer durante esta caminhada... começo por alguém que sempre me mostrou que a vida é um caminho do qual não dominamos... e o que nos resta é manter a fé, a força, a temência...e aceitar com sabedoria todas as Suas decisões.... “É a inteligência suprema que me mostra que a estrada que nos leva à felicidade faz parte de um método gradual de crescimento íntimo, cuja prática só pode ser exercitada pausadamente, pois a verdadeira fórmula da felicidade é a realização de um constante trabalho interior”... muito obrigada Senhor (Psicografia de Francisco do Espírito Santo Neto).

Gostaria de agradecer a Mim mesma, pela persistência, força e determinação. Mas claro...não teria êxito se não tivesse obtido o suporte de uma Família e Amigos incríveis...

A Família... nasci de uma maravilhosa e formei uma fenomenal... tenho sorte de ter Pais (Matazo e Marlene) amorosos e solidários... Irmãos (Graciella e Matazo Filho) acolhedores e verdadeiros amigos.... Esta família me proporcionou o conhecimento para montar o alicerce da família que formei.... Sem eles não estaria aqui... Trilhando este caminho... Muito obrigada.

Já a Família que formei é composta por um cara incrível (Rodrigo)... Sábio, Confiante, Trabalhador, Comprometido com o nosso Lar e com as nossas Filhas (Nicole Cristina e Helena Cristina). Cada dia passado juntos demonstra que fiz a escolha certa. Incentivador e parceiro em mais esta conquista. Te amo lindão! E as superfilhas.... Nicolinha e Heleninha... Ah!!! Estes são os amores de vida!!!! São o sentido que nos motiva a lutar... sempre!! São a nossa maior missão... simplesmente nos ensina a amar... além de nós mesmos... obrigada minhas filhas!

Aos maravilhosos amigos... Jandra e Álvaro... nossa... agradecer vocês por palavras é muito pouco... mas obrigada por tudo, pela generosidade do acolhimento, do alimento, dos ensinamentos e principalmente pela Amizade... muito obrigada!!! Vocês são demais!

Aos amigos incríveis Carol, Joel, Antonieta, Lucas Perroni, Larisse e Guilherme Caetano pelo auxílio, acolhimento, solidariedade e pela mais sublime amizade... me ensinando sempre a ver



com bondade e a ouvir com lógica.... Obrigada pelos ensinamentos.... Por tudo queridos amigos...!

A querida Professora Joely pela paciência, sabedoria e principalmente pela generosidade imensurável.....me ensinou que toda a realização é feita pouco a pouco... e que o essencial em ter êxito não é aquilo que você distribui e sim a maneira pela qual você se decide a servir... me acolhendo gentilmente em sua casa, perante a sua família... me sinto honrada por isso. Muito obrigada... por tudo.

A minha querida amiga Meire e família... essencial para esta conquista, ficou com as minhas filhas me proporcionando confiança e tranquilidade para a realização deste trabalho... enfeitando o meu lar com os recursos da gentileza e do bom- humor.... muito obrigada minha amiga... sou muito grata.

Aos amigos que tive a oportunidade de conhecer durante o mestrado, Durval, Olegário, Renata, Ana Paula, Lucas, Rafaela, Maritssa, Breno, Júlio... a todos... mencionados aqui ou não, meus sinceros agradecimentos... esta caminhada com vocês foi muito gratificante. Obrigada pela generosidade do auxílio tão grandioso. Aprendi com cada um de vocês...

Aos queridos Professores do Mestrado... obrigada pelos ensinamentos. Aprendi com vocês que em qualquer circunstância é preciso não esquecer de primeiro ver e ouvir para compreender e auxiliar. Muito obrigada!

A CAPES pela oportunidade a mim concedida, disponibilizado a Bolsa para a realização de mais esta conquista.

Ao Colégio Técnico da UFMG (COLTEC) pelo auxílio na realização da PCR, em especial a Aluna do Mestrado Ana Paula pela ajuda imprescindível nesta etapa.

Agradeço ao Professor Gabriel da UFTM pela extraordinária análise estatística deste estudo.

Agradeço ao Hospital Veterinário de Uberaba e as equipes pertencentes dos Laboratórios de Patologia Clínica e Medicina Veterinária Preventiva pela disponibilidade dos dados e pela ajuda constante.



Por fim agradeço, a todos... que direta ou indiretamente me ajudaram... creio que estas palavras são muito pouco para agradecer o enorme bem concedido a mim e a minha família... Enxergo que o amor, em sua existência, será aquilo que você fizer dele!!! Então agradeço e compartilho com todos o amor recebido até aqui!!!



## RESUMO

A tripanossomíase bovina causada pelo *Trypanosoma vivax* gera prejuízos econômicos para a indústria pecuária por acarretar perdas na produção de leite, emagrecimento, febre, distúrbios neurológicos, aborto, repetição de cio, infertilidade, e morte dos animais infectados. Assim, o presente trabalho objetivou realizar um estudo parasitológico, sorológico e molecular de amostras de sangue de bovinos encaminhadas ao Hospital Veterinário de Uberaba com suspeita clínica de Tripanossomíase por *T.vivax*, bem como correlacionar os títulos sorológicos dos animais à presença do agente por PCR, no período entre 2015 e 2016. Para isso foram realizadas as técnicas *Buffy coat*, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação de Cadeia de Polimerase (PCR), respectivamente. Das 7464 amostras encaminhadas para o Hospital Veterinário de Uberaba, 990 amostras foram para a pesquisa parasitológica e 6474 para a sorologia. Na pesquisa parasitológica observou-se a presença de tripomastigota de *T.vivax* em 5,96% das amostras (59/990). Na sorologia 78,84% (5104/6474) apresentaram anticorpos IgG anti *T.vivax*, com títulos variando de 80 a 1280. Na pesquisa molecular, identificou-se DNA de *T.vivax* em 96,0% (24/25) das amostras positivas na pesquisa parasitológica. A identificação de DNA nas amostras negativas no parasitológico e positivas na sorologia com diferentes títulos foi de 4,42% (5/113) sendo 7,69% (2/26) na titulação 1:80, 3,85% (1/26) na titulação 1:160, 6,25% (1/16) na 1:640 e 6,25% (1/16) na titulação de 1:1280. Não foi observado DNA de *T.vivax* na titulação 1:320 (0/29). Neste contexto, pode-se concluir que os animais com suspeita clínica de tripanossomíase estão tendo contato com o agente o que permite o desenvolvimento de resposta imune e conseqüentemente o aumento da prevalência de anticorpos anti *T.vivax*, e que não há correlação dos altos títulos sorológicos com a presença do parasita por PCR.

**Palavras-chaves:** *Trypanosoma vivax*, Bovino, Diagnóstico.





## ABSTRACT

Bovine trypanosomiasis caused by *Trypanosoma vivax* causes economic losses to the livestock industry as a result of losses in milk production, weight loss, fever, neurological disorders, abortion, estrus recurrence, infertility, and death of infected animals. Thus, the present work aimed to perform a parasitological, serological and molecular study of bovine blood samples sent to the Veterinary Hospital of Uberaba with clinical suspicion of Trypanosomiasis by *T.vivax*, as well as to correlate the serological titres of the animals to the presence of the agent by PCR, in the period between 2015 and 2016. Buffy coat, Indirect Immunofluorescence Reaction (RIFI) and Polymerase Chain Reaction (PCR), respectively, were performed. Of the 7464 samples sent to the Uberaba Veterinary Hospital, 990 samples were for parasitological research and 6474 for serology. In parasitological research the presence of *T. vivax* trypomastigote was observed in 5.96% of the samples (59/990). In the serology, 78.84% (5104/6474) had anti-*T.vivax* IgG antibodies, with titers varying from 80 to 1280. In molecular research, *T.vivax* DNA was identified in 96.0% (24/25) of positive samples in parasitological research. The identification of DNA in negative parasitological and positive samples in serology with different titres was 4.42% (5/113) and 7.69% (2/26) in the titre 1:80, 3.85% (1 / 26) at titration 1: 160, 6.25% (1/16) at 1: 640 and 6.25% (1/16) at the titration of 1: 1280. *T.vivax* DNA was not observed at titre 1: 320 (0/29). In this context, it can be concluded that animals with clinical suspicion of trypanosomiasis are in contact with the agent which allows the development of immune response and consequently the increase in the prevalence of anti-*T.vivax* antibodies, and that there is no correlation of the high serological titers with the presence of the parasite by PCR

**Key-words:** *Trypanosoma vivax*, Bovine, Diagnosis.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Fotomicrografia de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo de sangue periférico de bovino (100x). Notar a morfologia e principais organelas presentes na forma tripomastigota (Seta preta: Núcleo, Seta branca: Cineptoplasto) **19**
- Figura 2** Prevalência de tripomastigotas de *T.vivax*, no teste parasitológico, de amostras encaminhadas ao HVU (A) durante os anos de 2015 e 2016 (B). **43**
- Figura 3** Prevalência de anticorpos anti *T.vivax* (A) em bovinos submetidos a pesquisa sorológica por IFI no período de 2015 a 2016 (B). **46**



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Quantidade de amostras utilizadas para determinação do PCR de acordo com os resultados parasitológico e sorológico.	<b>38</b>
<b>Tabela 2</b>	Número de amostras submetidas à pesquisa parasitológica e sorológica em relação a idade, sexo, raça e localidade nos anos de 2015 e 2016	<b>42</b>
<b>Tabela 3</b>	Número de amostras submetidas a pesquisa parasitológica em relação ao sexo, a idade e raça nos anos de 2015 a 2016.	<b>44</b>
<b>Tabela 4</b>	Prevalência de amostras positivas para <i>Trypanosoma vivax</i> na pesquisa parasitológica de acordo com o Município durante os anos de 2015 a 2016.	<b>45</b>
<b>Tabela 5</b>	Prevalência de tripomastigota de <i>T.vivax</i> em amostras encaminhadas ao HVU durante os meses dos anos de 2015 a 2016.	<b>45</b>
<b>Tabela 6</b>	Percentual de amostras positivas de acordo com os títulos sorológicos de amostras de bovinos submetidas a pesquisa sorológica por RIFI durante os anos de 2015 e 2016.	<b>46</b>
<b>Tabela 7</b>	Número de amostras submetidas a RIFI em relação ao sexo, a idade e raça nos anos de 2015 a 2016.	<b>47</b>
<b>Tabela 8</b>	Prevalência de amostras positivas para <i>T.vivax</i> por RIFI de acordo com o Município durante os anos de 2015 a 2016.	<b>48</b>
<b>Tabela 9</b>	Prevalência de anticorpos anti <i>T. vivax</i> em amostras encaminhadas ao HVU durante os meses dos anos de 2015 a 2016	<b>49</b>
<b>Tabela 10</b>	Percentual de positividade no exame parasitológico perante os diferentes títulos sorológicos, no período de 2015 a 2016 de amostras de bovinos com suspeita clínica de <i>T. vivax</i>	<b>49</b>



<b>Tabela 11</b>	Perfil da pesquisa molecular realizada em amostras de sangue de bovinos com diferentes resultados nos exames parasitológico e sorológico	<b>50</b>
<b>Tabela 12</b>	Correlação entre o <i>Buffy coat</i> e o PCR	<b>51</b>
<b>Tabela 13</b>	Correlação entre a Sorologia (RIFI) e o PCR	<b>51</b>
<b>Tabela 14</b>	Distribuição da amostra segundo o padrão- ouro	<b>51</b>





## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><i>T.vivax</i></b>	<i>Trypanosoma vivax</i>
<b>BCT</b>	<i>Buffy Coat Technique</i>
<b>PCR</b>	Reação de Polimerase em Cadeia
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>N</b>	Núcleo
<b>C</b>	Cinetoplasto grande pós-nuclear
<b>F</b>	Com flagelo
<b>CB</b>	Corpo basal
<b>MO</b>	Membrana ondulante
<b>RIFI</b>	Reação de Imunofluorescência Indireta
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático
<b>VSG</b>	Glicoproteínas variáveis de superfície
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>LT-<math>\gamma\delta</math></b>	Linfócitos T gama-delta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>LT CD4+</b>	Linfócito T Auxiliar CD4
<b>LT CD8+</b>	Linfócito T Auxiliar CD8
<b>LT-<math>\delta</math></b>	Linfócito T Delta padronizar para LT- $\gamma\delta$
<b>MHCT</b>	Técnica do microhematócrito
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético di-sódico
<b>G</b>	Gramas
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>MI</b>	Mililitro
<b>°C</b>	Graus centígrados
<b><math>\mu</math>g</b>	Micrograma
<b>TviSL</b>	<i>T.vivax Spliced leader</i>
<b>HVU</b>	Hospital Veterinário de Uberaba



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>18</b>
2.1	O PARASITO <i>Trypanosoma vivax</i> e SUAS FORMAS DE TRANSMISSÃO	18
2.2	EPIDEMIOLOGIA	20
2.3	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	24
2.4	RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO	27
2.4.1	<b>Resposta inata</b>	27
2.4.2	<b>Resposta imune adquirida</b>	27
2.4.2.1	<b>Resposta humoral</b>	27
2.4.2.2	<b>Resposta mediada por células</b>	28
2.5	DIAGNÓSTICO	29
2.5.1	<b>Testes Parasitológicos- WOO e <i>Buffy coat</i></b>	29
2.5.2	<b>Testes Sorológicos</b>	30
2.5.3	<b>Testes Moleculares</b>	31
2.6	TRATAMENTO	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	36
4.2	PESQUISA PARASITOLÓGICA	36
4.2.1	<b>Amostras de sangue</b>	36
4.2.2	<b>Técnica <i>Buffy Coat</i> – BCT</b>	36
4.3	PESQUISA SOROLÓGICA	37
4.3.1	<b>Amostra dos soros</b>	37



<b>4.3.2</b>	<b>Reação de Imunofluorescência indireta – RIFI</b>	<b>37</b>
4.4	REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE- PCR	38
<b>4.4.1</b>	<b>Amostras biológicas</b>	<b>38</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Extração de DNA</b>	<b>39</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional</b>	<b>39</b>
4.5	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	40
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
5.1	PARASITOLÓGICO	43
5.2	SOROLÓGICO	46
5.3	CORRELAÇÃO EXAMES PARASITOLÓGICOS E SOROLÓGICO	49
5.4	MOLECULAR	50
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase causada pelo *Trypanosoma vivax* (*T.vivax*) gera prejuízos econômicos para a indústria pecuária por acarretar perdas na produção de leite, emagrecimento, febre, manifestações neurológicas, aborto, repetição de cio, infertilidade e morte dos animais infectados (SILVA et al., 2004).

No Brasil, a ocorrência do *T.vivax* foi observada pela primeira vez por Shawn; Lainson (1972) no Estado do Pará, mediante a verificação do parasita em esfregaço sanguíneo de um búfalo que apresentava febre e perda de peso. Outros relatos sobre *T.vivax* foram feitos também por Serra-Freire; Silva; Muniz (1981), em bovinos, no Amapá.

A doença encontra-se disseminada por todo o País com surtos nos estados de Mato Grosso (SILVA; DAVILA, 1998), Tocantins (LINHARES et al., 2006), Paraíba (BATISTA et al., 2008), Maranhão (GUERRA et al., 2008), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009) e São Paulo (CADIOLI et al., 2012).

No estado de Minas Gerais houveram relatos de surtos de Tripanossomíase bovina em Uberaba (BITTAR et al., 2006), em bovinos leiteiros no município de Igarapé (CARVALHO et al., 2008), Veríssimo (CAMPOS et al., 2012), Água Comprida, Campo Florido, Conceição das Alagoas, Conquista e Delta (FRANJE et al., 2012). Anos mais tarde, Meneses (2016) relatou a soroprevalência de 3,05% no Triângulo Mineiro e 3,03% no Alto do Paranaíba.

Os episódios de tripanossomíase verificados em várias regiões do território brasileiro podem ser decorrentes de alguns fatores como a introdução de animais portadores de parasitemia nos rebanhos, da ocorrência de vetores mecânicos suficientes para efetuar a transmissão, ou pela manutenção de animais susceptíveis a infecção por *T.vivax* (MADRUGA, 2009; ALMEIDA et al., 2010).

Índices elevados de surtos aumentam as taxas de mortalidade entre os animais. Os ruminantes, considerados os mais acometidos, podem desenvolver as formas aguda, subaguda e crônica da doença. Os principais sinais clínicos encontrados na fase aguda e subaguda são febre, anemia, fraqueza, emagrecimento progressivo, lacrimejamento, conjuntivite, síndromes hemorrágicas, inapetência, diarreia, imunossupressão e aborto (GAUNT, 2000; SILVA et al., 2004; CARVALHO et al., 2008, ALMEIDA et al., 2010). Manifestações neurológicas também podem ser

encontrados, caracterizadas por ataxia, tremores musculares, cegueira transitória e/ou permanente (BATISTA et al., 2008). Na fase crônica da infecção os animais tornam-se assintomáticos dificultando o diagnóstico e levando os animais ao estado de portador/reservatório da infecção (LINHARES et al., 2006; BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008).

O diagnóstico da tripanosomíase é realizado através da avaliação clínica-hematológica dos animais associada à utilização de técnicas de diagnóstico como a técnica parasitológica *Buffy coat* (BCT) (SILVA et al., 2002), a sorologia por imunofluorescência indireta (DESQUESNES; TRESSE, 1996; CORTEZ et al., 2009) e testes moleculares como a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) (GONZALEZ et al., 2003).

Em trabalho realizado por Frange et al. (2012) na microrregião de Uberaba-MG pode-se observar que 100,00% dos animais eram negativados ao exame parasitológico, que somente 21,10% dos bovinos apresentavam anticorpos anti *T.vivax* e que 79,90% dos animais não apresentam anticorpos contra o protozoário o que indica que os animais nunca tiveram contato com o parasita permitindo assim o aparecimento de surtos da doença.

Em outro levantamento sorológico realizado a partir de amostras recebidas pelo Hospital Veterinário de Uberaba no período de 2013 a 2014, foi observado que 15,10% (35/231) e 31,20% (184/589) das amostras submetidas a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), respectivamente, apresentavam positividade na detecção de anticorpos anti-*T.vivax* (dados não publicados).

Diante desses dados o presente trabalho objetivou realizar um estudo sorológico, parasitológico e molecular de amostras de sangue de bovinos encaminhadas ao Hospital Veterinário de Uberaba com suspeita clínica de Tripanosomíase por *T.vivax*, bem como correlacionar os títulos sorológicos dos animais à presença do agente por PCR, no período entre 2015 e 2016.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

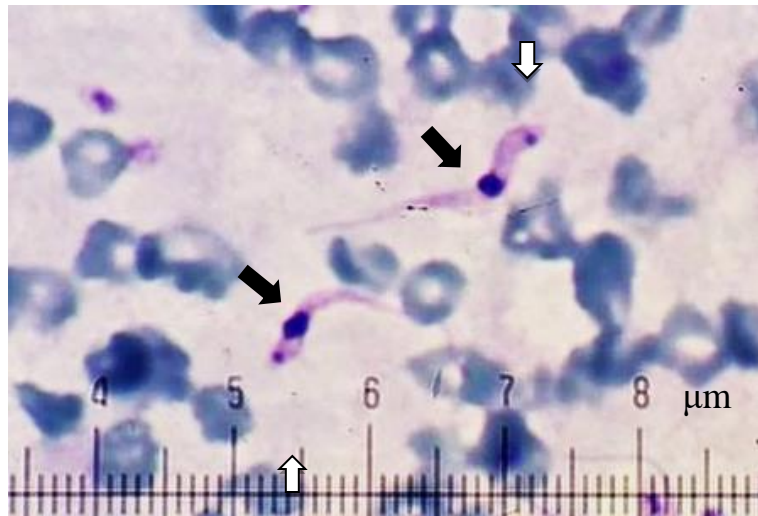
### 2.1 O PARASITO *Trypanosoma vivax* e SUAS FORMAS DE TRANSMISSÃO

As tripanossomíases são doenças causadas por protozoários do gênero *Trypanosoma*, sendo o *Trypanosoma (Duttonella) vivax* um hemoparasito pertencente à família *Trypanosomatidae* que foi introduzido na América do Sul com o gado importado da África, provavelmente no final do século XIX (GARDINER, 1989; BATISTA et al., 2008). Este gênero compõe um enorme grupo de hemoparasitos flagelados que infectam membros de todas as classes de vertebrados e que são transmitidos por diversos vetores, tais como os invertebrados hematófagos (HOARE, 1972).

Com base na forma de transmissão e desenvolvimento dos vetores, autores dividiram este gênero em duas seções, a *Salivaria* e a *Stercoraria*, sendo o *T.vivax* pertencente à primeira. Essa seção inclui tripanosomatídeos transmitidos pela saliva de moscas contaminadas com o parasito por transmissão tipo inoculativa (HOARE, 1972; LOSOS, 1986).

De acordo com Dabus; Campos; Neves (2011) morfologicamente este protozoário possui três formas distintas, a amastigota, a tripomastigota e a epimastigota. As formas tripomastigostas e epimastigostas metacíclicas são encontradas mais comumente no Continente Africano; a forma tripomastigosta, presente na América do Sul, é encontrada unicamente na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado.

A forma tripomastigota apresenta como principais organelas o núcleo (N), o cinetoplasto grande pós-nuclear (C) com flagelo (F) e o corpo basal (CB), que juntos formam uma membrana ondulante (MO), conforme apresentado na Figura 1 (SILVA et al., 2002). Hoare (1972) cita que aumentos significativos do cinetoplasto grande pós-nuclear, quando comparado a outras espécies, são indicativos do *T.vivax*, facilitando a sua identificação em esfregaços de sangue periférico.



**Figura 1** – Fotomicrografia de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo de sangue periférico de bovino (100x). Notar a morfologia e principais organelas presentes na forma tripomastigota (Seta preta: núcleo, Seta branca: cinetoplasto).  
Fonte: Arquivo pessoal (2015)

Com relação ao ciclo de vida, o *T.vivax* africano envolve dois hospedeiros. Um vertebrado, geralmente mamíferos ungulados, considerado hospedeiro final, e outro invertebrado, sendo geralmente a mosca do gênero *Glossina spp* conhecida como mosca tsé-tsé, considerada hospedeira intermediária e responsável pela transmissão mecânica da doença para os hospedeiros vertebrados (OSÓRIO et al., 2008).

No inseto a forma sanguínea é ingerida e ficam localizadas no esôfago e faringe. Depois de 24 horas as formas epimastigotas migram em direção ao canal alimentar onde se multiplicam intensivamente. Posteriormente migram em direção à hipofaringe onde se transformam em formas tripomastigotas e em formas infectantes, denominadas tripomastigotas metacíclicos. Por fim, essa forma infectante é transmitida para um novo hospedeiro (SILVA et al., 2002).

Na maioria das espécies, inclusive os bovinos, os tripomastigotas metacíclicos inoculados multiplicam-se podendo provocar reações cutâneas (entumescimento). Em seguida transformam-se em tripomastigotas, adentram a corrente sanguínea de forma direta ou indiretamente, pelos vasos linfáticos, iniciando as parasitemias intermitentes (RADOSTITS et al., 2002).

Na América do Sul, devido à perda da habilidade de se desenvolver ciclicamente em vetores potenciais como na mosca tsé- tsé presente no continente africano, o parasita passou a ser transmitido mecanicamente através de dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus spp* (“mutucas”) e *Stomoxys spp* a partir da inoculação das formas tripomastigostas, encontradas no seu aparelho bucal. Neste caso, a mosca se alimenta de mais de um animal e permanece infectante por apenas um curto período de tempo (GUERRA et al., 2008). Sendo assim, alguns estudos demonstram que nas épocas chuvosas, há o aumento do risco de transmissão do tripanossoma, por este período compreender justamente picos populacionais altíssimos destes insetos vetores (OTTE; ABAUBARA; WELLS, 1994; SILVA et al., 2002).

As formas sanguíneas também podem ser transmitidas mecanicamente a partir do uso de fômites contaminados com sangue contendo o parasito. Um exemplo clássico dessa forma de contaminação são as agulhas usadas diversas vezes em vários animais para a aplicação de medicamentos, como a ocitocina em bovinos de aptidão leiteira (HOARE, 1972; GARDINER, 1989; SILVA et al., 2002; CUGLOVICCI et al., 2010).

Independente da forma de transmissão, outros animais são considerados sensíveis ao *T.vivax*, além dos bovinos, como os bubalinos, os ovinos, os caprinos, os equídeos e, mais recentemente, os suínos (LEVINE, 1973; NG'AYO et al., 2005; SIMO et al., 2006).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

Na África a tripanossomíase foi relatada desde meados do século XIX em bovinos anêmicos (DABUS; CAMPOS; NEVES, 2011). Neste continente a transmissão do hemoparasito está associada principalmente à presença da mosca tsé-tsé. Estudos realizados por Delafosse et al. (2006) mostraram a ocorrência de *T.vivax* nos rebanhos bovinos localizados no Lago Chade (Continente Africano), local esse considerado área livre do vetor, sugerindo a possibilidade de transmissão por outros vetores como as moscas *Stomoxys calcitrans* e *tabanus*, principalmente na estação chuvosa.

Devido à alta capacidade de adaptação e por ser transmitido mecanicamente por moscas hematófagas (*Stomoxys* e tabanídeos) o parasito acabou se espalhando por toda a América do Sul (SILVA et al., 2002; BATISTA et al., 2007).

Na América Latina o *T.vivax* foi diagnosticado pela primeira vez em 1919 na Guiana Francesa por meio da importação de gado zebu do Senegal, onde observaram-se bovinos leiteiros com alta parasitemia, queda na produção, perda de peso e mortalidade (LEGER; VIENNE, 1919). Posteriormente o parasito foi identificado no sangue de bovinos no Suriname (1938), Panamá (1941), Guiana (1952) e no Brasil (1946) (BODA et al., 1946; MENESES, 2016).

Estudos sorológicos realizado por Wells; Betancourt; Ramirez (1977) *apud* Meneses (2016), identificaram anticorpos anti-*T.vivax*, por meio da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em países como El Salvador (15,00%), Costa Rica (23,00%), Colômbia (48,00%), Equador (23,00%), Peru (14,00%) e no Paraguai (40,00%). Na Bolívia, em 1998, também foi relatado presença do parasita em 29 bovinos examinados mediante a técnica de *Buffy coat* (BCT) (SILVA et al., 1996).

Na Venezuela, no estado de Guárico, Tamasaukas; Roa; Cobo (2006) relataram a soroprevalência da doença em 29,50% de bubalinos examinados pela técnica RIFI, durante o período chuvoso. Em outro estudo, no estado de Guárico, os autores relataram, em animais de dupla aptidão, uma incidência de 0,80% pela técnica de Woo, 2,60% pelo esfregaço sanguíneo corados com Giemsa 10,00%, e 54,60% de soroprevalência geral pelo Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

Ainda, outros pesquisadores, utilizando a técnica ELISA com antígeno p64 purificado a partir do isolamento venezuelano de *T.equiperdum*, conseguiram diagnosticar uma soroprevalência aparente de 37,70% de tripanossomose bovina causada pelo *T.vivax* de bovinos oriundos também do Estado de Guárico (UZCANGA et al., 2016)

No início de 1996 os primeiros casos clínicos de tripanossomíase pelo *T.vivax* foram relatados na Bolívia a partir da importação de bovinos infectados oriundos do Pantanal Brasileiro (SILVA et al., 1996). A partir daí, a doença passou a ser um limitante para a pecuária do país, principalmente em áreas inundadas semelhantes ao Pantanal boliviano no departamento de Santa Cruz (GONZALES; CHACON; MIRANDA, 2007). Nesta mesma região, e também em Lima e no Peru, a prevalência do *T.vivax* pela técnica molecular Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) foi de 0,90% e 3,80%, respectivamente (MEKATA et al., 2009).

No Brasil a tripanossomíase foi relatada a primeira vez por Boda et al. (1946), em bovinos no estado do Pará. Anos mais tarde, no mesmo Estado, Shawn e Lainson (1972) encontraram o parasita em esfregaço sanguíneo de um búfalo que apresentava febre e perda de peso. No Amapá, Serra Freire (1981) relatou um surto em um rebanho bovino. Já Silva et al. (1996) relataram a ocorrência de um surto de tripanossomíase em 10 bovinos oriundos da região de Paconé, no estado de Mato Grosso, seguido por Paiva et al. (1997) que descreveu a ocorrência do parasito no município de Miranda, no Mato Grosso do Sul. Anos mais tarde, no mesmo Estado o autor cita a ocorrência de bovinos com tripanossomíase pelo *T.vivax* localizados no complexo Pantanal (PAIVA et al., 2000). A partir de então, vários outros trabalhos foram publicados descrevendo a disseminação da doença por todo o Brasil (SILVA et al., 1998; LINHARES et al., 2006; BATISTA, 2008).

Em 2008 foi relatado também surtos de Tripanossomíase por *T.vivax* em bezerros no estado do Maranhão (GUERRA et al., 2008). No mesmo estado Melo et al. (2011) realizou coleta de 559 amostras de sangue de bovinos para a realização de estudos parasitológicos e moleculares e notou que na Ilha de São Luís, não foram observados parasitas no exame parasitológico. Ao analisar as mesmas amostras pelo método de PCR três amostras (1,00%) foram identificadas como positivas, demonstrando que a PCR foi mais sensível nessas amostras, confirmando a utilidade do método em pesquisas epidemiológicas.

Em Pernambuco, foi observada a presença do parasito em gado leiteiro oriundo do município de Itambé onde o diagnóstico foi confirmado através de microscopia biométrica, de análise molecular com PCR e por seqüenciamento de DNA (PIMENTEL et al., 2012).

No município de São Pedro, no Rio Grande do Sul, o hemoparasita foi diagnosticado em esfregaço sanguíneo a partir da identificação morfológica tripomastigota e confirmada pela técnica da PCR de uma vaca que apresentava manifestação neurológica (ataxia e paresia) (SILVA et al., 2009).

Em 2012, na cidade de Lins, no estado de São Paulo, ocorreu a primeira descrição de surto de *T.vivax*, onde foram registrados 31 óbitos entre vacas e bezerros de um total de 1080 bovinos. O diagnóstico para *T.vivax* foi possível por meio da visualização das formas tripomastigostas de esfregaços sanguíneos; a espécie foi diagnosticada por meio da técnica de PCR (CADIOLI et al., 2012).

Outro surto de *T.vivax* foi identificado em 2013 no município de Barra do Garças, no Mato Grosso, após o compartilhamento de agulhas entre vacas leiteiras que recebiam dosagens de ocitocina diárias (BASTOS et al., 2013). O compartilhamento de agulhas foi motivo também para outro surto, em Ipameri-GO, em 2015, após a aquisição de 18 animais da raça Girolando de origem desconhecida (BARBOSA et al., 2015).

Em Minas Gerais, vários surtos foram identificados. Dentre eles em vacas que apresentaram perda de visão, anemia e baixo escore corporal (CARVALHO et al., 2008). Bittar et al. (2006) relataram a prevalência de 37,70% de tripanosomatídeo em animais presentes em Uberaba e Frange (2013) descreveu a prevalência de 16,20% de anticorpos anti-*T.vivax* na mesma região. Surtos de tripanossomíase causada por *T.vivax* também foram confirmados em Veríssimo- MG (CAMPOS et al., 2012).

No município de Igarapé-MG, Cuglovici et al. (2010) também comprovaram a presença do parasita em 100,00% das coletas sanguíneas de vacas mestiças que foram submetidas a exames parasitológicos, sorológicos e molecular. Já Meneses (2016) observou que mesmo com baixa prevalência da tripanossomíase em MG, a doença já se apresentava distribuída homogeneamente. Ainda percebeu que o teste de brucelose exerce influência indireta sobre a ocorrência da doença. Comprova-se esse fato ao se observar que na microregião de Uberaba existe um trânsito intenso de animais devido às grandes exposições agropecuárias e a alta comercialização, havendo, assim, uma entrada facilitada de animais infectados (FRANGE, 2013).

Nesse mesmo sentido pode-se verificar que os casos e/ou surtos de tripanossomíase em várias regiões do país podem ser decorrentes de fatores como a introdução de animais no rebanho com parasitemia, a existência de uma população de vetores mecânicos suficientes para transmitir a doença ou até mesmo a presença de animais susceptíveis à infecção por *T.vivax* (MADRUGA, 2009; ALMEIDA et al., 2010).

Além disto, pesquisadores acreditam que esta alta incidência pode estar associada a falta de conhecimento da enfermidade pelos proprietários e profissionais da área, pela escassez de controle e de serviços de diagnóstico veterinários especializados, bem como a ausência de aplicação de fármacos tripanocidas (SILVA et al., 2004; TAMASAUKAS et al., 2014).

### 2.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A patogenia da tripanossomíase é influenciada por diversos fatores, como a susceptibilidade do animal (raça, idade e tripanotolerância), a virulência da cepa do hemoparasita e a presença do vetor mecânico (ANOSA, KANEKO, 1983). Uma vez infectado, o bovino pode apresentar fases de parasitemia e período pré-patente flutuante, podendo apresentar picos de parasitemia no período da manhã e baixos níveis na parte da tarde dentro de um mesmo dia. Já o período pré-patente pode variar de acordo com a virulência do parasito, sendo de nove a 14 dias para isolados virulentos e de três a 59 dias para menos patogênicos (HOARE, 1972; SCHENCK et al., 2001; HILL et al., 2005; ADAMU et al., 2007; OSÓRIO et al., 2008). Em estudo realizado por Bassi (2014) o período pré-patente apresentado por bovinos experimentalmente infectados variou de 11 a 16 dias ( $13,80 \pm 1,78$ ).

Na forma aguda os principais sinais clínicos encontrados nos ruminantes são febre, anemia, fraqueza, emagrecimento progressivo, lacrimejamento, conjuntivite, síndromes hemorrágicas, inapetência, diarreia, imunossupressão e aborto durante o terceiro trimestre de gestação (GAUNT, 2000; SILVA et al., 2004; CARVALHO et al., 2008, ALMEIDA et al., 2010).

Portanto, a infecção pelo parasito apresenta-se de três formas. A primeira, a superaguda, é caracterizada pela alta e persistente parasitemia, levando o animal a óbito dentro de três semanas pós-infecção. A segunda, a fase aguda, é representada pela alta parasitemia associada à diminuição dos parâmetros eritrocitários levando a um quadro de anemia (um dos principais sinais clínicos da doença) que pode durar de duas semanas a dois meses. O diagnóstico de anemia é considerado a principal alteração que constitui a maior causa de morbimortalidade nas tripanossomíases bovinas (ANDRIANARIVO et al., 1995). A terceira fase, fase crônica, apresenta aumento nos parâmetros eritrocitários dos animais num período de seis a oito semanas juntamente com a recorrência da parasitemia em baixas concentrações, estendendo-se por vários meses e anos (TAYLOR; AUTHIÉ, 2004). Nestes casos de reincidências de baixa parasitemia, os tripanosomas podem ser encontrados extravascularmente em linfonodos, em plexo coróide e humor aquoso, no líquido cerebrospinal. Em caso de imunossupressão animal, o parasito pode ressurgir e promover a disseminação da doença (HOARE, 1972; BODA et al., 2009).

Como forma de justificativa para os quadros de anemia, ora tem-se os processos hemolíticos intra e extravasculares provocados por ação direta do parasito que desencadeiam processos imunomediados a partir da deposição de imunocomplexos na superfície das hemácias levando a destruição pelo sistema fagocíticomononuclear (OKECH; STEVENSON; ALUSHULA, 1996; TAYLOR, 1998). Ora justifica-se pela produção de anticorpos, que podem acarretar em inflamações teciduais, diminuição ou inibição da eritropoiese e hemorragias (ALMEIDA et al., 2008; BATISTA et al., 2008; CHAMOND et al., 2010). Por fim, outro mecanismo descrito seria a ação de fosfolipases liberadas pelos parasitos mortos, gerando lipídeos que alterariam as hemácias (ILRAD, 1983).

Neste contexto, no exame do microhematócrito e contagem em câmara de Neubauer, percebe-se uma acentuada queda nos valores de eritrócitos. Ao exame de esfregaços sanguíneos as principais alterações eritrocitárias identificadas são anisocitose e policromasia com classificação variando de anemia normocítica normocrômica a macrocítica normocrômica (SILVA et al., 1998). Outro achado frequente é a leucopenia associada à linfopenia e neutropenia em resposta ao aumento dos antígenos do parasita na circulação (ALMEIDA et al., 2010). Sabe-se que a trombocitopenia também é desencadeada por processos imunomediados a partir da fagocitose generalizada de plaquetas pelos macrófagos durante o pico de parasitemia (CHAMOND et al., 2010).

Em relação às alterações bioquímicas, os baixos valores séricos de colesterol, triglicérides e glicose são encontrados em animais com alta parasitemia, sendo atribuído pelo gasto energético e hipertemia apresentados pelo animal durante esta fase. A hipocolesterolemia também foi observada por outros pesquisadores (ESPINOZA et al., 2000; SCHENK et al., 2001; FRANGE, 2013). Com relação à glicose, a diminuição ocorre devido à sua utilização pelo parasita como fonte de energia, resultando assim, em uma hipoglicemia (BARRETT et al., 1998; KADIMA et al., 2000).

Manifestações neurológicas também podem ser observadas, caracterizados por ataxia, tremores musculares, cegueira transitória e/ou permanente (BATISTA et al., 2008). Estas lesões podem estar associadas com a presença do parasito em tecidos nervosos e fluido cerebrospinal que podem desencadear lesões inflamatórias e degenerativas locais, reações autoimunes e êmbolos formados pelo parasito em vênulas e capilares no cérebro (BATISTA et al., 2007).



Desordens reprodutivas em machos também foram relatadas onde as principais alterações incluem perda da libido, retardamento da puberdade, má qualidade do sêmen, e nas fêmeas pode ocorrer anestro, distocias, morte fetal e neonatal, aborto e outros efeitos patogênicos no feto e no recém-nascido (SEKONI et al., 1990). Alterações nas concentrações plasmáticas de hormônios para o processo reprodutivo tanto em machos quanto em fêmeas, também foram relatados (BAWA et al., 2000).

Na forma crônica frequentemente não são observados sinais clínicos, dificultando o diagnóstico e levando os animais ao estado de portador, atuando como reservatório da infecção (BATISTA et al., 2007; LINHARES et al., 2006; BATISTA et al., 2008). No Brasil estudos conduzidos com animais naturalmente infectados têm demonstrado que *T.vivax*, na maioria das vezes, causa infecção crônica e assintomática em bovinos, dificultando assim, o seu diagnóstico na maior parte dos rebanhos (BATISTA et al., 2007).

Esta cronicidade pode ser explicada pela capacidade que o parasita tem de criar mecanismos para evadir da resposta imune do hospedeiro a partir de mudanças de seus padrões antigênicos externos, conhecidos como glicoproteínas variáveis de superfície (VSG). Com isso o parasita tem a capacidade de alterar a expressão de suas glicoproteínas de superfície para outra, resultando em mutação antigênica, o que faz com que a resposta de anticorpos do hospedeiro contra os tripanosomas seja evitada ou nula em alguns casos. Em seguida VSG são novamente reconhecidas pela resposta imune, e tal mecanismo de escape acaba por provocar oscilações de alta e baixa parasitemia, sendo considerado assim o principal mecanismo que impede a eliminação do parasito, provocando assim a infecção crônica (BARAL, 2010). Além disso, estes parasitos também são capazes de internalizar os anticorpos que se ligam à sua superfície, permitindo uma evasão eficiente do sistema imune (HILL et al., 2005).

Os animais assintomáticos também podem apresentar tripanotolerância, uma característica de origem genética e ambiental, em que há um equilíbrio do hospedeiro com o parasito permanecendo clinicamente normal, por um longo período, podendo variar ainda de acordo com a idade, estado nutricional e cepas envolvidas (VAN DEN BOSSCHE; ROWLANDS, 2001). Outro fator a ser considerado são que estes animais possuem hemácias mais resistentes à modificação ou remoção, além de possuírem uma eritropoiese mais eficiente, o que compensa a destruição de eritrócitos e manutenção do estado tripanotolerante (NAESSENS; TEALE; SILEGHEM, 2002).

## 2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO

### 2.4.1 Resposta inata

Após a inoculação das formas tripomastigota no hospedeiro, seja mecânica ou iatrogênica, a primeira linha de defesa do organismo é dada pelo sistema Imune Inato (BARAL, 2010). Este sistema envolve a ação conjunta de substâncias solúveis como citocinas tipo 1, sistema complemento e células como neutrófilos e macrófagos, dentre outras, para eliminação e destruição do antígeno (FLYN et al., 1994).

Os macrófagos atuam promovendo a fagocitose do *T.vivax* com anticorpos e secretam moléculas tripanotóxicas envolvidas no controle do primeiro pico de parasitemia (HARRIS et al., 2006). Segundo Bassi (2014) o aumento significativo de macrófagos ativados ocorre entre 18º ao 21º dia de parasitemia em bovinos infectados experimentalmente por *T.vivax*.

Os neutrófilos, por sua vez, atuam diretamente nas inflamações teciduais. Segundo estudo realizado por Sandoval; Espinoza; Valle (1996) foi observado que na fase aguda e no pico de parasitemia de grandes e pequenos ruminantes infectados experimentalmente com *T.vivax*, ocorreu neutropenia em resposta á transmigração do parasita para os tecidos lesionados.

Apesar deste sistema de defesa ser crucial por iniciar uma resposta inflamatória aguda contra os antígenos do tripanosoma, se por algum motivo falhar, o animal torna-se susceptível à infecção. Uma vez infectado, as formas tripomastigotas se movem a partir do local de inoculação, para todas as partes do organismo pelo sistema sanguíneo e linfático (OSÓRIO et al., 2008), ocorrendo uma complexa interação parasito- hospedeiro, resultando na atuação dos mecanismos de resposta imune adaptativa e humoral (BLACK et al., 2001; BODA et al., 2009).

### 2.4.2 Resposta imune adquirida

#### 2.4.2.1 Resposta humoral

A resposta imune humoral compreende o processo de defesa do organismo realizada pelos anticorpos (imunoglobulinas). São produzidos pelos plasmócitos e encontrados no plasma sanguíneo e desempenham uma função primordial, identificar

e neutralizar antígenos. A reação antígeno- anticorpo é completamente exclusiva, ou seja, cada tipo de anticorpo é capaz de identificar apenas um tipo de antígeno, sendo assim, considerado o mais importante mecanismo de defesa contra microorganismo extracelulares (AMABIS; MARTHO, 2004). Neste contexto, devido à localização extracelular do tripanosoma, a resposta imune predominante é a humoral.

De acordo com Naessens; Teale; Sileghem (2002) durante à infecção por *T.congolense*, foi observado uma ativação policlonal de Linfócitos B que elevam a secreção de imunoglobulinas, principalmente IgM na fase aguda e IgG na fase crônica da doença. Em estudo realizado por Bassi (2014) em bovinos experimentalmente infectados por *T.vivax*, foi possível verificar aumentos consideráveis de IgM no período pré-patente, diminuição de IgM e aumento de IgG na fase aguda da doença, seguido da permanência dos níveis de IgG na fase crônica.

#### **2.4.2.2 Resposta mediada por células**

Esta resposta envolve a atuação de células denominada Linfócito T (auxiliares) e Linfócito T (citotóxicos) que são ativados a partir do momento em que encontram as células apresentadoras de antígeno, contendo antígenos específicos. Com esta ativação, os linfócitos ficam maiores e começam a multiplicar, produzindo milhões de clones capazes de ajudar na remoção do antígeno, chamados agora de célula T efetoras e células de memória. Os linfócitos T (auxiliares) ao serem ativados, produzem e liberam interleucinas, que potencializam a ação de linfócitos B (humoral/anticorpos), macrófagos, linfócitos T (citotóxicos) e neutrófilos, combatendo de maneira eficaz os antígenos (TIZARD, 2012).

No entanto, com relação aos tripanosomas, acredita-se que os linfócitos T não exercem função importante no controle da parasitemia, entretanto, a participação dos linfócitos T gama-delta ( $T-\gamma\delta$ ), que possuem funções semelhantes aos Linfócitos T auxiliares e citotóxicos (TIZARD, 2012) foram cruciais no controle da parasitemia contra *T.brucei* em humanos, por secretarem ( $IFN-\gamma$ ), importante citocina que melhora a função das células citotóxicas (BODA et al., 2009). Já em estudo realizado por Bassi (2014) em bovinos experimentalmente infectados com *T.vivax* notou-se que a fase inicial da infecção por *T.vivax* está associada ao aumento de LT CD4+, LT CD8+, LT- $\delta$  (WC1+).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

Segundo Silva et al. (2002) os principais métodos diagnósticos para detecção do *T.vivax* podem ser divididos em três: parasitológico, sorológico e moleculares. Dentre os métodos parasitológicos podemos citar a técnica do microhematócrito (MHCT) (WOO, 1970) e BCT (MURRAY, 1977) para confirmação da presença das formas tripomastigotas de *T.vivax* em esfregaços sanguíneos. Com relação aos sorológicos temos ELISA e RIFI para observação da presença de títulos de anticorpos anti-*T.vivax* (MADRUGA et al., 2006; AQUINO et al., 2010), e por fim molecular temos a PCR para a detecção do genoma do hemoparasito (VENTURA et al., 2001, DESQUESNES; DÁVILA, 2002).

### 2.5.1 Testes Parasitológicos- WOO e *Buffy coat*

Entre os testes parasitológicos, ou diretos, MHCT, proposto por Woo (1970) é um teste de fácil execução, consistindo em observar em microscópio óptico, ao aumento de dez vezes a motilidade das formas tripomastigotas entre a camada de leucócitos e a de plasma, dentro do próprio microtubo hematócrito. Esta técnica permite a detecção de tripanosomas de seis a dez dias pós-infecção.

Outra técnica parasitológica extremamente utilizada é o BCT, que consiste em colocar a camada leucocitária do microtubo hematócrito em esfregaço sanguíneo, corar com corantes hematológicos e realizar leituras em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x) em busca da presença das formas tripomastigotas do *T.vivax* (MURRAY, 1977). Portanto ambas as técnicas são úteis nos estágios iniciais da doença, principalmente nos picos febris, pois correspondem ao pico de parasitemia (RADOSTITS et al., 2002).

A especificidade deste teste é de 100,00%, porém a sensibilidade é baixa porque não é possível detectar parasitemia abaixo de 200 a 1000 tripomastigotas/ml no sangue (MURRAY et al., 1977; DESQUESNES; TRESSE, 1996). Sendo assim, o encontro de parasitos em esfregaços sanguíneos em fases crônicas da doença se torna difícil, uma vez que as formas amastigotas não ficam na circulação (MURRAY, 1977; VENTURA et al., 2001).

Por estes motivos esta técnica não é recomendada durante a fase crônica da doença (DESQUESNES; TRESSE, 1996). Outro fator que limita o uso desta técnica é

que as amostras deverão ser analisadas rapidamente, até 8 horas após a colheita, pois após esse tempo a quantidade de tripomastigotas detectáveis também se reduz (GÓMEZ-PIÑERES; TAVARES-MARQUES; REYNA-BELLO, 2009).

Por isso, a triagem sorológica e a titulação de anticorpos podem ser úteis, fornecendo informações importantes e complementares às obtidas pelos métodos parasitológicos, além de avaliar com mais sensibilidade o estado dos rebanhos infectados por *T.vivax* (MATTIOLI; FAYE; JAITNER, 2001).

### 2.5.2 Testes Sorológicos

As técnicas sorológicas mais utilizadas para a detecção de anticorpos anti-*T.vivax*, atualmente são a RIFI e o ELISA. Ambos os testes podem ser utilizados para o diagnóstico de infecção e são úteis para investigações epidemiológicas, especialmente para a determinação da distribuição de *T.vivax* (MADRUGA et al., 2006).

Os testes sorológicos RIFI para anticorpos circulantes vêm sendo utilizados, mostrando boa sensibilidade (AQUINO et al., 2010). Embora a presença de anticorpos não signifique necessariamente uma infecção ativa, uma vez que essas moléculas persistem após a recuperação, as correlações positivas entre os resultados parasitológicos por BCT e a presença sorológica de anticorpos anti-*T.vivax*, têm sido relatados até os 90 dias pós-infecção (MATTIOLI; FAYE; JAITNER, 2001; DELAFOSSE et al., 2006; BASSI, 2014).

Porém, um dos obstáculos da RIFI se refere aos antígenos utilizados, visto que são em sua maior parte antígenos brutos obtidos a partir de sangue de ovinos experimentalmente infectados, o que promove baixa especificidade do teste (EISLER, et al., 1998; REBESKI et al., 1999; SILVA et al., 2002, MAGONA et al., 2008, PILLAY et al., 2013). Portanto, pode-se observar que o desenvolvimento de testes diagnósticos mais específicos se faz necessário, sendo imprescindível a busca de outras opções diagnósticas como os testes moleculares.

### 2.5.3 Testes Moleculares

Os métodos sorológicos são úteis em estudos epidemiológicos, porém, estes usualmente não distinguem o curso da infecção, devido à avidéz de IgG em infecções recentes ou progressos nas tripanosomíases, e a sua detecção pela PCR, abre novas perspectivas neste campo (VENTURA et al., 2001). A PCR teve uma considerável contribuição na identificação, caracterização e diagnóstico molecular de tripanosomas em diversos níveis taxonômicos com precisão e confiabilidade (DESQUESNES; DÁVILA, 2002). Para a identificação do *T.vivax*, são utilizados *primers* direcionados no gene do *mini-exon* (*spliced leader*) e na região intergênica, com amplificação do produto de 210pb (VENTURA et al., 2001).

Embora tenham excelentes resultados, os testes por PCR não são satisfatórios quando há baixa ou nenhuma parasitemia, além do uso em larga escala ser difícil a campo, uma vez exige alto custo em laboratórios equipados, pessoal treinado e reagentes adequados (DÁVILA et al., 2003; OSÓRIO et al., 2008).

Neste contexto, a confirmação de um caso de tripanossomíase bovina requer a realização destes diagnósticos laboratoriais, sendo que a escolha do tipo de exame a ser realizado dependerá da fase clínica da doença (MENESES, 2016).

## 2.6 TRATAMENTO

A Quimioterapia e quimioprofilaxia atualmente representam o pilar para o controle da tripanossomíase bovina causada pelo *T.vivax*. (GIORDANI et al., 2016). Apenas seis compostos estão atualmente licenciados (Quadro 1), sendo o dimenazeno, homídio e isometamídio primariamente usados para o tratamento e profilaxia da tripanossomíase em bovinos, ovinos e caprinos. Já a quinapiramina, suramin e melarsomina são primariamente usados como agentes terapêuticos para infecções com *Trypanosoma evansi*. Os de uso mais comum são o aceturato de diminazeno e cloreto de isometamídio, amplamente aplicado contra tripanosomíases de animais oriundos do continente Africano e Brasil (HOLMES; EISLER; GEERTS, 2004).

Quadro 1- Principais drogas tripanocidas de uso veterinário.

Nome	Ação	Dosagem (mg/kg)	Indicação/Animal	Efeitos adversos	Tratamento de recaídas
Aceturato de Diminazeno	T	3 · 5 (até 8 em casos de resistência), IM ou SC.	<i>T. congolense</i> e <i>T. vivax</i> (menos ativo em bovinos, caprinos e cães	Tóxico para cavalos, burros, cães e camelos. Também babesicida.	Cloreto de isometamídio
Brometo de homídio	T	3 · 5 (até 8 em casos de resistência), IM (Bovino) ou IV (Suíno, ovino e caprino)	<i>T. vivax</i> , <i>T. congolense</i> (menos ativo em <i>T. b. Brucei</i> ) / Bovinos, ovinos, caprinos, suínos	IM tóxico para cavalos. Potencialment e cancerígeno.	Aceturato de diminazeno e Cloreto de Isometamídio
Cloreto de isometamídio	P e T	0, 25-1 (T), 0, 5-1 (P). IM profundo (Bovinos)	<i>T. congolense</i> , <i>T. vivax</i> (menos ativo em <i>T. Brucei</i> , <i>T. Evansi</i> ) / Bovinos, ovelhas, cabras, cavalos e camelos	Tóxico acima de 2 mg/Kg.. Evitar a administração subcutânea. Altamente irritante.	Aceturato de diminazeno
Sulfato de quinaprilamina	P e T	3-5 (T) (20-40 por <i>T. simiae</i> ) (camelos, cavalo, porcos, cães: dose dividida e administrada em intervalos de 6 h), 7 · 4 (P).	<i>T. Evansi</i> , <i>T. vivax</i> , <i>T. congolense</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. Equiperdum</i> , <i>T. simiae</i> / Camelos, cavalos, porcos, cães, gado	Tóxico em altas doses. Rápida aquisição de resistência.	Cloreto de Isometamídio
Suramina sódica	T	10 (cavalos: 3 doses / 1 semana)/ IV	<i>T. b. Evansi</i> , <i>T. b. Brucei</i> , <i>T. b. Equiperdum</i> / Camelos e cavalos	IM pode causar necrose grave no local da injeção. Pode ser tóxico para os cavalos	Sulfato de quinapiramina
Dicloridrato de melarsomina	T	0 · 25-0 · 5 (0,5 para bovinos)/ SC ou IM	<i>T. b. Evansi</i> , <i>T. b. Brucei</i> , <i>T. b. Equiperdum</i> / Camelos, búfalos, cabras, porcos, cavalos, gado	-	-

IM, intramuscular; IV, intravenosa; SC, subcutâneo; T, ação terapêutica; P, ação profilática. *Nota.* Os produtos utilizados nos animais que produzem carne ou leite para consumo humano só devem ser utilizados em conformidade com os rótulos dos produtos, incluindo os períodos de espera.

Fonte: GIORDANI et al., 2016.

O acetato de diminazeno é uma diamidina aromática, comercializada em combinação com antipirina, que possui ação tripanocida, porém, tem demonstrado uma atuação inadequada e até ultrapassada para o controle da doença, devido o aparecimento de parasitas resistentes (SILVA et al., 2004). Alguns estudos tem relatado a ocorrência desta resistência como em bovinos presentes na Guiana Francesa (DESQUESNES; TRESS, 1996) e em vacas que apresentavam sinais neurológicos decorrentes da infecção por *T.vivax*. (BATISTA et al. 2007). Um ano depois, os autores também observaram resistência com recidiva clínica em bovinos, após a aplicação da medicação (BATISTA et al., 2008).

Já Cadioli et al. (2012) relataram que oito vacas com sintomas clínicos compatíveis com tripanosomíase por *T.vivax*, foram tratadas com a medicação, com aparente cura clínica, mas apresentaram recidiva da doença após dois meses, com novos picos de parasitemia e tornaram-se clinicamente doentes. E mesmo após a repetição do tratamento os autores verificaram que o fármaco não teve mais efeito sobre o *T.vivax* e três animais vieram a óbito. E por fim, em 2014, em estudo utilizando bovinos infectados experimentalmente em Minas Gerais, que foram tratados com a medicação, apresentaram a recorrência de tripomastigotas após dois dias de tratamento, o que demonstra ainda mais a resistência do parasita a droga (BASSI, 2014).

Neste contexto, atualmente a droga de escolha, é o cloreto de isometamídio por possuir atividade terapêutica e preventiva. A partir de ensaios sobre estas atividades em infecções experimentais por *T.vivax* e *T.evansi*, verificou-se que o fármaco é altamente eficaz contra a infecção por *T.vivax* em ovinos e bovinos nos quais foram alcançados períodos de proteção que variam de 118 a 195 dias, porém não foram observados efeitos completos contra a infecção por *T.evansi*. Notou-se também que o fármaco foi bem tolerado em ovinos e bovinos, enquanto que os efeitos secundários foram observados em éguas tratadas. Neste contexto o fármaco passou a ser utilizado para prevenir danos e perdas econômicas causadas pelo *T.vivax* na Venezuela e em todo o Brasil (GIORDANI et al., 2016).

A atividade profilática do fármaco ocorre devido ao seu acúmulo no fígado, nos rins e no baço, bem como no local da injeção, sendo liberada lentamente ao plasma (KINABO; BOGAN, 1988). Portanto, a persistência de resíduos de isometamídio é muito mais longa do que para o diminazeno. Por esta razão, foi estabelecido um período de espera de 30 dias para o consumo de produtos de bovinos



tratados com a droga, embora na prática o período de carência seja sempre específico do produto. A excreção ocorre principalmente via bile e os níveis no leite de gado são geralmente muito baixos (KINABO, 1993). A duração da atividade profilática após a administração intramuscular em bovinos é tipicamente de dois a três meses e pode ser até seis meses, mas pode variar muito, dependendo da formulação e dosagem utilizada e da estirpe do parasita, bem como em outros fatores, incluindo susceptibilidade da raça em particular e seu estado geral de saúde (TORO et al., 2006, KINABO; BOGAN, 1988). Terapêuticamente, o fármaco possui efeito tripanocida, diminui a gravidade da doença, aumentando significativamente o hematócrito dos animais (CADIOLI et al., 2012). O isometamídio também pode ser utilizado em associação com diminazeno, sendo os dois fármacos utilizados sequencialmente para minimizar o risco de desenvolvimento de resistência (PEREGRINE, 1994). No entanto, um número crescente de relatos de resistência a estes produtos indicam que sua utilidade futura possa se tornar limitada (GEERTS et al., 1998; DELESPAUX; DE KONING, 2007). Dentre eles, há vários relatos de isolados de campo, de muitos países africanos, particularmente contra o *T.congolense*, *T.brucei* e *T.vivax*, detalhando às vezes a resistência cruzada com diminazeno (AFEWERK et al., 2000, SINYANGWE et al., 2004, MAMOUDOU et al., 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo sorológico, parasitológico e molecular de amostras de sangue de bovinos encaminhadas ao Hospital Veterinário de Uberaba com suspeita clínica de Tripanossomíase por *T.vivax*, bem como correlacionar os títulos sorológicos dos animais à presença do agente por PCR.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil parasitológico de bovinos com suspeita clínica de tripanossomíase por *T.vivax*;
- Determinar o perfil sorológico de bovinos com suspeita clínica de Tripanossomíase por *T.vivax*;
- Correlacionar o perfil parasitológico com os dados epidemiológicos dos animais com suspeita clínica de tripanossomíase por *T.vivax*;
- Correlacionar o perfil sorológico com os dados epidemiológicos dos animais com suspeita clínica de tripanossomíase por *T.vivax*;
- Correlacionar os títulos sorológicos dos bovinos com suspeita clínica de tripanossomíase por *T.vivax* à presença do agente por PCR.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Patologia Clínica e Medicina Veterinária Preventiva situados no Hospital Veterinário de Uberaba e no Laboratório de Biologia Molecular do Colégio Técnico (COLTEC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### 4.2 PESQUISA PARASITOLÓGICA

#### 4.2.1 Amostras de sangue

Foram utilizadas as amostras encaminhadas ao Hospital Veterinário de Uberaba, compreendidas no período 2015 a 2016, para a avaliação parasitológica pela técnica do BCT. As amostras foram encaminhadas em tubo de coleta de sangue BD (Vacutainer® Brasil, Minas Gerais, Juiz de Fora) contendo ácido etilenodiaminotetracético di-sódico (EDTA) a 10,0%, refrigeradas e armazenadas dentro do período máximo de 24 horas.

#### 4.2.2 Técnica *Buffy Coat* - BCT

A pesquisa de formas tripomastigotas de *T.vivax* foi realizada pela técnica do *Buffy coat* (BCT) (MURRAY, 1977). Consistiu no preenchimento de tubo capilar de vidro para cada amostra de sangue com anticoagulante, centrifugado a 10.000 x g (Celm® MH Brasil, São Paulo, Barueri) por cinco minutos. Após, foi realizado o esfregaço a partir da amostra obtida de um capilar, quebrando o tubo na fração entre a camada líquida (plasma) e a camada leucocitária em seguida foi corado com Panótico Rápido (Laborclin® Brasil, Paraná, Pinhais) e observado em aumento 1000x por microscopia óptica (NIKON® Eclipse E200, Brasil, Santa Catarina, Florianópolis) em busca das formas tripomastigotas de *T.vivax*.

## 4.3 PESQUISA SOROLÓGICA

### 4.3.1 Amostras de soros

Foram utilizadas as amostras encaminhadas ao Hospital Veterinário de Uberaba, compreendidas no período de 2015 a 2016, para a pesquisa de anticorpos IgG anti- *T.vivax* por imunofluorescência indireta. As amostras foram encaminhadas em tubo de coleta de sangue BD (Vacutainer® Brasil, Minas Gerais, Juiz de Fora) sem anticoagulante. Após o recebimento as amostras eram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica e imediatamente processadas.

Com o auxílio da centrífuga (Fanem Baby® I206BL, Brasil, São Paulo, Guarulhos) as amostras foram centrifugadas em velocidade de 2000 x g a temperatura ambiente (TA) por 10 minutos para obtenção dos soros que foram transferidos e acondicionados em tubos de polipropileno de 2,5 ml (Eppendorf® Brasil, São Paulo, Paulínia) devidamente identificados e mantidos a temperatura de -20° C até a realização da RIFI.

### 4.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta- RIFI

Foi realizado o teste de RIFI para detectar anticorpos IgG anti- *T.vivax* conforme metodologia descrita por Frange (2013). Amostras de soro bovino foram diluídas (1: 80 até 1: 1280) e distribuídas em 20 µL nas limitações da lâmina contendo o antígeno de *T.vivax* e incubadas a 37°C durante 30 minutos. Em seguida foram feitas três lavagens da lâmina com PBS por cinco minutos cada e após secagem a temperatura ambiente foi adicionada para cada amostra 20 µL de conjugado anti- IgG (Sigma F7887®) marcado com Isotiocianato de Fluoresceína na diluição 1:200 em PBS e Azul de Evans (1:10) e incubados novamente por 30 minutos a 37° C em câmara escura. Em seguida foi feito o mesmo procedimento de lavagem citado anteriormente.

Soros de bovinos infectados com *T.vivax* foram utilizados como controles positivos e soro de bovinos negativos na diluição 1:80 e solução de PBS 1:10 como controle negativo (Branco). Posteriormente para a leitura das lâminas, foram acrescentados 10 µL de glicerina tamponada (Glicerina 90%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 mM,

NaHCO<sub>3</sub> 0,5 mM pH 8,0-8,5) para cada amostra e coberta por uma lamínula. As lâminas foram lidas em microscópio epi- fluorescente (Nikon® E 200) com aumento de 400x (CUCLOVICI et al., 2010) e classificados como positivos quando detectada a fluorescência a partir da diluição 1:80.

#### 4.4 REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE- PCR

##### 4.4.1 Amostras biológicas

Amostras de sangue colhidas em tubos com anticoagulante submetidas a pesquisa parasitológica e sorológica no HVU foram colhidas aleatoriamente para a pesquisa molecular.

Como controle negativo utilizou-se as amostras de sangue total de animais negativos nos dois testes laboratoriais (n=20) e como controle positivo utilizou-se 24 amostras positivas no BCT independente da sorologia apresentada. Para a pesquisa de *T.vivax* nos diferentes títulos sorológicos utilizou-se 113 amostras de sangue BCT negativas e RIFI positivas. A distribuição do número de amostras nos diferentes títulos está apresentada na Tabela 1:

**Tabela 1** – Quantidade de amostras utilizadas para determinação do PCR de acordo com os resultados parasitológico e sorológico.

<i>Buffy coat</i>	Títulos sorológicos	Número de amostras
Negativo	1:80	26
Negativo	1:160	26
Negativo	1:320	29
Negativo	1:640	16
Negativo	1:1280	16
<b>TOTAL</b>		<b>113</b>

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

As amostras foram armazenadas a – 20° C e encaminhadas em caixa de isopor com gelo reciclável ao laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais para serem processadas.

#### 4.4.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada em amostras de sangue colhidas em EDTA, utilizando o kit comercial QIAamp Mini Kit® (Ref. 51306), do fabricante Qiagen® (Brasil, São Paulo, Guarani). O material genético foi obtido das amostras após a realização da extração do DNA seguindo o protocolo do fabricante: 200 µL de cada amostra foram transferidos para eppendorf's estéreis de 1,5 mL contendo 20 µL de proteinase K. Posteriormente foram acrescentados 200 µL de Buffer na amostra. A mistura foi homogeneizada através de um *vórtex* por 15 segundos e incubada em estufa a 56°C por 10 minutos. Após essa etapa, foram adicionado 200 µL de etanol absoluto na amostra com homogeneização por 15 segundos. A mistura obtida foi transferida para um tubo eppendorf de coluna (*QIAamp Mini spin column*® Brasil, São Paulo, Guarani) e centrifugada a 8.000 x g por um minuto.

Após a centrifugação observou-se um filtrado logo abaixo do eppendorf de coluna. O mesmo foi descartado, pois o material genético ficou na membrana do tubo de coluna. Foram adicionados no tubo de coluna 500µL do reagente *Buffer* AW1 seguido de centrifugação a 8.000 x g por um minuto e posteriormente 500µL do reagente *Buffer* AW2 seguido de centrifugação a 14.000 x g por três minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Para a suspensão do DNA foram adicionados 200µL do reagente *Buffer* AE. Após incubação em temperatura ambiente (25°C) por um minuto e centrifugação final a 6.000 x g por um minuto obteve-se um filtrado incolor contendo o DNA em suspensão. Após a obtenção do filtrado final, o DNA total (µg/mL) foi quantificado em aparelho de espectrofotômetro.

#### 4.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

A PCR para *T.vivax* foi realizada pelo protocolo descrito por Ventura et al. (2001). Os *primers* adicionados reconhecem uma região específica do material genético do parasita, onde ao final do experimento, observou-se a amplificação de um fragmento contendo aproximadamente 210pb da região genômica TviSL (*T.vivax Spliced leader*) do parasito. Para a amplificação específica do gene TviSL, os iniciadores TviSL1 (forward:5'GCTCTCCAATCTTAACCCTA3') e TviSL2 (reverse: 5'GTTCCAGGCGTGCAAACGTC3') foram adicionados a mistura. As

amplificações foram realizadas em uma mistura de 50µL contendo 200µM de dNTP, 20µM de iniciadores TvSL1 e TvSL2, DNA da amostra (quantidade variável), tampão para PCR contendo 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> e 2.5U de Taq DNA polimerase.

Adicionado os reagentes, as amostras foram transferidas para um termociclador, onde o tempo foi ajustado em 35 ciclos a 94°C por um minuto para desnaturação, 52°C por dois minutos para anelamento e 72°C por três minutos, seguido de 72°C por dez minutos para extensão final. Após a amplificação, os produtos foram adicionados em placas de vidro para eletroforese contendo o padrão de peso molecular, amostras do controle positivo e negativo (água destilada), em gel de agarose a 2,00% e brometo de etídeo. A leitura foi realizada em transiluminador UV, e as amplificações das amostras foram comparadas com o padrão de peso molecular, controle positivo e negativo versão 5.0 (Prism Software<sup>®</sup>, Irvine, EUA).

#### 4.5 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados epidemiológicos (raça, idade, sexo, localidade e sazonalidade) foram obtidos a partir dos dados cadastrais, disponíveis no acervo digital do sistema específico do HVU.

Para melhor organização e interpretação dos dados epidemiológicos as idades foram tabuladas em meses da seguinte forma: 0-12; 13-24; 25- 36; acima de 36 e não especificado. Já para a localidade foi realizada uma estratificação em sete circuitos: Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba, Sul e Sudoeste de Minas, Oeste de Minas, Estado de São Paulo e Não Especificado.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados na comparação entre os percentuais de positividade, considerando-se os dados referentes ao ano, mês, sexo, faixa etária, raça e município, foi realizada por meio do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Para as variáveis com múltiplas categorias, as diferenças significativas entre as frequências observadas e esperadas foram obtidas por meio da análise de resíduos. Os parâmetros não especificados ou desconhecimentos foram omitidos dessa análise comparativa,

assim como as categorias que apresentaram baixas frequências esperadas, devido à limitação do teste qui-quadrado.

Os títulos sorológicos (1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280) foram transformados em uma variável categórica ordinal para permitir a realização de testes de comparação não-paramétricos, como os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

Quanto aos testes diagnósticos, a concordância entre os três testes foi avaliada por meio do coeficiente de concordância Kappa. Procurou-se também avaliar a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e acurácia do teste sorológico, BCT e PCR considerando-se como padrão-ouro de positividade as amostras reagentes no BCT ou na PCR. A partir dessa análise comparou-se a acurácia entre os testes diagnósticos por meio do qui-quadrado, seguido de um teste de múltiplas comparações, segundo procedimento de Marascuilo.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos softwares *Statistica* 10.0 (Statsoft, Tulsa, OK, 2011) e Microsoft Excel 2010. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram  $p\text{-valor} < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS

No período de 2015 a 2016, 7464 amostras foram encaminhadas para o Hospital Veterinário de Uberaba para pesquisa parasitológica (990/7464 amostras – 13,26%) e sorológica (6474/7464 amostras – 86,73%). A caracterização das amostras submetidas a pesquisa parasitológica e sorológica em relação a idade, sexo, raça e localidade está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2** – Número de amostras submetidas à pesquisa parasitológica e sorológica em relação a idade, sexo, raça e localidade nos anos de 2015 e 2016.

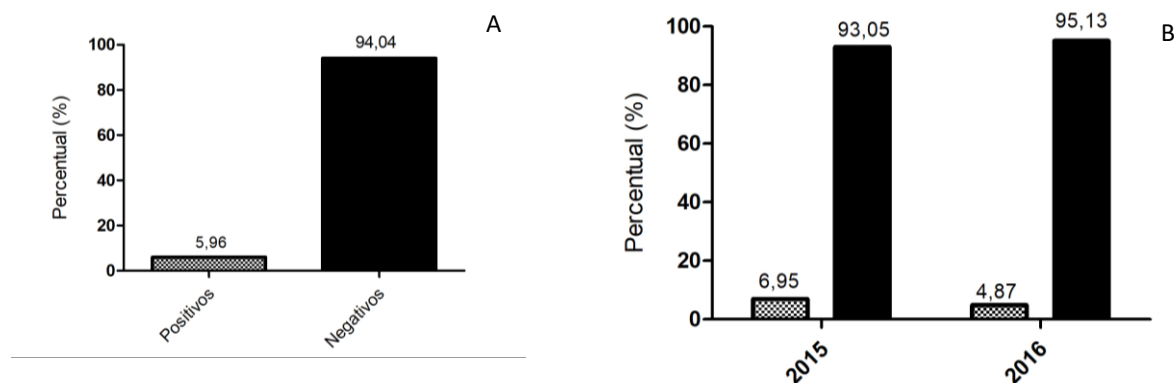
Caracterização amostral	2015		2016	
	Parasitológico	Sorológico	Parasitológico	Sorológico
<b>Idade (meses)</b>				
0-12	0	10	3	67
13-24	0	55	7	19
25-36	3	14	3	35
>36	95	100	63	410
Não especificado	420	2381	396	3383
<b>TOTAL</b>	<b>518</b>	<b>2560</b>	<b>472</b>	<b>3914</b>
<b>Sexo</b>				
Macho	6	87	9	197
Fêmea	153	2408	108	788
Não especificado	359	65	355	2929
<b>TOTAL</b>	<b>518</b>	<b>2560</b>	<b>472</b>	<b>3914</b>
<b>Raça</b>				
Aberdeen Angus:	0	0	1	0
Anelorado	0	0	0	2
Braford	0	0	0	3
Sindi:	0	0	1	0
Cruzamento Ind:	1	40	7	50
Gir:	9	6	3	46
Girolando:	467	1846	419	3106
Guzerá:	1	1	6	1
Holandesa:	2	299	3	125
Jersey:	0	1	0	7
Mestiça:	6	8	4	18
Nelore:	1	18	15	46
SRD:	31	341	13	510
<b>TOTAL</b>	<b>518</b>	<b>2560</b>	<b>472</b>	<b>3914</b>
<b>Localidade</b>				
Triângulo Mineiro	43	609	133	842
Alto Paranaíba	48	49	0	143
Sul e Sudoeste de	9	32	0	177
São Paulo	0	0	0	10

Continua...				
Continuação...				
Oeste de Minas	0	0	0	4
Caracterização amostral	2015		2016	
	Parasitológico	Sorológico	Parasitológico	Sorológico
Localidade				
Não especificado	418	1870	339	2738
<b>TOTAL</b>	<b>518</b>	<b>2560</b>	<b>472</b>	<b>3914</b>

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

## 5.1 PARASITOLÓGICO

No período de 2015 a 2016 das 990 amostras encaminhadas para o HVU para pesquisa parasitológica, 5,96% (59/990) apresentaram tripomastigota de *T.vivax* (Figura 2A). Analisando o percentual de positividade por ano, não se observou diferença entre 2015 (6,95%- 36/518 ) e 2016 (4,87%- 23/472) (Figura 2B).



**Figura 2** – Prevalência de tripomastigotas de *T.vivax*, no teste parasitológico, de amostras encaminhadas ao HVU (A) durante os anos de 2015 e 2016 (B).

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Em relação ao sexo, idade e raça não foi observado diferença significativa entre os parâmetros analisados (Tabela 3).

**Tabela 3** – Número de amostras submetidas a pesquisa parasitológica em relação ao sexo, a idade e raça nos anos de 2015 a 2016.

<b>Caracterização amostral</b>	<b>Nº Positivos/Nº total</b>	<b>Prevalência</b>
<b>Sexo</b>		
Fêmea	43/261	16,48% <sup>a</sup>
Macho	0/15	0,00% <sup>a</sup>
<i>Indefinido</i>	<i>16/714</i>	<i>2,24%</i>
<b>Faixa etária</b>		
0-12 meses	0/3	0,00% <sup>a</sup>
13-24 meses	0/7	0,00% <sup>a</sup>
25-36 meses	0/6	0,00% <sup>a</sup>
> 36 meses	22/158	13,92% <sup>a</sup>
<i>Não especificada</i>	<i>37/816</i>	<i>4,53%</i>
<b>Raça</b>		
Girolando	55/886	6,20% <sup>a</sup>
SRD	4/44	9,09% <sup>a</sup>
Nelore	0/16	0,00% <sup>a</sup>
Gir	0/12	0,00% <sup>a</sup>
Mestiça	0/10	0,00% <sup>a</sup>
Cruzamento Ind.	0/8	0,00% <sup>a</sup>
Guzerá	0/7	0,00% <sup>a</sup>
Holandesa	0/5	0,00% <sup>a</sup>
Aberdeen Angus	0/1	0,00% <sup>a</sup>
Sindi	0/1	0,00% <sup>a</sup>

\* Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os parâmetros analisados.

Os parâmetros não especificados ou desconhecimentos foram omitidos da análise comparativa, assim como as categorias que apresentaram baixas frequências esperadas, indicadas em itálico.

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Dentre os municípios que enviaram amostras de sangue dos bovinos para o HVU, Araxá apresentou prevalência de *T. vivax* estatisticamente superior (43,75%) em relação aos demais municípios. Das amostras positivas 3,43%, não possuíam a especificação da localidade. A positividade por município e durante os anos (2015 a 2016) está apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4** – Prevalência de amostras positivas para *Trypanosoma vivax* na pesquisa parasitológica de acordo com o Município durante os anos de 2015 a 2016.

<b>Localidade</b>	<b>Positivos</b>	<b>Prevalência</b>
<b>Alto Paranaíba</b>		
Araxá	21/48	43,75% <sup>a</sup>
<b>Triângulo Mineiro</b>		
Frutal	1/7	14,28% <sup>b</sup>
Uberaba	10/112	8,92% <sup>b</sup>
Veríssimo	1/38	2,63% <sup>b</sup>
<i>Ituiutaba</i>	<i>0/8</i>	<i>0,00%</i> <sup>b</sup>
<i>Água Comprida</i>	<i>0/2</i>	<i>0,00%</i> <sup>b</sup>
<i>Campina Verde</i>	<i>0/9</i>	<i>0,00%</i> <sup>b</sup>
<b>Sul e Sudoeste de Minas</b>		
<i>Passos</i>	<i>0/9</i>	<i>0,00%</i> <sup>b</sup>
<b>Não identificado</b>	<b>26/757</b>	<b>3,43%</b>

\* Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os parâmetros analisados.

Os parâmetros não especificados ou desconhecimentos foram omitidos da análise comparativa, assim como as categorias que apresentaram baixas frequências esperadas, indicadas em itálico.

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

A frequência de amostras positivas no exame parasitológico foi estatisticamente superior nos meses de julho (19,14% - 18/94) e dezembro (28,76% - 21/73) (Tabela 5).

**Tabela 5** – Prevalência de tripomastigota de *T.vivax* em amostras encaminhadas ao HVU durante os meses dos anos de 2015 a 2016.

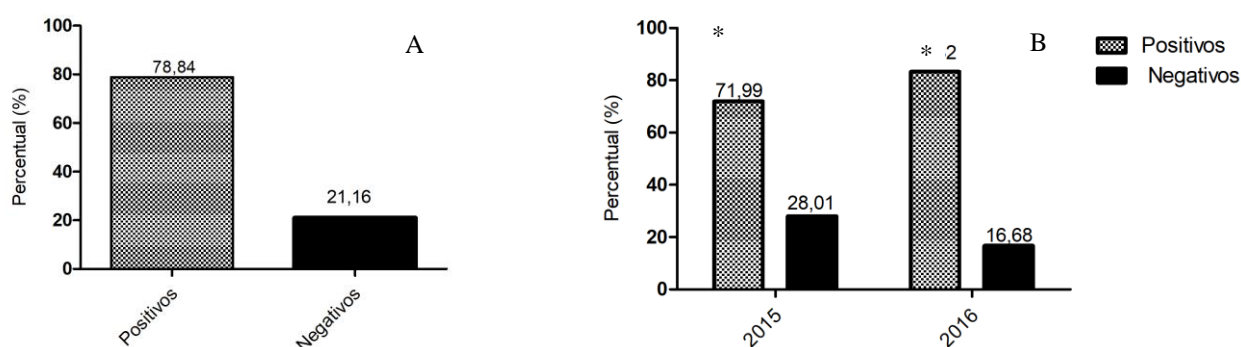
<b>Mês</b>	<b>Ano</b>		<b>Prevalência 2015 a 2016</b>
	<b>2015</b>	<b>2016</b>	
Janeiro	0/5	0/35	0/40 (0,00%) <sup>b</sup>
Fevereiro	1/44	3/27	4/71 (5,63%) <sup>b</sup>
Março	0/1	0/17	0/18 (0,00%) <sup>b</sup>
Abril	0/16	1/76	1/92 (1,08%) <sup>b</sup>
Maiο	2/179	0/40	2/219 (0,91%) <sup>b</sup>
Junho	9/40	0/51	9/91 (9,89%) <sup>b</sup>
Julho	0/6	18/88	18/94 (19,14%) <sup>a</sup>
Agosto	0/9	0/38	0/47 (0,00%) <sup>b</sup>
Setembro	0/32	1/60	1/92 (1,08%) <sup>b</sup>
Outubro	0/44	0/6	0/50 (0,00%) <sup>b</sup>
Novembro	3/85	0/18	3/103 (2,91%) <sup>b</sup>
Dezembro	21/57	0/16	21/73 (28,76%) <sup>a</sup>

\* Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os parâmetros analisados.

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

## 5.2 SOROLÓGICO

Durante o período de janeiro de 2015 a dezembro de 2016, foram encaminhadas ao HVU 6474 amostras para pesquisa de anticorpos anti *T.vivax* por RIFI, das quais 78,84% (5104/6474) apresentaram resultado positivo (Figura 3A). Analisando a soroprevalência por ano, pode-se notar aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em 2016 (83,32% - 3261/3914) em relação a 2015 (71,99% - 1843/2560) (Figura 3B). Colocar a Letra B na figura.



**Figura 3** – Prevalência de anticorpos anti *T.vivax* (A) em bovinos submetidos a pesquisa sorológica por RIFI no período de 2015 a 2016 (B).

\* Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os parâmetros analisados.

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Analisando a frequência dos títulos sorológicos pode-se notar que em 2016 os títulos 80, 320, 640 e 1280 foram mais frequentes em relação a 2015 (Tabela 6).

**Tabela 6** – Percentual de amostras positivas de acordo com os títulos sorológicos de amostras de bovinos submetidos a pesquisa sorológica por RIFI durante os anos de 2015 e 2016.

Variáveis	Títulos sorológicos						Total
	Não reagente	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	
Ano							
2015	717	259	1584	0	0	0	2560
%	28,00% (717/2560)	10,11% (259/2560)	61,87% (1584/2560)	0,0%	0,0%	0,0%	
2016	653	577	966	574	424	720	3914
%	16,68% <sup>b</sup> (653/3914)	14,74% <sup>a</sup> (577/3914)	24,68% <sup>b</sup> (966/3914)	14,66% <sup>a</sup> (574/3914)	10,83% <sup>a</sup> (424/3914)	18,39% <sup>a</sup> (720/3914)	
Total	1370	836	2550	574	424	720	6474

\* Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os parâmetros analisados.

Fonte: Dados da pesquisa 2017.

Em relação ao sexo, idade e raça dos animais pode-se notar percentual de positividade estatisticamente inferior em fêmeas (74,53% - 2382/3196), com a faixa etária de 13 a 24 meses (58,10% - 43/74), da raça Gir (50,00% - 26/52) (Tabela 7).

**Tabela 7** – Número de amostras submetidas a RIFI em relação ao sexo, a idade e raça nos anos de 2015 a 2016.

<b>Caracterização amostral</b>	<b>Nº Positivos/Nº total</b>	<b>Prevalência</b>
<b>Sexo</b>		
Fêmea	2382/3196	74,53% <sup>a</sup>
Macho	228/284	80,28% <sup>b</sup>
<i>Não especificado</i>	2488/2994	83,09%
<b>Faixa etária</b>		
0-12 meses	66/77	85,71% <sup>b</sup>
13-24 meses	43/74	58,10% <sup>a</sup>
25-36 meses	34/49	69,38% <sup>b</sup>
> 36 meses	413/510	80,98% <sup>b</sup>
<i>Não especificada</i>	4542/5764	78,79%
<b>Raça</b>		
Nelore	52/64	81,25% <sup>b</sup>
Cruzamento Ind.	73/90	81,11% <sup>b</sup>
Girolando	3945/4952	79,66% <sup>b</sup>
Holandesa	332/424	78,30% <sup>b</sup>
Mestiça	20/26	76,92% <sup>b</sup>
SRD	637/851	74,85% <sup>a</sup>
Gir	26/52	50,0% <sup>a</sup>
<i>Braford</i>	3/3	100,0% <sup>b</sup>
<i>Anelorado</i>	2/2	100,0% <sup>b</sup>
<i>Jersey</i>	7/8	87,50% <sup>b</sup>
<i>Guzerá</i>	1/2	50,0% <sup>b</sup>

\* Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os parâmetros analisados.

Os parâmetros não especificados ou desconhecimentos foram omitidos da análise comparativa, assim como as categorias que apresentaram baixas frequências esperadas, indicadas em itálico.

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Dentre os municípios avaliados pode-se notar que Ituiutaba, Patos de Minas e Uberlândia foram os municípios que apresentaram prevalência sorológica estatisticamente inferior (Tabela 8).

**Tabela 8** – Prevalência de amostras positivas para *T.vivax* por RIFI de acordo com o Município durante os anos de 2015 a 2016.

Localidade	2015 – 2016	
	Positivos	Prevalência
<i>Não especificado</i>	3671/4608	79,66%
<b>Triângulo Mineiro</b>		
Campina Verde	16/16	100,00% <sup>a</sup>
Araguari	13/13	100,00% <sup>a</sup>
Frutal	85/106	80,18% <sup>a</sup>
Veríssimo	36/43	83,72% <sup>a</sup>
Pratinha	17/22	77,27% <sup>a</sup>
Prata	37/48	77,08% <sup>a</sup>
Tapira	16/21	76,19% <sup>a</sup>
Água Comprida	19/25	76,00% <sup>a</sup>
Uberaba	652/866	75,28% <sup>a</sup>
Perdizes	172/231	74,45% <sup>a</sup>
Ituiutaba	6/10	60,00% <sup>b</sup>
Uberlândia	9/23	39,13% <sup>b</sup>
<i>Campo Florido</i>	8/8	100,00% <sup>a</sup>
<i>Conquista</i>	7/8	87,50% <sup>a</sup>
<i>Santa Juliana</i>	8/8	100,00% <sup>a</sup>
<i>Itapagipe</i>	1/1	100,00% <sup>a</sup>
<i>Monte de Alegre de</i>	1/1	100,00% <sup>a</sup>
<i>Tiros</i>	1/1	100,00% <sup>a</sup>
<b>Alto Paranaíba</b>		
Sacramento	29/34	85,29% <sup>a</sup>
Araxá	35/49	71,42% <sup>a</sup>
Patos de Minas	64/92	69,56% <sup>b</sup>
<i>Carmo do Paranaíba</i>	8/8	100,00% <sup>a</sup>
<i>Coromandel</i>	7/7	100,00% <sup>a</sup>
<i>Ibiá</i>	2/2	100,00% <sup>a</sup>
<b>Sul e Sudoeste</b>		
Capetinga	20/23	86,95% <sup>a</sup>
Passos	151/186	81,18% <sup>a</sup>
<b>Mesoregião Paulista</b>		
Patrocínio Paulista	10/10	100,00% <sup>a</sup>
<b>Oeste Paulista</b>		
<i>Pimenta</i>	3/4	75,00% <sup>a</sup>

\* Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os parâmetros analisados

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Analisando o perfil sorológico dos animais em relação os meses dos anos de 2015 a 2016 observaram-se prevalência estatisticamente superior nos meses de Março (377/432 – 87,26%), Abril (374/445 – 84,04%), Maio (285/308 – 92,53%), Junho

(467/555 – 84,14%) e Julho (325/365 – 89,04%). A prevalência dos anos de 2015 a 2016 em relação aos meses está apresentada na Tabela 9.

**Tabela 9** – Prevalência de anticorpos anti-*T.vivax* em amostras encaminhadas ao HVU durante os meses dos anos de 2015 a 2016.

Mês	Ano		(2015 a 2016)/ Prevalência
	2015	2016	
Janeiro	28/64	179/203	207/267 (77,52%) <sup>b</sup>
Fevereiro	167/274	344/494	511/768 (66,53%) <sup>b</sup>
Março	60/88	317/344	377/432 (87,26%) <sup>a</sup>
Abril	19/46	355/399	374/445 (84,04%) <sup>a</sup>
Mai	46/61	239/247	285/308 (92,53%) <sup>a</sup>
Junho	81/121	386/434	467/555 (84,14%) <sup>a</sup>
Julho	17/29	308/336	325/365 (89,04%) <sup>a</sup>
Agosto	179/242	302/394	481/636 (75,62%) <sup>b</sup>
Setembro	199/233	221/282	420/515 (81,55%) <sup>b</sup>
Outubro	196/241	201/313	397/554 (71,66%) <sup>b</sup>
Novembro	501/665	162/209	663/874 (75,85%) <sup>b</sup>
Dezembro	350/496	247/259	597/755 (79,07%) <sup>b</sup>

\* Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os parâmetros analisados.

Fonte: Dados da pesquisa 2017.

### 5.3 CORRELAÇÃO EXAMES PARASITOLÓGICO E SOROLÓGICO

Analisando o perfil parasitológico e sorológicos dos animais submetidos aos dois exames pode-se notar que no título 1:1280 os animais apresentavam positividade estatisticamente superior ao exame parasitológico (Tabela 10).

**Tabela 10** – Percentual de positividade no exame parasitológico perante os diferentes títulos sorológicos, no período de 2015 a 2016 de amostras de bovinos com suspeita clínica de *T.vivax*.

<i>Buffy Coat</i>	Títulos sorológicos					
	Não reagente	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Negativo	20,66% (241/1166)	13,80% (161/1166)	32,16% (375/1166)	9,94% (116/1166)	7,46% (87/1166)	15,95% (186/1166)
Positivo	5,26% <sup>a</sup> (3/57)	19,29% <sup>a</sup> (11/57)	14,03% <sup>a</sup> (8/57)	7,01% <sup>a</sup> (4/57)	5,26% <sup>a</sup> (3/57)	49,12% <sup>b</sup> (28/57)

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os parâmetros analisados.

Fonte: Dados da pesquisa 2017.



Com base nesses resultados, amostras de sangue de bovinos negativos no teste parasitológico mas positivas no teste sorológico em diferentes títulos, foram selecionadas aleatoriamente para realizar a pesquisa molecular de *T.vivax*. Amostras positivas no parasitológico foram utilizadas como controle positivo.

#### 5.4 MOLECULAR

Após a realização da PCR, identificou-se DNA de *T.vivax* em 96,0% (24/25) das amostras positivas no esfregaço sanguíneo da papa leucocitária (*Buffy coat*) e em 4,42% (5/113) das amostras negativas no teste parasitológico e positivas na sorologia em diferentes títulos. Os resultados da pesquisa molecular está apresentado na Tabela 11.

**Tabela 11** – Perfil da pesquisa molecular realizada em amostras de sangue de bovinos com diferentes resultados nos exames parasitológico e sorológico.

<i>Buffy Coat</i> (BCT)/ Sorologia(RIFI)	PCR	
	Negativa	Positiva
BCT Negativo/RIFI Negativa	20/20 (100,0%)	0/20 (0,0%)
BCT Positivo/RIFI positivo	1/25 (4,0%)	24/25 (96,0%)
BCT Negativo/RIFI(1:80)	24/26 (92,3%)	2/26 (7,69%)
BCT Negativo/RIFI (1:160)	25/26 (96,2%)	1/26 (3,85%)
BCT Negativo/RIFI (1:320)	29/29 (100,0%)	0/29 (0,0%)
BCT Negativo/RIFI (1:640)	15/16 (93,8%)	1/16 (6,25%)
BCT Negativo/RIFI (1:1280)	15/16 (93,8%)	1/16 (6,25%)

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Avaliando a correlação do *Buffy coat* e PCR (padrão ouro) notou-se concordância de 96,2% entre os testes (Tabela 12), sendo considerada quase perfeita (Coeficiente Kappa (IC95%) = 0,866).

**Tabela 12** – Correlação entre o *Buffy coat* e o PCR

<i>Buffy Coat</i>	PCR		Total
	Negativa	Positiva	
Negativo	128 (81,0%)	5 (3,2%)	133 (84,2%)
Positivo	1 (0,6%)	24 (15,2%)	25 (15,8%)
Total	129 (81,6%)	29 (18,4%)	158 (100,0%)

Percentual de concordância = 152/158 (96,2%)

Percentual de discordância = 6/158 (3,8%)

Coeficiente Kappa (IC95%) = 0,866 (0,761-0,971) ® Concordância quase perfeita

Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

Já avaliando a correlação entre a sorologia e o PCR notou-se concordância de 31,6% entre os testes (Tabela 13) sendo considerada fraca (Coeficiente Kappa (IC95%) = 0,063).

**Tabela 13** – Correlação entre a Sorologia e o PCR

Sorologia	PCR		Total
	Negativa	Positiva	
Negativo	20 (12,7%)	0 (0,0%)	20 (12,7%)
Positivo	108 (68,3%)	30 (19,0%)	138 (87,3%)
Total	128 (81,0%)	30 (19,0%)	158 (100,0%)

Percentual de concordância = 50/158 (31,6%)

Percentual de discordância = 108/158 (68,4%)

Coeficiente Kappa (IC95%) = 0,063 (-0,035-0,161) ® Concordância fraca

Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

Analisando a concordância/discordância entre os testes (Tabela 13), notou-se que os resultados sorológicos foram discordantes em relação aos testes parasitológicos (Tabela 14).

**Tabela 14** – Distribuição da amostra segundo o padrão-ouro.

Testes diagnósticos	Padrão-ouro (Positividade <i>Buffy Coat</i> e/ou PCR)		Valor-p*
	Resultados concordantes	Resultados discordantes	
Sorologia	50/158 (31,7%) <sup>b</sup>	108/158 (68,4%)	<0,001
<i>Buffy Coat</i>	153/158 (96,8%) <sup>a</sup>	5/158 (3,2%)	
PCR	157/158 (99,4%) <sup>a</sup>	1/158 (0,6%)	

\*O valor-p se refere ao resultado do teste do qui-quadrado, comparando-se a acurácia entre os testes diagnósticos. Proporções seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas (p<0,05) após a realização do teste de múltiplas comparações, segundo procedimento de Marascuilo

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

## 6 DISCUSSÃO

A soroprevalência para *T.vivax* tem ampla variação. Na região sudeste, observa-se variação de 7,4% (CUGLOVICI et al., 2010) a 98,36% (CADIOLI et al., 2012). Em Minas Gerais, de 2,30% (MENESES, 2016) a 16,2% (FRANGE, 2013). Essas variações são decorrentes de fatores epidemiológicos e se o estudo foi ou não realizado em área de surto.

Assim, a elevada prevalência de anticorpos anti-*T.vivax* (78,83%) observada no presente estudo pode ser justificada pelo fato da análise ter sido realizada em amostras pertencentes a animais com suspeita clínica da doença. Os casos clínicos têm ocorrido com frequência nas regiões estudadas e como os sinais clínicos se confundem com os de outras enfermidades os veterinários e proprietários encaminham amostras biológicas dos seus animais para diagnóstico diferencial, no hospital veterinário, e, portanto justifica a alta prevalência. Trabalhos realizados por Cadioli et al., (2012), em São Paulo, e Frange (2013), em Minas Gerais, corroboram com essa observação, pois mostraram elevada soroprevalência nos animais pertencentes a áreas de surto. Segundo Frange, (2013) 100% das amostras de 16 animais com sinais clínicos da doença, analisadas durante o surto, e segundo Cadioli et al., (2012), 98,36% dos animais de uma propriedade que havia ocorrido surto apresentavam anticorpos anti- *T.vivax*.

Porém, em relação aos resultados parasitológicos, neste estudo observou-se baixa prevalência (5,96%), assemelhando-se a realidade de outros pesquisadores (DELAFOSSÉ et al., 2006; ADAM et al., 2012; QUISPE et al., 2003). Essa baixa prevalência parasitológica pode estar associada à baixa sensibilidade da técnica *Buffy Coat* pois segundo Gonzales et al., (2003) e Madruga et al., (2006) durante a fase crônica da doença a parasitemia não é detectável por esfregaço sanguíneo ou teste de Woo. Na fase superaguda da doença a parasitemia é alta e persistente. Na fase aguda pode ser encontrado grande número de parasitos no sangue periférico, e na fase crônica da doença a parasitemia é baixa (MADRUGA et al., 2006). Portanto, devido a esta flutuação parasitária durante a infecção o encontro de parasitos em esfregaços sanguíneos torna-se mais difícil (ANGWECH et al., 2015). Contudo, ressalta-se que embora parasitologicamente negativos, os animais podem ser portadores de infecção a níveis indetectáveis (GONZALES et al., 2003).

Nesse contexto, utilizou-se a PCR para aumentar a sensibilidade em detectar *T.vivax*. Uma vez que segundo Adam et al. (2012), os métodos moleculares passam a ser essenciais principalmente quando alguns animais considerados soropositivos, porém parasitologicamente negativos, podem estar infectados, ou seja, falsos negativos. Segundo Fikru et al., (2012); Angwech et al., (2015) a PCR é considerada duas a cinco vezes mais sensível que as técnicas sorológicas em casos crônicos da doença .

Como durante a análise comparativa dos resultados sorológicos e parasitológicos no presente estudo, evidenciaram uma alta detecção de tripomastigota de *T. vivax* nos esfregaços sanguíneos de animais com títulos de 1280, o teste molecular foi empregado, pois como o tratamento deve ser preconizado para animais que apresentem tripomastigota circulantes, a correlação positiva e a confirmação pela PCR poderiam servir como auxílio na instituição do tratamento já que Wilson e Cunnigham (1971) apud Menezes (2016) também consideram que os altos níveis de anticorpos devem ser atribuídos à presença de parasitos circulantes.

Porém esse estudo demonstrou não haver uma correlação positiva entre a PCR e aos títulos sorológicos obtidos na RIFI. Portanto, os altos títulos sorológicos não são capazes de informar se a infecção é ativa ou não. Mas a sorologia ainda é uma importante ferramenta para avaliar a frequência de animais que se infectaram no rebanho conforme descrito por Desquesnes (2004). Pois segundo Delafosse et al., (2006) há persistência de IgG após a recuperação clínica do animal .

Embora tenham excelentes resultados, o PCR não é satisfatório quando há baixa parasitemia como observado neste estudo, em que não houve uma correlação positiva entre o PCR e amostras positivas no *Buffy coat* (4,0%- 1/25) (DÁVILA et al., 2003; OSÓRIO et al., 2008).

Analisando os fatores epidemiológicos como raça, idade, sexo, localidade e sazonalidade. A maior prevalência parasitológica de *T.vivax* em animais sem raça definida assemelha-se a realidade de outros autores que relatam casos confirmados em fêmeas, sem raça definida, em São Pedro-RS (SILVA et al., 2009). Já no sorológico, os resultados obtidos neste estudo diferem dos trabalhos descritos por Barbosa et al. (2015), Bastos et al. (2013) e Cadioli et al. (2012), que observaram predominantemente maior soroprevalência em bovinos da raça Girolando pertencentes a propriedades oriundas de Ipamerí-GO, Barra do Garças-MT e Lins-SP, respectivamente.

Contudo, no Brasil têm-se observado vários relatos de surtos de Tripanossomíase em animais com diferentes características raciais. Como em rebanhos da raça Brahma em Formoso do Araguaia-TO (LINHARES et al., 2006) e de vacas mestiças em Pardo Suíço-PB (BATISTA et al., 2008). Também houve casos suspeitos de rebanhos da raça Jersey, no Paraná, sendo descartados a doenças após análises (SNAK, 2017).

A idade também se torna um importante fator de risco para a tripanossomose bovina. No presente estudo, a prevalência da doença no parasitológico, foi em animais com idade superior a 36 meses. Corroborando com os descritos por Angwech et al. (2015) que verificaram que animais mais velhos apresentaram maior prevalência da doença quando comparado aos animais mais jovens. No norte da Uganda pôde-se visualizar uma maior prevalência da tripanossomíase em animais acima de 48 meses de idade quando comparada a animais com menos de 12 meses (MAGONA et al., 2008).

No Brasil, há relatos de surtos em fêmeas maiores de 24 meses (SILVA et al., 2009), em bovinos leiteiros adultos (BATISTA et al., 2007) e em vacas em lactação (CADIOLI et al., 2012). Alguns fatores podem justificar a exposição dos animais com maior idade à tripanossomíase. O período de exposição aos vetores, bem como o manejo empregado entre os diferentes grupos de bovinos formados dentro de uma propriedade rural, podem estar diretamente relacionados à alta prevalência da positividade em animais com mais idade (TAKEET et al., 2013), corroborando com os achados do presente estudo.

Já no sorológico, foi observada menor prevalência em animais com a idade entre 13 a 24 meses de idade, corroborando com os achados descritos por Takeet et al., (2013) que descrevem menor prevalência em animais com menos de um ano de idade com infecção por *T. vivax* na Nigéria. No entanto, estes resultados diferem dos achados descritos por Delafosse et al., (2006) e Dayo et al., (2010) que observaram maior prevalência sorológica em animais mais velhos (DELAFOSSSE et al., 2006; DAYO et al., 2010).

Com relação ao manejo, bezerros que mamam o colostro estarão mais protegidos por imunidade materna, mantendo a parasitemia baixa a níveis não detectáveis, diminuindo assim a disseminação do parasito entre os demais (ANGWECH et al., 2015). No entanto, nos animais mais velhos, principalmente nas

fêmeas, o manejo passa a ser um fator preocupante na disseminação da doença no rebanho, conforme observado neste estudo.

Quanto a maior prevalência parasitológica da doença ser observada em fêmeas adultas, nesse estudo pode-se relacionar ao uso diário de ocitocina no manejo leiteiro, onde administra-se o hormônio em diversos animais com a mesma agulha, por via intravenosa. Houve relatos de contaminação por essa via em animais do Mato Grosso (BASTOS et al., 2013), Goiás (BARBOSA et al., 2015) e no Triângulo Mineiro-MG (FRANGE, 2013).

Enquanto a maioria dos estudos relata como observado neste estudo alta parasitemia em fêmeas, Magona et al. (2008) e Angwech et al. (2015) identificaram em seus estudos no continente africano maior prevalência da tripanossomíase em machos. Atribuí-se a positividade da doença ao estresse funcional que os animais dessas regiões sofrem, ao serem expostos a trabalhos pesados, como no preparo da terra para o plantio.

No Brasil, apesar dos machos serem utilizados principalmente para fins reprodutivos e estarem em número reduzido nas propriedades rurais, eles podem se destacar como importantes disseminadores da doença devido à confirmação da possibilidade de transmissão venérea, a partir da identificação do parasita no plasma seminal de animais experimentalmente infectados (MOURA, 2014), demonstrando por fim, a sua importância na cadeia epidemiológica da doença.

Por fim, outros autores consideram não haver diferenças estatisticamente significativas entre o gênero dos animais e a incidência da tripanossomíase bovina (MEKURIA; GADISSA, 2011; FIKRU et al., 2012; BIRYOMUMAISHO et al., 2013; TAKEET et al., 2013). Diferindo assim, do presente estudo.

De acordo com Nimer (1989) a Mesorregião do Triângulo Mineiro possui o clima megatérmico, ou seja, tropical com verão chuvoso e inverno seco, com estação chuvosa bem definida compreendendo o período de outubro a abril gerando uma média pluviométrica de 1500 a 1750 mm nos municípios que compõem a região do Alto Paranaíba e período seco que compreende os meses de maio a setembro. Portanto esta variação climática influencia a prevalência da doença por estar diretamente relacionada ao aumento da população de vetores (*Stomoxys calcitrans* e Tabanídeos), já que tanto a prevalência parasitológica quanto a sorológica foram maiores no período chuvoso coincidindo com a alta densidade das moscas transmissoras (TEREFE et al., 2015). Corroborando com os dados do presente

estudo, outros autores também descreveram altas prevalências no mesmo período causadas pela alta incidência de moscas *Stomoxys calcitrans*, consideradas principais vetores mecânicos da Tripanossomíase bovina no Brasil (MARTINS et al., 2008; ENWEZOR et al., 2008).

Sabe-se que a condição climática favorece a explosão populacional das moscas por meio da expansão de criatórios favoráveis ao desenvolvimento das mesmas, aumentando os sítios de reprodução. A temperatura em torno de 30°C, típica de região de Uberaba acaba por influenciar diretamente na propagação deste vetor, acelerando o ciclo biológico para menos de duas semanas, progredindo consideravelmente essa população (AGUIAR; VALGODE, 1992).

Pela análise parasitológica do presente estudo, puderam-se observar prevalência superior em julho e dezembro. Relacionam-se esses episódios ao início do período chuvoso e com a sazonalidade das moscas *S. calcitrans* na região (BARROS et al., 2010). Pode-se observar resultados semelhantes em estudos ecológicos realizados em Minas Gerais (RODRÍGUEZ BATISTA et al., 2005) e São Paulo (BITTENCOURT; MOYA BORJA, 2000).

Com relação aos tabanídeos, em estudo realizado por Dávila et al. (2003) com PCR no Pantanal, foi constatada também uma prevalência significativamente maior da infecção por tripanossomíase no período chuvoso. Os autores consideram que adicionalmente a este período do ano há um aumento da população de tabanídeos que são considerados vetores potenciais que por sua vez, também proporcionam uma taxa de infecção mais elevada.

Neste estudo a prevalência parasitológica e sorológica da doença no período seco, pode ser justificada pelo alto trânsito de animais durante este período, devido o aluguel de pastos a criadores que possuem pouca disponibilidade de forragem. Este fator também foi descrito por Batista et al. (2008) que constataram a ocorrência do surto de tripanossomíase por *T. vivax* neste mesmo período, que por sua vez coincidiu com a permanência de animais positivos na propriedade provenientes de uma fazenda localizada no estado da Paraíba, previamente diagnosticado pelos próprios autores.

Segundo Campos et al. (2008) neste período ocorre também o aumento de animais em confinamentos, que acabam desenvolvendo imunossupressão por estresse ocasionados pelo pico de secreção de cortisol endógeno, inibindo a produção de citocinas e suprimindo a proliferação de linfócitos, deixando o animal predisposto a desenvolver diversas doenças, dentre elas a Tripanossomíase por *T. vivax*.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os animais com suspeita clínica de tripanossomíase estão tendo contato com o agente o que permite o desenvolvimento de resposta imune e consequentemente o aumento da prevalência de anticorpos anti *T.vivax* e redução da parasitemia.
- Não há correlação dos altos títulos sorológicos com a presença do parasita por PCR.



**REFERÊNCIAS**

ADAM, Y.; MARCOTTY, T.; CECCHI, G.; MAHAMA, C.I.; SOLANO, P.; BENGALY, Z.; VAN DEN BOSSCHE, P. Bovine trypanosomosis in the Upper West Region of Ghana: Entomological, parasitological and serological cross-sectional surveys. **Research in Veterinary Science**, Pong-tamale, Ghana, n.92, p.462-468, 2012.

ADAMU, S.; FATIHU, M. Y.; USEH, N. M.; MAMMAN, M.; SEKONI, V. O.; ESIEVO K. A. N. Sequential testicular and epididymal damage in zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.143, p. 29–34. 2007.

AFEWERK, Y., CLAUSEN, P. H.; ABEBE, G., TILAHUN, G. E.; MEHLITZ, D. Populações de *Trypanosoma congolense* resistentes a múltiplos fármacos em gado de aldeia do distrito de Metekel, noroeste da Etiópia. **Acta Tropica**, v. 76, p. 231-238, 2000.

AGUIAR-VALGODE, M. & WILWARD-DE-AZEVEDO, E. M. V. 1992. Determinação das exigências térmicas de *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae), em condições de laboratório. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, (Supl.1):11-20.

ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; TEBALDI, J. H.; MACHADO, R. Z.; NASCIMENTO, A. A. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 669-676, jul./set. 2010.

AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Biologia** v. 3. São Paulo: Moderna, 2004.

ANDRIANARIVO, A.G.; MUIYA, P.; OPOLLO, M.; LOGAN-HENFREY, L.L. *Trypanosoma congolense*: comparative effects of a primary infection on bone marrow progenitor cells from N'Dama and Boran cattle. **Experimental Parasitology**, v. 80, p. 407–418, 1995.

ANGWECH, H.; NYEKO, J.H.P.; OPIYO, E.A. et al. Heterogeneity in the prevalence and intensity of bovine trypanosomiasis in the districts of Amuru and Nwoya, Northern Uganda. **Veterinary Research**, v. 11, p. 1-8, 2015.

ANOSA, V.O.; KANEKO, J.J. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): Hematologic, erythrocyte biochemical, and iron metabolic aspects. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 639–644, 1983.

AQUINO, L. P. C. T.; MACHADO, R. Z.; LEMOS, K. R.; MARQUES, L. C.; GARCIA, M.; V.; BORGES, G. P. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 112-118. 2010.

BARAL, T. N. Immunobiology of African Trypanosomes: Need of alternative interventions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 24, 2010.

BARBOSA, J. C.; BASTOS, T. S. A.; RODRIGUES, R. A.; MADRID, A. M., FARIA, L. C.; BESSA, G. F. V.; Primeiro surto de tripanossomose bovina detectado no estado de Goiás, Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 31, n. 2, p. 100, 2015.

BARRETT, M. P. et al. Trypanosome glucose transporters. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 91, n.1, p. 195-205, mar. 1998.

BASSI, P. B. **Cinética dos parâmetros clínicos, hematológicos e imunológicos em bovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax***. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado), Universidade de Uberaba – UNIUBE, Uberaba, 2014.

BASTOS, T. S. A.; LINHARES, G.F.C.; FREITAS, T.M.S. et al. Surto de tripanossomose bovina desencadeado após manejo inadequado durante aplicação de medicamento endovenoso. **Ars Veterinaria**, v. 29, n.4, p.63, 2013.

BARROS, A.T.M., KOLLER, W.W., CATTO J.B. & SOARES, C.O. 2010. Surtos por *Stomoxys calcitrans* em gado de corte no Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30 n. 11:p. 945-952.

BATISTA, J. S.; BEZERRA, F. S. B.; LIRA, R. A.; CARVALHO, J. R. G.; NETO, A. M. R.; PETRI, A. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 1, p. 63-69. 2008.

BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. et al. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 147 -181. 2007.

BAWA, E.K.; OGWU, D.; SEKONI, V.O. et al. Effects of *Trypanosoma vivax* on pregnancy of yankansa sheep and the results of homidium chloride chemotherapy. **Theriogenology**, v.54, n.7, p.1033-1040, 2000.

BIRYOMUMAISHO, S.; RWAKISHAYA, E.K.; MELVILLE, A.E. et al. Livestock trypanosomosis in Uganda: parasite heterogeneity and anaemia status of naturally infected cattle, goats and pigs. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1443-1450, 2013.

BITTAR, J. F. F.; MOURA, D.; YOKOTA, C. G.; SOUZA JÚNIOR, W. R. M.; PEREIRA, S. A. L.; BITTAR, E. R.; PANETO, J. C. C.; OLIVEIRA, P. C. L. **Trypanosomatídeos em bovinos: isolamento, identificação e avaliações laboratoriais e clínica de animais na região de Uberaba-MG, naturalmente infectados**. In: VII Seminário de Iniciação Científica da Universidade de Uberaba, 2006, Uberaba-MG. VII Seminários de Iniciação Científica da Universidade de Uberaba, 2006. Uberaba, **Anais...**2006.

BITTENCOURT, A. J. & MOYA BORJA, G. E. 2000. Flutuação sazonal de *Stomoxys calcitrans* em bovinos e eqüinos no município de Espírito Santo do Pinhal, São Paulo, Brasil. **Revista Universidade Rural, Série Ciência Vida**, v. 22 (Supl.) p. 101-106.

BLACK, S. J.; SICARDA, E. L.; MURPHY, N.; NOLAN, D. Innate and acquired control of trypanosome parasitaemia in Cape buffalo. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p.562-565. 2001.

BODA, C.; COURTIUUX, B.; ROQUES, P.; PERVIEUX, L.; VATUNGA, G.; BOULHOSA, J. Informação Científica. **Boletim Técnico Ministério da Agricultura**, p. 21-26, 1946.

BODA, C.; COURTIUUX, B.; ROQUES, P.; PERVIEUX, L.; VATUNGA, G.; JOSENANDO, T.; AYENENGOYE, C. R.; BOUTEILLE, B.; JAUBERTEAU M. O.; BISSER, S. Immunophenotypic lymphocyte profiles in Human African Trypanosomiasis. **PLoS ONE**. v. 4, n.7, 7p., e6184. 2009.

CADIOLI, F. A. et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p.118-124. 2012.

CAMPOS, M. T. G.; BITTAR, J. F. F.; FRANGE, R. C. C.; BASSI, P. B. Surto de tripanossomíase na região de Veríssimo-MG: Perfil sorológico, hematológico e bioquímico. In: 39º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Santos-SP. **Anais...** 2012.

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

CHAMOND, N.; COSSON, A.; BLOM-POTAR, M.C.; JOUVION, G.; D'ARCHIVIO, S.; MEDINA, M.; DROIN-BERGE'RE, S.; HUERRE, M.; GOYARD, S.; MINOPRIO, P. *Trypanosoma vivax* Infecciones: Pushing Ahead with Mouse Models for the Study of Nagana.I. Parasitological, Hematological and Pathological Parameters. **Neglected Tropical diseases**, v.4, n.8, p.1-10. 2010.

CORTEZ, A. P.; RODRIGUES, A. C.; GARCIA, H. A. et al. Cathepsin L- likes genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America- characterization, relationships and diagnostic implications. **Molecular and Celular Probes**. v. 23. p. 44- 51. 2009.

CUGLOVICI, D. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; REIS-CUNHA, J. L.; CARVALHO, A. U.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.11, n.3-4, p.320-326. 2010.

DAYO, G.K.; BENGALY, Z.; MESSAD, S. et al. Prevalence and incidence of bovine trypanosomosis in an agro-pastoral area of southwestern Burkina Faso. **Research in Veterinary Science**, v. 88, p. 470-477, 2010.

DABUS, D. M. M.; CAMPOS, D. F.; NEVES, M. F. *Trypanosoma vivax*. **Revistas Científicas Eletrônicas**, Labienópolis, v. 7, n.161, 2011. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria12/revisao/pdf/AnoVII-Edic12-Rev161.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

DÁVILA, A. M. R.; HERRERA, H. M.; SCHLEBINGER, T.; SOUZA, S. S.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal. **Brazilian Veterinary Parasitology**, v.117, p.1–13. 2003.

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

DELESPAUX, V.; KONING, H. P. E. Drogas e resistência aos medicamentos na tripanossomíase africana. **Drug Resistance Updates**, v. 10, p. 30-50, 2007.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*. **Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.49, n.315-321. 1996.

DESQUESNES, M.; DÁVILA, A. M.R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.213–231. 2002.

DESQUESNES, M. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. **OIE & CIRAD**, Paris, p. 190, 2004.

EISLER M. C.; LESSARD P.; MASAKE R. A.; MOLOO S. K.; PEREGRINE A. S.; Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 187-201, 1998.

ESPINOZA, E.; GONSÁLEZ, E.; ASO, P.; CABALLERO, H.; FUENMAYOR, J.; HIDALGO, L. Leucograma en novillas y becerros (Holstein) Infectados con una cepa venezolanas de *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 647-652, mar. 2000.

ENWEZOR, F.N.C.; SAMDI, S.M.; IJABOR, O. et al. The prevalence of bovine trypanosomes in parts of Benue state, north-central Nigeria. **Journal Vector Borne Diseases**, v. 49, p. 188-190, 2012.

FRANGE, R.C.C., BITTAR, J.F.F, SILVA, M.B.O., BASSI, P.B., FREITAS, B.B.B., CAMPOS, M.T.G., MACEDO, D.M.R., PAIVA, F., BITTAR, E.R. Tripanossomíase em vacas da microrregião de Uberaba MG: estudo soropidemiológico. In: **XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Anais**. 2012.

FRANGE, R. C. C. **Tripanossomíase em vacas da microrregião de Uberaba – MG: Estudo Soropidemiológico e Relato de Surto**. 2013. 76f. Dissertação (Doutorado) – Universidade de Uberaba – UNIUBE, Uberaba, 2013.

FLYNN, J. N.; MCKEEVER, D. J.; SILEGHEM, M.; NAESSENS, J. Modulation of the phenotype and function of bovine afferent lymph cells during infection with *Trypanosoma congolense*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 40, p.17-29. 1994.

FIKRU, R.; GODDEERIS, B.M.; DELESPAUX, V. et al. Widespread occurrence of *Trypanosoma vivax* in bovines of tsetse- as well as non-tsetse-infested regions of Ethiopia: a reason for concern. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 355-361, 2012.

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

GAUNT, S.D. **Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and protozoa**, p.154-162. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G.; JAIN N.C. (ed.) Schalm's Veterinary Hematology. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GEERTS, S. E.; HOLMES, P. H. **Gestão de Drogas e Resistência a Parasitas na Tripanossomose Bovina em África**. Série Técnico-Científica nº 1 do PAAT. Itália: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), 1998.

GIORDABI, F.; MORRISON, L.J; ROWAN, T. G.; KONING, H. P.; BARRETT, M. P. The animal trypanosomes and their chemotherapy: a review. **Veterinary Parasitology**, v. 14, p. 1862-1889. 2016.

GÓMEZ-PIÑERES, E.; TAVARES-MARQUES, L.; REYNA-BELLO, A. Tiempo de supervivência in vivo y criopreservación de *Trypanosoma vivax*. **Revista Científica, FCV-Luz**, v.19, n.3, p.225-229. 2009.

GONZALES, J. L.; CHACON, E.; MIRANDA, M. et al. Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 9-16. 2007.

GONZALEZ, J. L.; JONES, T. W.; PICOZZI, K.; CUELLAR, H. R. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of bovine trypanosomiasis and epidemiological surveillance in Bolívia. **Kinetoplastid Biology and Disease**, New York, v. 28, p. 8-12, 2003.

GUERRA, R. M. S. N. C. et al. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 833-835, 2008.

HARRIS, T. H.; COONEY, N. M.; MANSFIELD J. M.; PAULNOCK D. M. Signal transduction, gene transcription, and cytokine production triggered in macrophages by exposure to trypanosome DNA. **Infection and Immunity**, v.74, n.8, p.4530–4537. 2006.

HILL, E. W.; O’GORMAN, G. M.; AGABA, M.; GIBSON, J. P.; HANOTTE, O.; KEMP, S. J.; NAESSENS, J.; COUSSENS, P. M.; MACHUGH, D. E. Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.105:3-4, p. 247–258. 2005.

HOARE, C. A. The Trypanosomoses of mammals: **The Trypanosomoses of mammals**, Oxford: Blackwell, 749p. 1972.

HOLMES, P. H.; EISLER, M. C.; GEERTS, S. A quimioterapia actual da tripanossomíase animal em The Trypanosomiasis. **CAB International**, Wallingford, Reino Unido, p. 431-444, 2004.

ILRAD. **Trypanosomiasis: Annual Report of the International Laboratory for Research on Animal Diseases**, p. 24-43, 1983.

KADIMA, K. B.; SAROR, D. I.; GYANG, E. O.; ESIEVO, K. A. N. Serum biochemical values of *Trypanosoma vivax* infected cattle and effects of lactose in saline infusion. **Veterinary Archives**, Zagreb, v. 70, n. 2, p. 67-74, 2000.

KINABO, L. D. Farmacologia dos fármacos existentes para a tripanossomíase animal. **Acta Tropica**, v. 54, p.169-183, 1993.

KINABO, L. D.; BOGAN, J. A. A farmacologia do isometamidium. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.11, p. 233-245, 1988.

LEGER, M.; VIENNE, M. **Epizootie à trypanosomes chez les Bovidés de la Guyane française**. Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique. v. 12, p. 258-266, 1919.

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

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

LOSOS, G. J. Infectious tropical diseases of domestic animals. Harlow Essex: **Longman Scientific and Technical**, 1986. p. 938.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER, I. B.; RIBEIRO, L. R.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MIGUITA, M.; MELO, E. P.; ALMEIDA, R.; LIMA JR, M. M. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7. 2006.

MADRUGA, C. R. **Epidemiologia do Trypanosoma no Brasil**. National Council for Scientific and Technological Development. 2009.

MAGONA, J. W.; WALUBENGO, J.; ODIMIN, J. T. Acute haemorrhagic syndrome of bovine trypanosomosis in Uganda. **Acta Tropica**, v.107, p.186–191. 2008.

MAMOUDOU, A., DELESPAUX, V., CHEPNDA, V., HACHIMOU, Z., ANDRIKAYE, J. P.; ZOLI, A. E. ; GEERTS, S. Avaliação da ocorrência de resistência a fármacos tripanocidas em tripanossomas de bovinos naturalmente infectados na região de Adamaoua, Camarões, utilizando o teste padrão de ratos e ferramentas moleculares. **Acta Tropica** v. 106 , p. 115-118, 2008.

MARTINS, C.F.; MADRUGA, C.R.; KOLLER, W.W. et al. *Trypanosoma vivax* infection dynamics in a cattle herd maintained in a transition area between Pantanal lowlands and highlands of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 51-56, 2008.

MATTIOLI, R. C.; FAYE, J. A.; JAITNER, J. Estimation of trypanosomal status by the buffy coat technique and an antibody ELISA for assessment of the impact of trypanosomosis on health and productivity of N'Dama cattle in The Gambia. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.25–35. 2001.

MEKATA, H.; KONNAI, S.; WITOLA, W.H. et al. **Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene**. Infection, Genetics and Evolution., v. 9, p. 1301-1305, 2009.



MEKURIA, S.; GADISSA, F. Survey on bovine trypanosomosis and its vector in Metekel and Awi zones of Northwest Ethiopia. **Acta Tropical**, v. 117, p. 146-151, 2011.

MELO, S. A.; BARROS, A. C. E.; COSTA, F. B. et al. Bovine trypanosomiasis an emerging disease in Maranhão state- Brazil. **Vector- borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, p. 853- 856. 2011.

MENESES, R. M. **Tripanossomose bovina em Minas Gerais, 2011: soroprevalência e fatores de risco**. 2016, 61f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária- UFMG, Belo Horizonte, 2016.

MOURA, Dênia Monteiro de. **Identificação de trypanosoma vivax e de antígenos do parasita em plasma seminal de bovinos púberes experimentalmente infectados**. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) - Universidade de Uberaba, Uberaba, 2014.

MURRAY, M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, n.4, p.325-326. 1977.

NAESSENS, J.; TEALE, A. J.; SILEGHEM, M. Identification of mechanisms of natural resistance to African trypanosomiasis in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.87, p.187-194. 2002.

NIMER, E. & BRANDÃO, A. M. P. M. **Balanço hídrico e clima da região dos cerrados**. BRASIL/ Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. Rio de Janeiro: 166 p, 1989.

NG`AYO, M.O.; NJIRU, Z.K.; KENYA, E.U.; MULUVI, G.M.; OSIR, E.O.; MASIGA, D.K. Detection of trypanosomes in small ruminants and pigs in western Kenya:important reservoirs in the epidemiology of sleeping sickness? **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 45, p. 1-7, 2005.

OKECH D. G.; STEVENSON, R. B.; ALUSHULA, P. The effect of *Trypanosoma vivax* infection on late pregnancy and postpartum return to cyclicity in Boran cattle. **Theriogenology**, v. 46, n.5, p.859-869, 1996.

OSÓRIO, A. L. A. R.; MADRUGA, C. R.; DESQUESNES, M.; SOARES, C. O.; RIBEIRO, L. R. R.; DA COSTA, S. C. G. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its

biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p. 1–13. 2008.

OTTE, M.J.; ABAUBARA, J.Y.; WELLS, E.A. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. **Tropical Animal. Health. Production**, v.26, p.146-156, 1994.

PAIVA, F.; LEMOS, R.A.A.; OSHIRO, E.T.; SALVADOR, S.C.; NAKAZATO L. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista. Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, supl.1, p. 349, 1997.

PAIVA, F.; LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO L.; MORI, A.E.; BRUM, K.B.; BERNARDO, K.C. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: I- Acompanhamento clínico, laboratorial e anátomopatológico de rebanhos infectados. **Revista. Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.2, p.135-141, 2000.

PEREGRINE, A. S. Quimioterapia e sistemas de administração: hemoparasitas. **Veterinary Parasitology**, v. 54, 223-248, 1994.

PILLAY, D.; IZOTTE, J.; FIKRU, R.; BÜSCHER, P.; MUCACHE, H.; NEVES, L.; BOULANGÉ, A.; SECK, M. T.; BOUYER, J.; NAPIER, G. B.; CHEVTZOFF, C.; COUSTOU, V.; BALTZ, T. *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. **Plos One** n. 8, v. 10, 2013.

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

QUISPE, P.; CHÁVEZ, A.; CASAS, E. et al. Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de la provincia de Coronel Portillo, Ucayali. **Revista de Investigaciones Veterinária del Perú**, v.14, p.161-165, 2003.

RADOSTITS, C.C.G, DOUGLAS, C.B, KENNETH, W, HINCHCLIFF. **Clínica veterinária- Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. São Paulo: Gyanabara Koogan, 2002.

REBESKI, D. E.; WINGER, E. M.; ROGOVIC, B.; ROBINSON, M. M.; CROWTHER, J. R.; DWINGER, R. H. Improved methods for the diagnosis of

African Trypanosomiasis. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 249-253, 1999.

SANDOVAL, E.; ESPINOZA, E.; VALLE, A. Leucopenia y trombocitopenia en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. **Veterinaria Tropical**, v.21, n.1, p.13-33. 1996.

SCHENK, M. A. M.; MENDONÇA, C. L.; MADRUGA, C. R.; KOHAYAGAWA, A.; ARAÚJO, F. R. Avaliação clínico laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n.4, p. 157-161. 2001.

SEKONI V.O.; NJOKU C.O.; KUMI-DIAKA J.; SAROR D.I. Pathological changes in male genitalia of cattle infected with *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense*. **British Veterinary Journal**, v.146, n.2, p.175-180, 1990.

SERRA-FREIRE, N. M.; SILVA, A. M.; MUNIZ, J. A. Prevalência de *Trypanosoma vivax* em *Bubalus bubalis* no município de Belém, estado do Pará. **Atas da Sociedade de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, p.35-36, 1981.

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

SNAK, Alessandra. **Prevalência e fatores de risco associados a infecção por Neospora caninum e Trypanosoma vivax em bovinos leiteiros e ocorrência de n. caninum e parasitos gastrointestinais em cães de propriedades rurais do Oeste do Paraná**. 2017. 119f. Dissertação ( Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2017.

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

SILVA, R. A. M. S.; DAVILA, A. M. R. *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle, p.123-145 In: KESSLER R. H.; SCHENK M. A. M. **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. 1998.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*– **Biología, diagnóstico e controle**. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Corumbá, p.140, 2002.

SILVA, R. A. M. S.; et al. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia**. Embrapa, Corumbá-MS, 2004.

SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; POLENZ, M. F.; POLENZ, C. H.; TEIXEIRA, M. M. G.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S. G. First report of *Trypanosoma vivax* in bovines in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v.39, n. 8, p.2550-2554. 2009.

SIMO, G.; ASONGANYI, T.; NKININ, S.W.; NJIOKOU, F.; HERDER, S. High prevalence of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon. **Veterinary Parasitology.**, v. 139, n. 1-3, p. 57-66, 2006.

SINYANGWE, L., DELESPAUX V., BRANDT J., GEERTS S., J. MUBANGA, MACHILA, N., HOLMES, P. H.; EISLER, M. C. Resistência a drogas trypanocidas na província oriental da Zâmbia. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 125-135, 2004.

TAKEET, M.I.; FAGBEMI, B.O.; DE DONATO, M. et al. Molecular survey of pathogenic trypanosomes in naturally infected Nigerian cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 555-561, 2013.

TAMASAUKAS, R.; ROA, N.; COBO, M. Trypanosomosis por *Trypanosoma vivax* en búfalos (*Bubalis bubalis*) en dos fincas del estado Guárico. **Revista Científica FCV-Luz**, Venezuela, v. 16, p. 575-578, 2006.

TAMASAUKAS, R.; SILVA, A.; FLORIO-LUIS, J.; SANCHES, J.; FERNANDÉZ, M.; RIVERA, S.; COBO, M. Agroecopidemiología de tripanosomosis en ganadería doble propósito en el sistema de Riego Río Guárico, Venezuela. Etapa I. **Actas Iberoamericanas Conservación Animal.**, v. 4, p. 285-288, 2014

TAYLOR, K. A. Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.219-240. 1998.

TAYLOR, K.; AUTHIÉ, E. M. L. Pathogenesis of Animal Trypanosomiasis. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P.; MILES, M. **The Trypanosomiasis**. 1. ed, Wallingford: CABI Publishing, cap. 18, p. 334. 2004.

TEREFE, E.; HAILE, A.; MULATU, W. et al. Phenotypic characteristics and trypanosome prevalence of Mursi cattle breed in the Bodi and Mursi districts of South Omo zone, southwest Ethiopia. **Tropical Animal Health Production**, v. 47, p. 485-493, 2015.

TIZARD, I. **Veterinary Immunology**. Philadelphia: Saunders, 2012.

TORO M., LEON E., LOPEZ R., PALLOTA F., GARCIA JA E RUIZ A. Efeito do isometamidium sobre infecções por *Trypanosoma vivax* e *T. evansi* em animais experimentalmente infectados. *Veterinary Parasitology*, transduction, gene transcription, and cytokine production triggered in macrophages by exposure to trypanosome DNA. **Infection and Immunity**, v.74, n.8, p.4530–4537. 2006.

UZCANGA, G. L.; PEREZ-ROJAS, Y.; CAMARGO, R. et al. Serodiagnosis of bovine trypanosomiasis caused by non-tsetse transmitters *Trypanosoma (Duttonella) vivax* parasites using the soluble form of a Trypanozoon variant surface glycoprotein antigen. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 32-42, 2016.

VAN DEN BOSSCHE P. & ROWLANDS G.J. 2001. The relationship between the parasitological prevalence of trypanosomal infections in cattle and herd average packed cell volume. **Acta Tropica**, v. 78, p. 163-170.

VENTURA, R. M.; PAIVA, F.; SILVA, R. A. M. S.; TAKEDA, G.F.; BUCK, G. A.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the Spliced-Leader Gene of a Brazilian Stock and Species-Specific Detection by PCR Amplification of an Intergenic Spacer Sequence. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 37–48. 2001.

WELLS, E. A.; BETANCOURT, A.; RAMIREZ, L. E. Serological evidence for the geographical distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, p. 448- 449, 1977.

WILSON, A.J.; CUNNINGHAM, M.P. Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. III. Patterns in the production of common antibodies. **Tropical Animal Health Production**, v. 3, p. 133–139, 1971.

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