



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MAURICIO SOUSA LIMA

**OCORRÊNCIA DE *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DE LEITE DA
MICRORREGIÃO DO MÉDIO MEARIM- MA**

São Luís - MA

2021

MAURICIO SOUSA LIMA

**OCORRÊNCIA DE *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DE LEITE DA
MICRORREGIÃO DO MÉDIO MEARIM- MA**

Monografia apresentada ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, com requisito para grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. José Gomes Pereira

São Luís - MA

2021

Lima, Maurício Sousa.

Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos de leite da microrregião do Médio Mearim / Maurício Sousa Lima. – São Luís, 2021.

40 f.

TCC (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2021.

Orientador: Prof. Dr. José Gomes Pereira.

1.*Trypanosoma vivax*. 2.Sorologia. 3.Médio Mearim. I.Título.

CDU: 636.2.034:616.993.1(812.1)

MAURICIO SOUSA LIMA

**OCORRÊNCIA DE *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DE LEITE DA
MICRORREGIÃO DO MÉDIO MEARIM- MA**

Monografia apresentada ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, com requisito para grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovada em: 10/ 03/ 2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Gomes Pereira – Orientador

Doutor em Medicina Veterinária
Universidade Estadual do Maranhão



Profa. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos – 1º examinador

Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia
Universidade Estadual do Maranhão



Profa. Dra. Maria do Socorro Costa Oliveira – 2º examinador

Doutora em Medicina Veterinária
Universidade Estadual do Maranhão

DEDICO

A minha família, principalmente meus pais, Quiteria Lima Sousa e Antonio Marcos Silva Lima, que me amam imensamente e não deixaram faltar nada durante a minha vida; Aos meus irmãos, Lais Monique e Marcos Vinicios, meus sobrinhos Miguel e Laura, ao quais sempre estiveram comigo em momentos felizes e triste. A minha avó paterna Lúcia Maria, Minha Tia-avó Lucy Mary e bisavó Mely, que ajudaram na minha trajetória, em especial a minha avó Lucia. Minha família materna, agradeço em especial aos meus avós, Maria Zélia e Cícero, tios, Jacinto (*In memorium*), Gerdeão, Rubens, Washington, Iracélia e Iracema, aos quais agradeço imensamente, pela convivência e ensinamentos que fomentaram em meu caráter. Dedico aos meus professores, José Gomes e Maria do Socorro, pelas oportunidades e ensinamentos e aos meus amigos.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, pela vida, pois mesmo por momentos difíceis durante a minha vida, não deixei de acreditar em todas as coisas boas dadas por Ele, mesmo eu não sendo perfeito.

Aos meus pais, Quiteria Sousa e Antonio Marcos, pois eles são a base do meu crescimento na educação, caráter e amor, não deixando faltar nada em momento algum e sempre incentivando nos momentos triste e alegre. A minha irmã, Lais Monique, ao qual é uma pessoa maravilhosa e guerreira, uma mãe e irmã. Ao meu irmão, Marcos Vinicios, pois sempre esteve comigo, me protegendo e incentivando a cada momento. Aos meus sobrinhos, Miguel e Laura.

Agradeço as pessoas que fizeram parte da minha vida e compartilharam momentos incríveis, e que agora peço desculpas e perdão por ter feito algo ruim em sua vida.

A minha família materna e paterna, minha avó Lucia Maria, tia avó Lucia Mary, bisavó Mely, Tios e tias, principalmente Jacinto Lima (*In memorium*) que sempre acreditou no meu futuro profissional.

Aos amigos e colegas que fiz durante a graduação, aos quais vivenciei durante 5 anos de graduação os melhores momentos.

As minhas amigas, Aline Guedes, Jady Lima e Roberta Castro, pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer durante a graduação e levarei para a minha vida pessoal e profissional. Aos amigos, Eduardo del Sarto, Leandro Carvalho e Wendell Abreu, aos quais ajudaram bastante na graduação e ficarão marcado na minha vida.

Ao meu orientador, professor José Gomes, por acreditar, compartilhar e dar a oportunidade de aprofundar mais meus conhecimentos, em projetos de iniciação científica e pelo vasto conhecimento adquirido em sua vida, pois sempre será meu mestre e amigo.

Aos professores e equipe de cada projeto aos quais participei, destacando a prof^a. Larissa Sarmiento, prof^a. Viviane Coimbra, prof^a. Lenka Lacerda, Prof. Hamilton, prof. Evaldo e ao Lucas Diniz, onde cada um proporcionou mais conhecimento a minha formação.

Aos doutores e pesquisadores, Dra. Rosângela Zacarias Machado e Marcos Rogério André da Universidade Estadual Paulista - UNESP/Jaboticabal, por colaborarem em projetos, aos quais levarei seus ensinamentos em minha carreira profissional.

Agradeço imensamente a prof^a. Maria do Socorro, pois ela foi uma mãe, amiga, conselheira, mestra, pois estará sempre presente em meu coração.

Por fim, a todos que fizeram e fazem parte da minha vida, de forma direta ou indireta, contribuindo para a minha formação e desenvolvimento pessoal e profissional.

“Mesmo desacreditado e ignorado por todos, não posso desistir, pois para mim, vencer é nunca desistir.”

(Albert Einstein)

RESUMO

O agronegócio brasileiro cresce cada vez mais no cenário Mundial movendo a economia do país através da criação de bovinos. Assumindo posições favoráveis na produção de leite, registrou 7,871 milhões de litros de leite no ano de 2019 com crescimento de 4,1% no ano de 2018. Em um contexto regional, o Maranhão apresenta ótimas condições favoráveis para a ascensão da bovinocultura leiteira, porém os obstáculos que afetam a produção e produtividade são as enfermidades causadas por hemoparasitas, destacando os vetores hematófagos transmissores da tripanossomíase bovina. Objetivou-se com esse estudo, verificar a ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos leiteiros da microrregião do Médio Mearim, Maranhão. O trabalho foi realizado em seis municípios da microrregião. Foram coletadas 235 amostras (130 /vacas e 105/bezerros) em propriedades dos municípios de Lima Campos, Pedreiras, Trizidela do Vale, Bernardo do Mearim, Igarapé Grande e Poção de Pedras. Os resultados hemoparasitológico das amostras de sangue resultantes do esfregaço sanguíneo, mostrou um animal positivo para *T. vivax* proveniente do município de Poção de Pedras. Foi realizado a técnica de microhematócrito para determinar o percentual de animais com anemia, observando-se variação de 15% a 65% no percentual de hematócrito nas amostras analisadas, onde que resultou em 6,88% (15/235) com hematócrito inferior a 24% e 93,61% (220/235) com hematócrito acima de 24%, classificados como anêmicos e não-anêmicos, respectivamente. Os resultados pela técnica da RIFI mostraram que em 12,77% (30/235) de animais foram soro reativos, ao fazer a análise individual de cada município, dos 30 animais soro reagentes, Lima Campos correspondeu a 20,00% (6/30), Pedreiras 16,67% (5/30), Trizidela do Vale 6,67% (2/30), Poção de Pedras 10,00 (3/30), Bernardo do Mearim 23,33% (7/30) e Igarapé Grande 23,33% (7/30). Enquanto pela técnica ELISA indireto obteve-se 8,09%(19/235) soro reagentes. Quando estes foram analisados individualmente, observou-se os diferentes resultado, Em Lima Campos, correspondeu a 5,26% (1/19) soropositivos, Pedreiras 21,05% (4/19), Trizidela do Vale 26,32% (5/19), Poção de Pedras 10,53% (2/19), Bernardo do Mearim 15,79% (3/19) e Igarapé Grande 21,05% (4/19). Quando comparou-se os resultados sorológicos (RIFI e iELISA) observou-se neste estudo que a RIFI foi muito mais sensível do que a iELISA. Animais da bacia leiteira do Médio Mearim de acordo com o resultado exposto indicam a presença do *T. vivax* bem como, a presença de anticorpos soro reagentes.

Palavras-chaves: *Trypanosoma vivax*, sorologia, Médio Mearim.

ABSTRACT

The Brazilian agribusiness grows more and more in the World scenario advanced the economy of the country through the creation of cattle. Assuming favorable positions in the production of, it registered 7,871 million liters of milk in 2019 with a growth of 4.1% in the year of 2018. In a regional context, Maranhão presents excellent favorable conditions for the rise of dairy cattle, however the objectives that affect production and productivity are diseases caused by hemoparasites, highlighting the hematophagous vectors that transmit bovine trypanosomiasis. The objective of this study was to verify the occurrence of *Trypanosoma vivax* in dairy cattle from the microrregião do Médio Mearim, Maranhão. 235 samples (130 / cows and 105 / calves) were collected from properties in the municipalities of Lima Campos, Pedreiras, Trizidela do Vale, Bernardo do Mearim, Igarapé Grande and Poção de Pedras. The hemoparasitological results of the blood samples resulting from the blood smear, showed a positive animal for *T. vivax* from the municipality of Poção de Pedras. The microhematocrit technique was performed to determine the percentage of animals with anemia, with a variation of 15% to 65% in the percentage of hematocrit in the analyzed samples, which resulted in 6.88% (15/235) with hematocrit lower than 24% and 93.61% (220/235) with hematocrit above 24%, classified as anemic and non-anemic, respectively. The results using the RIFI technique showed that in 12.77% (30/235) of animals were serum reactive, when doing the individual analysis of each municipality, of the 30 serum reactive animals, Lima Campos corresponded to 20.00% (6 / 30), Pedreiras 16.67% (5/30), Trizidela do Vale 6.67% (2/30), Poção de Pedras 10.00 (3/30), Bernardo do Mearim 23.33% (7/30) and Igarapé Grande 23.33% (7/30). While the indirect ELISA technique obtained 8.09% (19/235) reagent serum. When these were analyzed individually, the different results were observed, In Lima Campos, it corresponded to 5.26% (1/19) seropositive, Pedreiras 21.05% (4/19), Trizidela do Vale 26.32% (5 / 19), Poção de Pedras 10.53% (2/19), Bernardo do Mearim 15.79% (3/19) and Igarapé Grande 21.05% (4/19). RIFI and iELISA) it was observed in this study that RIFI was much more sensitive than iELISA. Animals from the Middle Mearim dairy basin, according to the exposed result, indicate the presence of *T. vivax* as well as the presence of serum reactive antibodies.

Keywords: *Trypanosoma vivax*, serology, Médio Mearim.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem representativa dos municípios estudados da Microrregião Médio Mearim.	24
Figura 2 - Identificação parasitológica pela técnica de esfregaço sanguíneo com coloração panótico rápido.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados percentuais de anemia pela técnica de microhematócrito dos bovinos da microrregião do Médio Mearim.	28
Tabela 2 - Distribuição de animais soropositivos por ELISA indireto e RIFI por municípios do Médio Mearim, Estado do Maranhão.	30
Tabela 3 - Distribuição de ocorrência de RIFI e iELISA relacionado a idade dos animais da microrregião do Médio Mearim.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
BCT	Técnica <i>Buffy Coat</i>
CEEA	Comissão de Ética e Experimentação Animal
d^2	Precisão absoluta desejada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
iELISA	Ensaio Imunossorbente Ligado à Enzima Indireto
IgG	Imunoglobulina G
INAGRO	Instituto de Agronegócios do Maranhão
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
n	Tamanho da amostra
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Py	Prevalência esperada
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido ribonucleico
TCH	Técnica de Centrifugação de Hematócrito
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VSGs	Glicoproteínas de superfície
z	Coefficiente de confiança ($z = 1,96$)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 <i>Trypanosoma vivax</i>	18
3.2 TRANSMISSÃO	18
3.3 CICLO BIOLÓGICO DO <i>Trypanosoma vivax</i>	19
3.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	20
3.5 EPIDEMIOLOGIA.....	22
4 METODOLOGIA	24
4.1 ÁREA EXPERIMENTAL E ANIMAIS	24
4.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS	25
4.3 VOLUME GLOBULAR	25
4.4 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE <i>Trypanosoma vivax</i>	26
4.5 ENSAIO IMUNOSORBENTE ENZIMÁTICO LIGADO À ENZIMA INDIRETO (IELISA).....	26
4.6 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)	27
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5 RESULTADO E DISCUSSÕES	28
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	33

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio vem crescendo cada vez mais no Mundo por fornecer proteínas e insumos essenciais para o ser humano, movimentando a economia dos países na cadeia produtiva leiteira e carne. O Brasil apresenta condições territoriais, climáticas e abundância em água que são propícias a criação e desenvolvimento de bovinos, classificando-o em posições excelentes no ranking, encontrando-se em segundo colocado com 214,69 milhões de cabeças (ABIEC, 2021), com cerca de 2,21 milhões de toneladas de carne bovina sendo exportadas (ABIEC, 2021) para outros países, aos quais 84,59% dos abates correspondem a Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Goiás, Rondônia, Minas Gerais e Pará (MAPA, 2020).

O setor leiteiro do Brasil cresce cada vez mais no cenário mundial, onde 7,871 milhões de litros foi registrado em 2019, com um crescimento de 4,1% sobre o ano de 2018 (7,563 milhões de litros) (EMBRAPA, 2020). Em um contexto regional, o Maranhão ocupa a quarta posição ao total produzido de leite produzido, atrás dos Estados de Pernambuco, Bahia e Ceará, respectivamente (EMBRAPA, 2019), com as regiões Tocantina e Médio Mearim em destaque no estado sobre a produção leiteira.

Os fatores que podem dificultar a ascensão do Estado do Maranhão na produção e produtividade leiteira são as enfermidades que acometem os animais, ectoparasitas e endoparasitas, além de ter como foco as hemoparasitoses como as tripanossomoses e seus vetores hematófagos, cujo os impactos podem aumentar gradativamente, devido ao fato de deslocamentos irrestritos de animais, o que favorece a disseminação de tripanossomas (GIORDANI et al., 2016).

Nas Américas, a principal via de transmissão são vetores mecânicos das famílias Tabanidae - *Tabanus* sp. e Muscidae - *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans* (OLIVEIRA et al., 2009; CADIOLI et al., 2012), além de transmitida de forma via iatrogênica pelo compartilhamento de agulhas contaminadas com o parasito entre bovinos para aplicação de vacinas ou medicamentos (GERMANO et al., 2018).

As tripanossomoses no Brasil ocorrem em diversas partes do território, onde o primeiro surto ocorreu no estado do Pará em ruminantes (BOULHOSA, 1946; SHAW & LAINSON, 1972), e em estados do Brasil, os surtos ocorrem mais por fatores como climas ambientais oscilativos, contribuindo para aumento de vetores hematófagos durante épocas do ano.

A doença apresenta alta morbidade e mortalidade, com casos severos acometendo o rebanho, ocasionando perdas significativas, além de levar a infecções agudas e crônicas,

culminando em alterações hematológicas severas, perda de condição corporal, queda da produtividade e reprodutivos (OZÓRIO et al., 2008, SILVA et al., 2009).

A pecuária leiteira do Maranhão apresenta ótimas condições para a ascensão na cadeia produtiva na bovinocultura, visando a melhoria e o desenvolvimento, trazendo ótimas condições econômicas para Estado, sendo indispensável minimizar os efeitos causados pela doença que acomete os animais de produção. Nesse contexto, é fundamental destacar a sanidade animal, exercendo ótimas condições aos animais, livrando-os de enfermidades que possa interferir e comprometer a lucratividade e reduzir a produtividade.

Com base no estudo, sobre a análise de dados de caráter retrospectivos sobre *Trypanosoma vivax* no Médio Mearim, objetivou-se com esse trabalho verificar a ocorrência de anticorpos de *T. vivax* em bovinos de leite nessa microrregião.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos naturalmente infectados, pertencentes a rebanhos de leite da microrregião do Médio Mearim, Maranhão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a detecção direta (esfregaço sanguíneo) do parasito *T. vivax* e indireta por meio do soro sanguíneo através do iELISA e RIFI em bovinos de leite, naturalmente infectados.
- Comparar os resultados das técnicas iELISA e RIFI com relação a sensibilidade.
- Identificar os principais fatores de risco associados a disseminação e circulação de *Trypanosoma vivax* por meio da anamnese e do hematócrito em diferentes unidades produtoras de leite da Microrregião do Médio Mearim- MA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Trypanosoma vivax*

Zieman (1905) ao descrever o parasito *T. vivax* pela primeira vez, o classificou na secção salivaria, família Trypanosomatidae, incluindo os tripasomatídeos transmitidos pela saliva de moscas que são contaminados pelo parasito, pertencentes a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, espécie *Trypanosoma vivax*, subgênero *Duttonellae* (CARNEIRO, 2010, SOULSBY, 1982).

Seu subgênero *Duttonella* relaciona-se a transmissão do tipo inoculativa, onde a transmissão provém das glândulas salivares dos vetores. Nos vertebrados multiplica-se assexuadamente por fissão binária de forma contínua como tripomastigotas (SILVA et al., 2002), uma das espécies que trazem mais prejuízos aos ruminantes é *Trypanosoma (Duttonella) vivax* (ANDRADE NETO et al., 2019).

T. vivax é um organismo unicelular, eucarioto, achatado, com formato de foice, apresenta núcleo grande e central, cinetoplasto grande, extremidade posterior arredondada e um flagelo livre (CARNEIRO, 2010; HOARE, 1972). Trata-se de um tripomastigotas de *T. vivax*, com núcleo e estruturas bem características e visíveis sendo importante para diagnóstico, facilitando a identificação em esfregaços de sangue periférico (HOARE, 1972), são hemoparasitas mais patogênicos com grande distribuição mundial, sendo presente no continente Africano e na América Central e do Sul (VENTURA et al., 2001).

Relatos registrados de surtos da enfermidade pelo *T. vivax* em diversos estados do Brasil, levando animais a mortes, graves perdas econômicas, desde perda de peso, abortos, problemas reprodutivos, redução da produção de carne e leite e custos com medicamentos, influenciando diretamente a ascensão e expansão da atividade pecuária (PEREIRA et al., 2018).

3.2 TRANSMISSÃO

Na África *T. vivax* encontra-se distribuído em grande extensão, e disseminado pelo vetor, a mosca tsé-tsé que é o principal transmissor, sendo que no Oeste da África, é considerado o mais patogênico e importante tripanosoma de bovinos (BATISTA et al., 2008) além de estar presente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (LEVINE, 1973), expandindo-se para outras áreas como América Central, América do Sul e Caribe (SILVA et al., 2003; VENTURA et al., 2001).

Nas Américas, os vetores mecânicos responsáveis pela via de transmissão são pertencentes às famílias Tabanidae - *Tabanus* sp. e Muscidae - *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans* (OLIVEIRA et al., 2009; CADIOLI et al., 2012), cujas condições climáticas entre os trópicos possuem variações atípicas. No Brasil, em algumas regiões podem ser classificadas como áreas de instabilidade enzoótica, devido ao ambiente desfavorável para o desenvolvimento de vetores durante a maior parte do ano (JUCHEM, 2019).

Frequentes em áreas endêmicas como Pantanal, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, com relatos de ocorrência em todo território brasileiro causando doença severa em ruminantes e equinos nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste (BATISTA et al., 2007), os animais que foram acometidos podem se tornar portadores assintomáticos da doença ou apresentar sinais clínicos, as quais podem ser inespecíficos como alterações hematológicas graves, hipertermia, hiporexia, reduções na produção e óbito (BATISTA et al., 2007).

O compartilhamento de agulhas na aplicação de vacinas e medicamentos é outra via de contaminação (via iatrogênica), de forma a ter o sangue do animal com parasito (GERMANO et al., 2018) e transplacentária (ocasionalmente) (PEREIRA et al., 2018; SILVA et al., 2002; BATISTA et al., 2008).

3.3 CICLO BIOLÓGICO DO *Trypanosoma vivax*

O ciclo biológico envolve dois hospedeiros, sendo considerados parasitas digenéticos, os vetores na América do Sul se distinguem da mosca tsé-tsé por não apresentar habilidade de desenvolvimento cíclico. O animal vertebrado é o hospedeiro definitivo, que geralmente são os mamíferos ungulados (OSÓRIO et al., 2008), enquanto que diversos invertebrados são considerados hospedeiros intermediários (SILVA et al., 2002). Na América Latina os parasitos são transmitidos por hospedeiros invertebrados, através de moscas hematófagas dos gêneros *Tabanus* spp. (mutuca) e *Stomoxys* spp. (mosca dos estábulos), sem que ocorra desenvolvimento cíclico nestes insetos (SILVA et al., 2002; DESQUESNES, 2004).

As formas infectantes (tripomastigotas), ao serem inoculadas nos hospedeiros definitivos através da picada das moscas hematófagas, ganham corrente sanguínea, ocorrendo a multiplicação por divisão binária (GARDINER, 1989; SILVA et al. 2002). O sistema imune em contato ao parasito gera uma resposta imune através de mecanismos de evasão.

Sua membrana possui predominância de proteínas superficiais (VSGs) de caráter antigênico, sofrendo modificações contínuas e “escapando” da ação do sistema imunológico do animal. Esse mecanismo que faz variação contínua de proteínas superficiais vem dos

tripanosomas durante a evolução, sendo um mecanismo adaptativo, protegendo os parasitos da morte mediada pelo complemento e promove escape dos tripanosomas da resposta imune do hospedeiro (BARAL, 2010).

As VSGs sofrem mutações antigênicas que fazem com que o anticorpo ao ter contato com o parasito, seja evitada ou nula em alguns casos, onde são novamente reconhecidas pelo sistema imune, sendo possível haver oscilações de baixa ou alta parasitemia, impedindo a eliminação do *T. vivax*, estabelecendo uma infecção crônica (BARAL, 2010). Vale ressaltar que estes parasitos são capazes de internalizar os anticorpos que se ligaram à sua superfície (HILL et al., 2005).

3.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico definitivo de *T. vivax* podem ser realizados em exames diretos, como técnica microhematócrito (WOO, 1970), técnica *buffy coat* (TBC) (MURRAY, 1977) com confirmação da presença das formas tripomastigotas do parasito em esfregaços sanguíneos, e os exames indiretos como testes sorológicos (ELISA, RIFI), objetivando a observação da presença de títulos de anticorpos anti-*T. vivax* (MADRUGA et al., 2006, AQUINO et al., 2010), ou por meio de técnicas moleculares (PCR) para a detecção de DNA/RNA de *T. vivax* (VENTURA et al., 2001, DESQUESNES e DÁVILA, 2002).

O método de diagnóstico parasitológico é o mais utilizado, onde requer amostras partir de amostras de sangue, linfonodos, líquido, secreções genitais, esfregaço de órgãos, entre outros (DESQUESNES, 2004) para detecção de tripanosomas, sendo o método mais aplicado para identificar *T. vivax* no campo (MADRUGA, 2004; GONZATTI et al., 2014). A sensibilidade desse método é variável, dependendo do estágio clínico da doença, sendo aguda ou crônica. Vale ressaltar que a doença no estágio de cronicidade é de sensibilidade reduzida e que em surtos ocorridos em animais esse método é valioso (DESQUESNES, 2004).

O método parasitológico proposto por Woo (1970), a técnica de microhematócrito (MHCT), é um método de rotina e bastante utilizado, por ser fácil na execução, e observada no próprio microtubo do hematócrito. O exame direto de um material fresco possui baixa sensibilidade, contudo, as vezes não é possível a identificação da espécie do parasita com base na sua morfologia e motilidade (DESQUESNES, 2004). A outra técnica direta, a *Buffy coat* (BCT), apresenta vantagens sobre as outras técnicas convencionais, consistindo em colocar uma camada leucocitária de esfregaço sanguíneo e observado pelo microscópio posteriormente

(MURRAY, 1977; DESQUESNES e TRESSE, 1996; MATTIOLI et al., 2001; DELAFOSSE et al., 2006).

A desvantagem desta metodologia BCT é que as amostras devem ser analisadas rapidamente uma vez que depois de passar das 8 horas da colheita, a quantidade de tripomastigotas detectáveis na amostra se reduz (GÓMEZ-PIÑERES; TAVARES-MARQUES; REYNA-BELLO, 2009). As dificuldades relacionadas a doenças crônicas e assintomáticas em bovinos no Brasil para a detecção do parasito pelos métodos parasitológicos, são encontrar as formas de tripomastigotas que não ficam na circulação sanguínea (VENTURA et al., 2001).

A técnica de centrifugação de hematócrito - TCH (WOO, 1969), é a mais comum dentre os testes parasitológicos empregados (MADRUGA, 2004) por ser rápida e barata e, além disso, permite a observação de animais anêmicos (DESQUESNES, 2004), é também uma das técnicas mais indicadas por apresenta valores significativos maiores que a BCT. É necessário realizar a triagem sorológica e a titulação de anticorpo, a fim de fornecer mais informações, além de avaliar com mais sensibilidade o estado dos rebanhos infectados por *T. vivax* e considerar os efeitos da infecção a saúde animal e produtividade (MATTIOLI et al., 2001).

As técnicas sorológicas mais utilizadas são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (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).

A RIFI é um teste que utiliza o plasma ou o soro do animal suspeito e um anticorpo anti-IgG bovino marcado por fluoresceína é adicionado, e sob luz ultravioleta observa-se a fluorescência nos casos positivos (DESQUESNES, 2004).

A técnica ELISA detecta antígenos de tripanossomos circulantes com o emprego de anticorpos monoclonais (RADOSTITS *et al.*, 2000), sendo capaz de detectar a presença de anticorpos mais precocemente comparado ao RIFI. De acordo com Sampaio (2013) é possível detectar anticorpos de *T. vivax* entre o 5º e o 14º dias. Estudos mostram que a partir do segundo dia da doença pode-se detectar anticorpos por meio da técnica ELISA (FIDELIS JUNIOR, 2014).

O ELISA indireto é utilizado como um dos diagnósticos sorológicos, possuindo especificidade razoável e, sem reações cruzadas com *T. theileri*, porém tem baixa especificidade entre os tripanossomas patogênicos (DESQUESNES e GARDINER, 1993; FERENC et al., 1990), Entretanto, sua sensibilidade é satisfatória (por volta de 90%). Para um único lote de antígeno, a repetibilidade é muito boa, podendo ocorrer variações entre lotes e entre estirpes do parasito (DESQUESNES, 2004).

O método molecular, objetivando a detecção de um segmento de DNA permite realizar um diagnóstico espécie-específico de infecções ativas por *Trypanosoma*, uma vez que após a morte do parasito, a circulação de DNA livre no hospedeiro é de no máximo dois dias (DESQUESNES, 2004), contribuindo para a identificação, caracterização e diagnóstico de diversas espécies de *Trypanosoma* (DESQUESNES e DÁVILA, 2002).

3.5 EPIDEMIOLOGIA

Vários autores em seus trabalhos relatam a disseminação do *T. vivax* surgiu por volta de 1830, atingindo o rebanho de cada países do mundo. No continente africano, a tripanossomíase nos animais é conhecida como “nagana” ou “secadeira”, termo que abrange a infecção por *T. vivax*, *T. congolense* e *T. brucei brucei* (GARDINER, 1989).

Estudos realizados no Brasil mostraram que a presença da tripanossomíase bovina já é presente nas regiões Sul (SILVA et al., 2009), Sudeste (CARVALHO et al., 2008; CUGLOVICI et al., 2010; CADIOLI et al., 2012), Centro-oeste (SILVA et al., 1999; SILVA et al., 2004), Nordeste (BATISTA et al., 2008; PIMENTEL et al., 2012) e Norte (LINHARES et al., 2006).

No Brasil, os primeiros surtos da doença ocorreram no estado do Pará em ruminantes (BOULHOSA, 1946; SHAW & LAINSON, 1972) e, desde então, vários outros foram relatados no país, como no Mato Grosso (SILVA et al., 1996), Amapá e Rio de Janeiro (MADRUGA et al., 2006), Tocantins (LINHARES et al., 2006), Paraíba (BATISTA et al., 2007), Santa Catarina (SILVA et al., 2007), Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008), Maranhão (GUERRA et al., 2008), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009), São Paulo (CADIOLI et al., 2012), Goiás (BASTOS et al., 2017), Sergipe (VIEIRA et al., 2017), Pernambuco e Alagoas (ANDRADE NETO et al. 2019).

Esse hemoparasito acomete principalmente ungulados, incluindo bovinos (mais patogênico nessa espécie), ovinos, caprinos, equinos, camelos várias espécies de antílopes selvagens e búfalo africano (GUERRA et al., 2013). E os animais que apresentam resistência são porcos, cães, gatos e animais de laboratório, entretanto, é possível adaptar artificialmente cepas de *T. vivax* em roedores de laboratório (GARDINER, 1989).

A doença apresenta alta morbidade e mortalidade com sintomatologia, surto ocorrido no semiárido brasileiro, em 130 vacas de uma propriedade, 64 (49.2%) tiveram manifestações clínicas e 11 (8.4%) vieram a óbito (BATISTA et al., 2007). Contudo, algumas raças de ruminantes domésticos são relativamente resistentes a infecção de *T. vivax* apresentando

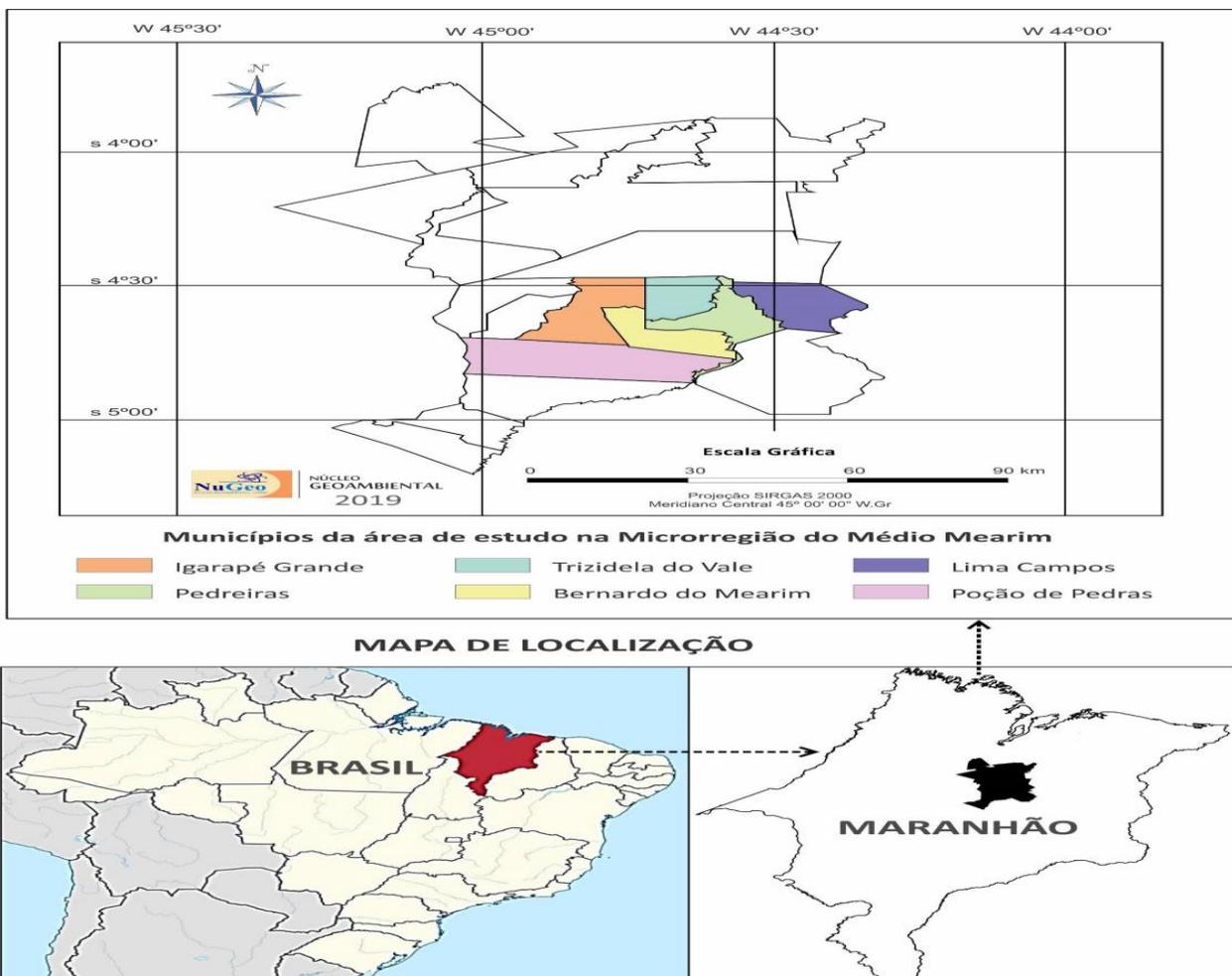
resistência natural e podendo permanecer na condição de portadores assintomáticos (MATTIOLI; WILSON, 1996). Estudo retrospectivo realizados por Garcia et al. (2016) constatou que a presença da tripanosomíase ocorrerem mais em fêmeas do que em machos, bem como, em raças leiteiras, fato explicado devido esses animais terem maior contato agulhas compartilhadas antes da ordenha.

4 METODOLOGIA

4.1 ÁREA EXPERIMENTAL E ANIMAIS

O estudo foi realizado em seis municípios da Microrregião do Médio Mearim no Estado Maranhão, que compreendem: Lima Campos (coordenadas geográficas: Latitude: 4° 31' 14" Sul, Longitude: 44° 28' 2" Oeste), Pedreiras (coordenadas geográficas: Latitude: 4° 34' 28" Sul, Longitude: 44° 35' 55" Oeste), Trizidela do Vale (coordenadas geográficas: Latitude: 4° 34' 0" Sul, Longitude: 44° 37' 37" Oeste), Poção de Pedras (coordenadas geográficas: Latitude: 4° 43' 55" Sul, Longitude: 44° 53' 18" Oeste), Bernardo do Mearim (coordenadas geográficas: Latitude: 4° 36' 22" Sul, Longitude: 44° 46' 29" Oeste) e Igarapé Grande (coordenadas geográficas: Latitude: 4° 33' 19" Sul, Longitude: 44° 51' 14" Oeste)(Figura 1).

Figura 1 - Imagem representativa dos municípios estudados da Microrregião Médio Mearim.



Fonte: Núcleo Geoambiental -2019

Como não existe determinação de prevalência de *T. vivax* em nosso estado, foi pressuposto uma prevalência esperada de 50%, conforme Stevenson, 2005. O tamanho da amostra foi determinada por meio do método de amostragem aleatória sistemática, onde o número mínimo de animais terá precisão absoluta de 5% e intervalo de confiança de 95%, como indicado pela fórmula abaixo:

$$n = \frac{z^2 (1 - P_y) \times P_y}{d^2}$$

Onde:

z = coeficiente de confiança ($z = 1,96$); n = tamanho da amostra; P_y = prevalência esperada (50%); d^2 = precisão absoluta desejada (5%);

O projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA) com o protocolo de Nº 017/2019 na data de 25/06/2019 do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

4.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Foram colhidas duas amostras de sangue de bovinos de leite da raça girolando, diretamente da veia jugular ou caudal. A primeira amostra foi colhida em tubos Vacutainer® com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para dosagem do volume globular e identificação de *T. vivax* por meio de esfregaços sanguíneos corados com panóptico rápido. A segunda amostra foi colhida utilizando tubos sem anticoagulante EDTA, para a obtenção de soro, essas foram centrifugadas por 10 minutos a 1500rpm. As amostras de soro obtidas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -20°C e posteriormente utilizadas para testes sorológicos, Ensaio Imunossorbente Ligado à Enzima Indireto (iELISA) e Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Os animais escolhidos para amostragem foram bovinos nascidos e criados nos municípios de Lima Campos, Pedreiras, Trizidela do Vale, Poção de Pedras, Bernardo do Mearim e, Igarapé Grande, pertencentes à Microrregião do Médio Mearim. Foram amostrados aleatoriamente vacas e bezerros de 06 (seis) diferentes propriedades, entre elas, totalizando 130 vacas (>6 anos) e 105 bezerros (7-12 meses) somando um total de 235 animais.

4.3 VOLUME GLOBULAR

O volume globular (VG) das amostras sanguíneas dos animais dos municípios propostos foi determinado pela técnica de microhematócrito. Amostras com anticoagulante foram utilizadas para análises parasitológicas e hematológicas. A análise hematológica foi realizada como descrito por Jain (1993).

4.4 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE *Trypanosoma vivax*

A determinação da contagem de *T. vivax* foi realizada pela leitura de campo homogêneo em esfregaços de sangue obtidos das amostras de sangue e foram coradas com panóptico rápido, em busca de *T. vivax* pela observação direta em microscopia óptica de acordo com Silva et al. (2002).

4.5 ENSAIO IMUNOSORBENTE ENZIMÁTICO LIGADO À ENZIMA INDIRETO (IELISA)

O ELISA foi realizado conforme descrito por Machado et al. (1997) e Aquino et al. (1999), com pequenas modificações, como descrito a seguir. Cada poço de microplaca (Nunc MaxiSorp®, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) foi revestido com 100 µL de antígeno solúvel de *T. vivax* em uma concentração de 0,1 µg / mL. Todas as amostras e controles foram diluídos a 1:50 em solução salina tamponada com fosfato com Tween-20 ([PBST]: 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5,6 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 0,92 mM NaH₂PO₄ e 0,05% Tween 20). Todos os soros foram testados em duplicata. A reação foi lida por um leitor de microplacas (MRX TC Plus, Dynex Technology, EUA) a 405 nm. O poço em branco não conteve soro.

Para definir o ponto de corte entre as placas, dois controles negativos e um controle positivo foram utilizados em todas as placas testadas. Os controles negativos foram de dois bovinos de um rebanho localizado em uma região não endêmica de *T. vivax* e previamente testadas com testes moleculares (PCR e LAMP) e sorológico (ELISA). O controle positivo foi de um bovino infectado experimentalmente com o isolado de *T. vivax* "Lins" (FIDELIS JUNIOR et al., 2016). A média e o desvio padrão (DP) da DO dos controles negativos de todas as placas foram então obtidos e o ponto de corte será calculado de acordo com a seguinte equação, descrita por Madruga et al. (2006):

$$\text{Ponto de corte} = \text{média de controles negativos} + (3 \times \text{controles negativos DP}).$$

4.6 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

As lâminas do RIFI foram preparadas e sensibilizadas com amostras de sangue de cabras inoculadas experimentalmente com *Trypanosoma vivax*, cepa “Lins” (CADIOLI et al., 2012), obtendo-se o antígeno segundo González et al. (2005). As amostras de soro foram diluídas 1:80 em solução salina tamponada com PBS a 1%, pH 7,2 (NaCl 1,3 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 56 mM, KH₂PO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 9,2 mM) seguindo a metodologia recomendada por Aquino et al. (1999).

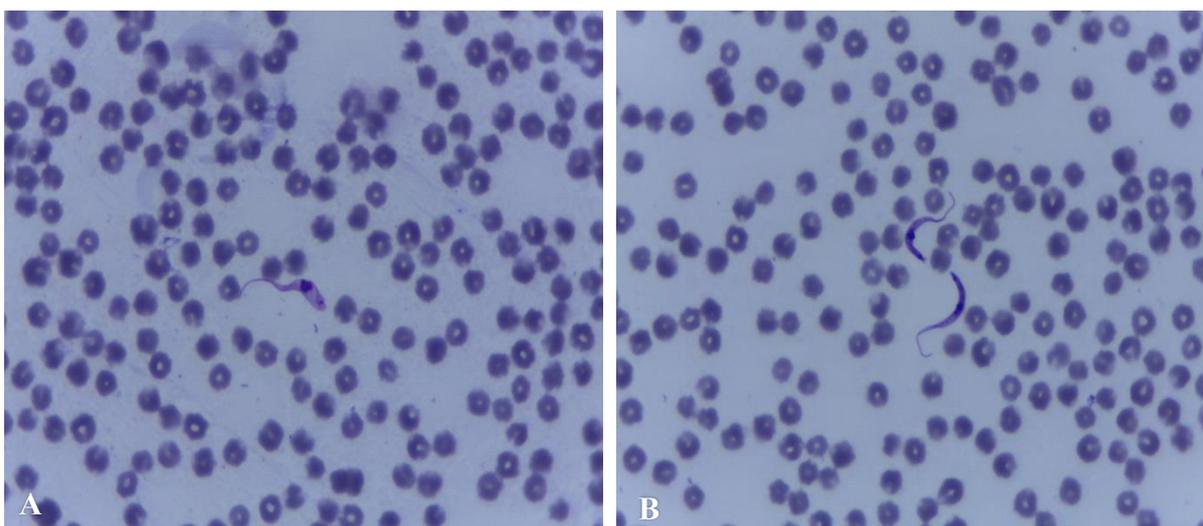
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram processados e analisados utilizando-se Análise descritiva simples, utilizando o programa Excel.

5 RESULTADO E DISCUSSÕES

Resultados hemoparasitológico das amostras de sangue examinadas pelo esfregaço sanguíneo dos bovinos provenientes das propriedades dos seis municípios do Médio Mearim, mostrou um animal positivo de *Trypanosoma vivax* na propriedade do município de Porção de Pedras (figura 2).

Figura 2 - Identificação parasitológica pela técnica de esfregaço sanguíneo com coloração panótico rápido.



Fonte: PEREIRA, José Gomes (2020).

De acordo com Radostits et al. (2002) a observação direta por esfregaço sanguíneo deve ser realizada no estágio inicial da doença, onde o pico de parasitemia corresponde ao pico febril, sendo possível visualizar o agente etiológico.

Foi possível determinar pela técnica de microhematócrito o percentual dos animais anêmicos de acordo com a análise de Jain (1993), observando-se uma variância de 15% a 65% nas amostras analisadas, dentre as quais 6,38% (15/235) apresentaram resultados inferiores a 24% e 93,61% (220/235) entre ou acima de 24% e 46%, sendo categorizados como anêmicos e não anêmicos, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados percentuais de anemia pela técnica de microhematócrito dos bovinos da microrregião do Médio Mearim.

Variância	Valores de referência	N=235	%
Anêmicos	Inferior a 24%	15	6,38%
Não anêmicos	Entre ou superior a 24 - 46%	220	93,61%

No que diz respeito ao grau de anemia dos animais, vários estudos com animais anêmicos por *T. vivax* corroboram com os resultados obtidos nesta pesquisa, relatando as alterações hematológica como a mais frequentemente, apresentando alterações nas mucosas (estado de hipocoradas), além de apresentarem sinais de anemia (CARVALHO et al., 2008; LOPES et al. 2018; SILVA et al., 2009; SILVA et al., 1999; SCHENK et al., 2001). A anemia também é relatada com um dos principais achados da tripanossomíase (LOPES et al., 2018).

As análises das 235 amostras de soro dos animais avaliados, demonstraram pela RIFI, 12,77 % (30/235) positivas e 87,23% (205/235) negativas. Métodos de diagnósticos como a RIFI podem comprovar se os animais que se mostraram negativos nos exames parasitológicos são também negativos pela Reação de imunofluorescência indireta (GERMANO et al., 2018). Na fase crônica da doença, técnicas parasitológicas demonstram baixa sensibilidade, devido à baixa parasitemia, sendo a RIFI importante para a complementação dos exames parasitológicos, também é importante a associação de ambas as técnicas (FRANGE, 2013).

Ao realizarmos as análises individuais por município pela RIFI, dos 30 animais positivos, corresponderam em Lima Campos 20,00% (6/30), Pedreiras 16,67 % (5/30), Trizidela do Vale 6,67% (2/30), Poção de Pedras 10,00% (3/30), Bernardo do Mearim 23,33% (7/30) e Igarapé Grande 23,33% (7/30) (tabela 2).

Os resultados por iELISA demonstraram que 8,09% (19/235) foram soropositivas e 91,91% (216/235) soronegativas. Nossos resultados assemelham-se as propriedades visitadas no Estado de Goiás, nos quais alguns municípios apresentaram valores de prevalência entre 1% a 10%, com animais da raça Girolando, estudo de Bastos et al. (2019). Os valores do iELISA neste estudo demonstrou um índice relativamente baixo, quando comparado com os estudos de Andrade Neto et al. (2019) os quais trabalharam com 109 amostras de soro de bovinos nos estados de Pernambuco e Alagoas e encontraram o percentual de 94% (103/109) utilizando a mesma técnica. Também Cadioli et al. (2012) relataram alto títulos de anticorpos IgG de *T. vivax* no estado de São Paulo ao analisar 1080 animais obtendo uma taxa de 98,36% (599) positivas utilizando a técnica ELISA.

As análises realizadas pela técnica iELISA por município na microrregião. Dos 19 animais soropositivos, em Lima Campos corresponderam 5,26% (1/19), de positividade, Pedreiras 21,05% (4/19), Trizidela do Vale 26,32% (5/19), Poção de Pedras 10,53% (2/19), Bernardo do Mearim 15,79% (3/19) e Igarapé Grande 21,05% (4/19) (tabela 2).

Em nosso trabalho, resposta ao teste iELISA, mesmo com apenas uma identificação do *T. vivax* nas amostras de sangue dos animais, observou-se a identificação de anticorpos do parasito demonstrando a alta sensibilidade da técnica. Fidelis Junior (2014) em um estudo realizado com a técnica sorológica iELISA nas amostras de soro de animais infectados naturalmente e experimentalmente detectou alto títulos de anticorpos após o primeiro dia da parasitemia e que estes persistiram elevados mesmo sem a presença do parasito em esfregaço sanguíneo.

Tabela 2 - Distribuição de animais soropositivos por ELISA indireto e RIFI por municípios do Médio Mearim, Estado do Maranhão.

Municípios	Amostras Testadas	RIFI		ELISA	
		Amostras reagentes	%	Amostras reagentes	%
Lima Campos	60	6	20,00%	1	5,26%
Pedreiras	50	5	16,67%	4	21,05%
Trizidela do Vale	30	2	6,67%	5	26,32%
Poção de Pedra	30	3	10,00%	2	10,53%
Bernardo do Mearim	35	7	23,33%	3	15,79%
Igarapé Grande	30	7	23,33%	4	21,05%
Total	235	30	100,00%	19	100,00%

Nesta pesquisa, é possível observar que quando comparamos os resultados da RIFI com iELISA obtivemos maiores resultados pela técnica da RIFI. Embora alguns estudos demonstre que a RIFI é de maior sensibilidade estudos de Andrade Neto et al. (2019) das 109 amostras utilizadas, 94% (103/109) foram soropositivas no ELISA e 92% (100/109) foram soropositivas para RIFI. Nossos resultados concordam com os de Fidelis Junior et al. (2019) que ao avaliarem 54 amostras no estado de São Paulo utilizando técnicas sorológicas RIFI e ELISA obtiveram respectivamente 94,4 % de positividade e 90,7 % positivos. Resultados semelhantes também foram encontrados nos estudos de Fidelis Junior (2014).

Os animais deste estudo foram amostrados por categorias de idade, nas quais os animais adultos estavam com uma baixa carga parasitária, sendo sugestivo de se encontrarem na fase crônica da enfermidade.

A análise da detecção de acordo com a faixa etária, classificado em dois grupos (Tabela 3): > 6 anos e 7 – 12 meses de idade; observou-se valores percentuais e amostras soropositivas distintos, onde o teste de RIFI revelou 15,38% (20/130) e 9,52% (10/105) foram positivos, respectivamente. O diagnóstico sorológico indireto ELISA mostrou valores percentuais

diferentes, 6,15% (8/130) para as vacas e 7,62% (8/105) para bezerros, como resultados positivos.

Tabela 3 - Distribuição de ocorrência de RIFI e iELISA relacionado a idade dos animais da microrregião do Médio Mearim.

Variância	Idade	RIFI		iELISA	
		N	%	n	%
Vacas (N= 130)	(>6 anos)	20	15,38%	8	6,15%
Bezerros (N = 105)	(7-12 meses)	10	9,52%	8	7,62%

Ao procedermos a anamnese verificou-se a presença maciça de insetos hematófagos nos animais das propriedades, os proprietários relataram o uso de medicamentos à base de piretroides utilizados como inseticida e acaricida.

A presença de moscas hematófagas e o uso indiscriminado de medicamentos a base de piretroides no estudo podem atuarem como um fator de riscos para a ocorrência da tripanossomose em bovinos nas propriedades da região, além de elevar os gastos na redução dos vetores, a fim de combater-los. Segundo Batista et al. (2007), dentre os fatores que agravam a ocorrência da enfermidade, incluem os vetores mecânicos, tabanídeos (mutucas) e *Stomoxys* sp. (mosca-dos-estábulos), as quais fazem o papel de disseminador na América do Sul, além de haver a forma de transmissão iatrogênica pelo compartilhamento de agulhas e aplicação de medicamentos no momento da ordenha, na aplicação de ocitocina em bovinos leiteiros (CARVALHO et al., 2008). As estratégias para o combate das moscas hematófagas são necessárias, vale ressaltar que devem ser realizado o controle de moscas na propriedade, principalmente nas estações chuvosas, quando a população de dípteros hematófagos é maior (GONÇALVES, 2000).

6 CONCLUSÃO

O estudo relatou que na microrregião Médio Mearim no estado do Maranhão, possui animais reagentes para *Trypanosoma vivax*, associados às altas infestações de moscas hematófagas e outros vetores foram determinantes para a transmissão do agente etiológico, levando os animais a apresentarem anemia, trazendo consequentes perdas de produção e produtividade leiteira e causando prejuízos aos produtores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABIEC. BEEF REPORT 2021. **Perfil da Pecuária no Brasil**. Disponível em:< <http://abiec.com.br/> > Acesso em: 15 de fev de 2021.
- ANDRADE NETO, A.Q.; MENDONÇA, C.L.; SOUTO, R.J.C.; SAMPAIO, P.H.; FIDELIS JUNIOR, O.L.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z.; AFONSO, J.A.B. Diagnostic, Clinical and Epidemiological aspects of dairy cows naturally infected by *Trypanosoma vivax* in the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, 2019. e094319. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm094319>
- 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.
- AQUINO, L. P.; MACHADO, R. Z.; ALESSI, A. C.; MARQUES, L. C.; CASTRO, M. B.; MALHEIROS, E. B. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 255-260, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000200025>. PMID:10224539.
- BARAL, T. N. Immunobiology of African Trypanosomes: Need of alternative interventions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, artigo n.389153, p.24, 2010.
- BASTOS, T. S. A.; FARIA, A. M.; MADRID, D. M. C.; BESSA, L. C.; LINHARES, G. F. C.; FIDELIS JUNIOR, O. L.; SAMPAIO, P. H.; CRUZ, B. C.; CRUVINEL, L. B.; NICARETTA, J. E.; MACHADO, R. Z.; COSTA, A. J.; LOPES, W. D. Z. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 26, n.3, p. 366-371, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612017019>. PMID:28678894
- 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, p. 63-69, 2008.
- BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M.M.G.; MADRUGA, C.R.; SIMÕES, D.V.; MAIA, T.F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid:

description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.2, p.174-81, 2007.

BOULHOSA, J. Informação Científica (Boletim Técnico). Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**. pp. 21-26, 1946.

CADIOLI F.A., BARNABÉ P.A., MACHADO R.Z., TEIXEIRA M.C.A., ANDRÉ M.R., SAMPAIO P.H., FIDÉLIS JUNIOR O.L., TEIXEIRA M.M.G. & MARQUES L.C. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Revta Bras. Parasitol. Vet.** v.21, p.118-124, 2012.

CARNEIRO, M.E. Protozoários flagelados. In: MONTEIRO, S.G. Parasitologia na Medicina Veterinária. São Paulo: **Roca**, Cap. 14, p. 131-140, 2010.

CARVALHO, A. U.; ABRÃO, D. C.; FACURY FILHO, E. J.; PAES, P. R. O.; & RIBEIRO, M. F. B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n. 3, p. 769-771, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352008000300037>.

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.

DELAFOSSÉ, A.; THÉBAUD, E.; DESQUESNES, M. et al. Epidemiology of *Trypanosoma vivax* infection in cattle in tse-tse free area of Lake Chad. **Prev. Vet. Med.**, v. 74, p. 108-119, 2006.

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

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.; GARDINER, P.R. Épidémiologie de la trypanosomose bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyane Française. **Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v. 46, p. 463-470, 1993.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité du test de WOO pour la détection de *Trypanosoma vivax*. **Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v. 49, p. 315-321, 1996.

EMBRAPA. Anuário leite 2019. Sua excelência o consumidor. **Disponível em: Edição Digital em embrapa.br/gado-de-leite**. Acesso em 16 de fev de 2021.

EMBRAPA. Anuário leite 2020. Leite de vacas felizes. **Disponível em: Edição Digital em embrapa.br/gado-de-leite**. Acesso em 16 de fev de 2021.

FERENC, S.A.; STOPINSK, V.; COURTENEY, C.H. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey in the eastern Caribbean basin. **Int. J. Parasitol.**, v. 20, p. 51-56, 1990.

FIDELIS JUNIOR, L. O. **Patogenicidade do isolado “lins” de *Trypanosoma vivax* em bovinos natural e experimentalmente infectados**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, 2014.

FIDELIS JUNIOR, O. L.; SAMPAIO, P. H.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; MARQUES, L. C.; CADIOLI, F. A. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Braz J Vet Parasitol**, v. 25, n. 1, p. 69-81, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016013>

FIDELIS JUNIOR, O. L.; SAMPAIO, P. H.; GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z.; WIJFFELS, G.; & CADIOLI, F. A. Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.28, n.2, p.203-209, 2019.

FRANGE, R.C.C. Tripanossomíase em vacas na microrregião de Uberaba – MG: estudo soroepidemiológico e relato de surto. 2013. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos) – Universidade de Uberaba, Uberaba – MG.

GARCIA, G. C.; MOURA, D. M.; FRANGE, R. C. C.; BITTAR, E. R.; BITTAR, J. F. F. Bovine Trypanosomiasis: Retrospective investigation and Clinical Signs. **Epidemiology Open Journal**, v.1, n.1, p.16-19. 2016.

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

GERMANO, P. H. V.; DA SILVA, A. A.; EDLER, G. E. C.; LOPES, M. C.; MODESTO, T. C.; DOS REIS, J. A.. Tripanossomose bovina: revisão. **PUBVET**, v. 12, p. 133, 2018. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v12n8a144.1-6>

- GIORDANI, F.; MORRISON, L. J.; ROWAN, T. G.; KONING, H. P.; BARRETT, MICHAEL P. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology**, Cambridge, v. 143, n. 14, p. 1862-1889, 2016. Doi: 10.1017/S0031182016001268
- GÓMEZ-PIÑERES, E.; TAVARES-MARQUES, L.; REYNA-BELLO, A. Tiempo de supervivencia in vivo y criopreservación de *Trypanosoma vivax*. **Revista Científica, FCV-Luz**, v.19, n.3, p.225 – 229. 2009.
- GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 187-194, 2000.
- GONZÁLEZ, L. E.; GARCÍA, J. A.; NÚÑEZ, C.; PERRONE, T. M.; GONZÁLEZ-BARADAT, B.; GONZATTI, M. I.; & REYNA-BELLO, A.. *Trypanosoma vivax*: a novel method for purification from experimentally infected sheep blood. **Experimental Parasitology**, v.111, n.2, p.126-129, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2005.05.008>. PMID:16023641.
- GONZATTI, M.I.; GONZÁLEZ-BARADAT, B.; ASO, P.M. et al. *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In: MAGEZ, S.; RADWANSKA, M. Trypanosomes and Trypanosomiasis. Springer-Verlag Wien, London, 2014.
- GUERRA, N.R.; MONTEIRO, M.F.M.; SANDES, H.M.M. et al. Detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de Imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1423–1426, 2013.
- GUERRA, R.M.S.N.C.; FEITOSA JÚNIOR, A.B.; SANTOS, H.P. et al. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, p. 833-835, 2008.
- 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 trypanosomes of mammals: a zoological monograph. **Oxford: Blackwell Scientific Publications**, 1972.
- JAIN, N. C. Essentials of Veterinary Hematology.. Philadelphia: **Lea & Febiger**, 1. ed., p. 417, 1993.

JUCHEM, P. **Tripanossomíase bovina**. 2019. Monografia – Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019/1. Disponível em: < <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/199507>> Acesso em: 16 de fev de 2021.

LEVINE, N.D. Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. 2nd ed. **Burgess Publ. Co.**, Minneapolis. p.406, 1973.

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

LOPES, S T P; PRADO, B.S.; MARTINS, G. H. C.; BESERRA, H. E. A.; SOUSA FILHO, M. A. C. DE; EVANGELISTA, L. S. DE M.; CARDOSO, J. F. S.; MINEIRO, A L B B; & SOUZA, J. A. T. *Trypanosoma vivax* em bovino leiteiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, V.46, (Suppl 1), p.287,2018.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R. F.; VALADÃO, I. F. F.; et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Vet Parasitol.**; v.71, n. 1, p. 17-26, 1997. DOI: 10.1016/s0304-4017(97)00003-4

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; CARVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER, I. B.; RIBEIRO, L. R.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MIGUITA, M.; MELO, E. P. S.; ALMEIDA, R. F. C.; & LIMA JUNIOR, M. S. C. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.7, p.801-807, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000700016>. PMID:17160291.

MADRUGA, C.R. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanosoma (Duttonella) vivax* no Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, Suppl. 1, p. 46-47, 2004.

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.

MATTIOLI, R. C.; WILSON, R. T. Trypanosomes, tsetse and trypanotolerance: coevolution in Tropical Africa. **Parassitologia**, v. 38, p. 531-535. 1996

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MAPA. **Exportação.** **2020.** Disponível em: <
http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons!/ap_abate_estaduais_cons?p_select=SIM&p_ano=2020&p_id_especie=9> Acesso em: 15 de fev de 2021.

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.

OLIVEIRA, J. B.; HERNANDEZ-GAMBOA, J.; JIMENEZ-ALFARO, C.; ZELEDON, R., BLANDON, M.; URBINA, A.). First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n.1-2, p. 136-139, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.051>. PMID:19414224.

OSÓRIO, A. L. A. R.; MADRUGA, C. R.; DESQUESNES, M.; SOARES, C. O.; RIBEIRO, L. R. R.; COSTA, C. G. *Trypanosoma (Dutonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World- A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 1-13, 2008.

PEREIRA, H. D.; SIMÕES, S. V.; SOUZA, F. A.; SILVEIRA, J. A.; RIBEIRO, M. F.; CADIOLI, F. A.; SAMPAIO, P. H. Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 896-901, 2018.

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.

RADOSTITS O.M.; GAY C.C.; BLOOD D.C.; & HINCHCLIFF K.W. Clínica Veterinária. 9ª ed. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p.1194-1200, 2002.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000.

SAMPAIO, P. H. **Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados pelo *Trypanosoma vivax***. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em

Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

SCHENK, M. A.; 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.

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

SILVA R.A.M.S., SANCHEZ V. & DÁVILA A.M.R.. Métodos de Diagnósticos Parasitológicos das Tripanosomoses Bovinas e Equinas. Circ. Téc. 41, **Embrapa Pantanal**, Corumbá, MS. P.3, 2003.

SILVA, A. S. DA; OLIVEIRA, C. B.; ZANETTE, R. A.; SOARES, C. D. M.; CORADINI, G.; POLENZ, C. H.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira – SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 373-376, 2007. DOI: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.16133>

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

SILVA, R. A. M. S., SEIDL, A., RAMIREZ, L., & DÁVILA, R. M. A. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. **Corumbá: Embrapa Pantanal**, p. 141, 2002.

SILVA, R. A. M. S.; RAMIREZ, L.; SOUZA, S. S.; ORTIZ, A. G.; PEREIRA, S. R.; DÁVILA, A. M. R. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.87–93. 1999.

SILVA, R. A., SILVA, J. A., SCHNEIDER, R. C., FREITAS, J., MESQUITA, D., MESQUITA, T., RAMIREZ, L., RIVERA DÁVILA, A. M., & PEREIRA, M. E. . Outbreak of Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann,1905) in bovines of the Pantanal, Brasil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 5, p. 561-562, 1996.

SILVA, R.A.M.S.; PELLEGRIN, A.O.; RAMIREZ, E.S.S.L.L.; DÁVILA, A.M.R. Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia. Documentos 75, **Embrapa Pantana**, v.1, p.30, 2004.

SOULSBY, E.J.L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7 ed. London: **Baillière Tindall**, p. 809, 1982.

STEVENSON, M. An Int. Vet. Epid. Palmerston North, IVABS Massey University, **EpiCentre**, p.109, 2005.

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 for a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic space sequence. **Exptl Parasitol**. v.99, p.37-48, 2001.

VIEIRA, O. L. E.; MACEDO, L. O.; SANTOS, M. A. B.; SILVA, J. A. B. A.; MENDONÇA, C. L.; FAUSTINO, M. A. D. G.; RAMOS, C. A. D. N.; ALVES, L. C.; RAMOS, R. A. N.; CARVALHO, G. A. Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 26, n. 4, p. 516-520, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612017048>. PMID:29091120.

WOO, P. T. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 384-6, 1970.

WOO, P.T.K. The haematocrit centrifuge for detection of trypanosomes in blood. **Can. J. Zool.**, v.47, p. 921-923, 1969.

ZIEMANN, H. B. zur Trypanosomenfrage. **Cbl. Bakt (I. Abt.)**, v.38, p. 307-429, 1905.