



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

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

ALINE GUEDES ALVES

**DIAGNÓSTICO DE *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi* EM AMOSTRAS DE
SANGUE DE JUMENTOS (*Equus asinus*) E BURROS (*Equus asinus* x *Equus caballus*) NA
ILHA DE SÃO LUÍS, MARANHÃO.**

São Luís – MA

2021

ALINE GUEDES ALVES

DIAGNÓSTICO DE *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi* EM AMOSTRAS DE SANGUE DE JUMENTOS (*Equus asinus*) E BURROS (*Equus asinus* x *Equus caballus*) NA ILHA DE SÃO LUÍS, MARANHÃO.

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

Orientadora: Profa Dra. Maria do Socorro Costa Oliveira

São Luís - MA
2021

Alves, Aline Guedes.

Diagnóstico de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi* em amostras de sangues de jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus asinus* x *Equus caballus*) na ilha de São Luís, Maranhão / Alinhe Guedes Alves. – São Luís, 2021.

...45 f.

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

Orientador: Profa. Dra. Maria do Socorro Costa Oliveira.

1.*Trypanosoma evansi*. 2.*Trypanosoma vivax*. 3.*Equus asinus*. 4.*Equus caballus*.
5.Maranhão. I.Título.

CDU: 636.182/.183:616.993.1(812.1)

ALINE GUEDES ALVES

DIAGNÓSTICO DE *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi* EM AMOSTRAS DE SANGUE DE JUMENTOS (*Equus asinus*) E BURROS (*Equus asinus* x *Equus caballus*) NA ILHA DE SÃO LUÍS, MARANHÃO.

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

Aprovada em: 28/07/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Do Socorro Costa Oliveira

Doutora em Medicina Veterinária

Universidade Estadual do Maranhão

Profa. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos - 1º Examinadora

Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia

Universidade Estadual do Maranhão

Silvio Sérgio Saraiva Santos - 2º Examinador

Médico Veterinário

Universidade Estadual do Maranhão

DEDICO

Primeiramente, à minha família. Meus pais, Solange Guedes e Gutemberg Alves que sempre acreditaram em mim incondicionalmente. Aos meus tios paternos, Inaldo Alves e José de Ribamar, que contribuíram muito nessa caminhada. Aos meus tios maternos, Claudia, Carlos, Alexandra e Hamilton, que estiveram a todo momento na torcida ao longo dessa jornada. Aos meus avós paternos, Margarida (*in memorium*) e Leonardo, aos meus avós maternos Estevina (*in memorium*) e Antônio (*in memorium*) que sempre me repassaram ensinamentos de vida, que são bases da minha educação e caráter. A todos os meus amigos de graduação, em especial (às minhas pessoas, mais que amigos) Débora Duarte e João Vitor, que além de me apoiarem emocionalmente, estiveram comigo em todos os momentos difíceis da graduação. Dedico à minhas professoras, Maria do Socorro e Larissa Sarmiento por todos ensinamentos e apoio e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado o dom da vida, por ser fonte de energia vital em diversos momentos bons e ruins de minha caminhada. Por sempre me acompanhar e me dar sabedoria para encarar os problemas da vida.

Aos meus pais, sem eles com certeza eu não seria ninguém. Agradeço por todo apoio não só ao longo da graduação, mas ao longo da vida. Por sempre me levantarem quando pensei em desistir, por acreditarem mais em mim do que eu mesma. E por me amarem incondicionalmente. Sou grata por tudo.

À minha família paterna, meu avô e meus tios que sempre acompanharam meu crescimento pessoal e acreditaram nos meus sonhos. À minha família materna, meus tios, tias, primos e avós (*In memorium*), que sempre me incentivaram e torceram pela realização dos meus objetivos de vida.

Especialmente, agradeço à minha avó materna (*In memorium*), que esteve presente na maior parte desse caminho. Ausente no fim. Sou grata pelos olhares profundos de aprovação e pelas simples e sinceras palavras de incentivo que recebi por todo o tempo de vida em que estivemos juntas.

À minha madrinha, Maria Duarte que sempre viveu os meus sonhos e me colocou em suas orações. Pelo amor e cuidado que sempre teve comigo. E pelos ensinamentos que constituem meu caráter.

À Maria Antônia, uma pessoa que sempre me ajudou em diversos momentos difíceis. Por todo carinho e amor, agradeço. Além de todo incentivo que sempre me deu.

Aos meus amigos e colegas que fizeram parte de momentos únicos ao longo dessa trajetória.

À minha amiga Débora Duarte, por ser uma pessoa que transborda amor em minha vida. Além de amiga, irmã. À João Vitor, por ser uma pessoa incrível durante essa jornada. Por ter me dado apoio e suporte necessário para prosseguir. Aos meus amigos Maurício Sousa e Wendell Medeiros, por serem pessoas maravilhosas que tive a honra de conhecer durante a graduação.

Às minhas amigas Jady Lima e Roberta Castro que acompanharam e torceram por mim nessa caminhada. Todos ficarão marcados em minha vida.

Às minhas amigas de infância, Juliana Mousinho, Fernanda Daphiny, Débora Cristina, Ana Geila, Ana Elisabete, Ana Paula e Carla. Que me acompanharam em diversos momentos da vida, e me fortaleceram e incentivaram nessa etapa.

À minha orientadora professora Maria do Socorro, por confiar, acreditar e além disso, compartilhar ensinamentos. Por ter me dado a oportunidade de adquirir novos conhecimentos em projetos de iniciação científica, e pela orientação ao longo da vida acadêmica, bem como início da vida profissional.

Meus mais sinceros agradecimentos a professora Larissa Sarmiento, pela ajuda neste trabalho. E principalmente pelas palavras de incentivo ao longo da graduação.

Aos doutores e pesquisadores, Dra. Rosangela Zacarias Machado e Marcos Rogério André da Universidade Estadual Paulista - UNESP/Jaboticabal, pela contribuição em projetos, que acrescentaram conhecimentos ímpares em minha carreira profissional.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que acrescentaram de algum modo em mais essa etapa da minha vida. Sou imensamente grata por cada palavra de apoio e gestos de cuidado e carinho em alguns momentos difíceis.

“Somos quem podemos ser, sonhos que podemos ter”
(Engenheiros do Hawaii)

RESUMO

Tripanossomíase é uma doença causada por um grupo de protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma* spp., que possui larga distribuição e importância econômica mundial. A doença é caracterizada pelo aparecimento intermitente de parasitos no sangue dos indivíduos infectados e anemia. Os animais afetados apresentam redução de peso e diminuição da produtividade. No Brasil, pouco se sabe a respeito da epidemiologia de *Trypanosoma evansi* e *T. vivax* em *Equus asinus* tornando escassos os estudos acerca da avaliação sorológica e molecular do protozoário nesses animais da ilha de São Luís. O objetivo desta pesquisa foi verificar a ocorrência de agentes causadores de tripanossomíase em uma população de jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus caballus*) da ilha de São Luís do Maranhão por meio de detecção direta, com esfregaços sanguíneos e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O trabalho foi executado nos municípios da Região Metropolitana de São Luís (São Luís, Raposa, Paço do Lumiar e São José de Ribamar). Foram amostrados aleatoriamente jumentos e burros dos quatro municípios, totalizando 100 animais. Os resultados obtidos desta pesquisa serviram como base para ampliação dos conhecimentos científicos e epidemiológico das tripanossomíases pertencentes a Região Metropolitana de São Luís, Maranhão. A pesquisa contribuiu para outros estudos acerca de tripanossomíases em *Equus asinus* e *Equus caballus* e em outros animais que também podem servir como reservatórios da doença. Contribuindo para os dados epidemiológicos do estado, visto que agora sabe-se que os equídeos da amostragem não possuíam a doença. Sendo necessários novos estudos a cerca do *Trypanosoma*.

Palavras-chave: *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*, *Equus asinus*, *Equus caballus*
Maranhão

ABSTRACT

Trypanosomiasis is a disease caused by a group of pathogenic protozoa of the genus *Trypanosoma* spp., which has a wide distribution and worldwide economic importance. The disease is characterized by the intermittent appearance of parasites in the blood of infected individuals and anemia. Affected animals show reduced weight and decreased productivity. In Brazil, little is known about the epidemiology of *Trypanosoma evansi* and *T. vivax* in *Equus asinus*, making studies on the serological and molecular evaluation of the protozoan in these animals on the island of São Luís scarce. cause of trypanosomiasis in a population of donkeys (*Equus asinus*) and donkeys (*Equus caballus*) from the island of São Luís do Maranhão through direct detection, with blood smears and Polymerase Chain Reaction (PCR). The work was carried out in the municipalities of the Metropolitan Region of São Luís (São Luís, Raposa, Paço do Lumiar and São José de Ribamar). Donkeys and donkeys from the four municipalities were randomly sampled, totaling 100 animals. The results obtained from this research served as a basis for expanding the scientific and epidemiological knowledge of trypanosomiasis belonging to the Metropolitan Region of São Luís, Maranhão. The research contributed to other studies on trypanosomiasis in *Equus asinus* and *Equus caballus* and in other animals that can also serve as reservoirs of the disease. Contributing to the state's epidemiological data, as it is now known that part of the equines on the island of São Luís have no prevalence for the disease.

Keywords: *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*, *Equus asinus*, *Equus caballus* Maranhão.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem representativa da região metropolitana de São Luís, Maranhão.....	27
Figura 2 - Imagem das amostras positivas para o gene endógeno.	32
Figura 3 - Imagem das amostras negativas para o gene endógeno.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de animais na Ilha de São Luís. 31

Tabela 2 - Tabela da quantidade de animais por município. 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCT	Técnica <i>Buffy Coat</i>
CEEa	Comissão de Ética e Experimentação Animal
d ²	Precisão absoluta desejada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECG	Esfregaços corados pelo Giemsa
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ESU	Esfregaços sanguíneos úmidos
HCT	Método do micro hematócrito ou método de Woo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
iELISA	Ensaio Imunosorbente Ligado à Enzima Indireto
IgG	Imunoglobulina G
MCF	Método da capa flogística
MCS	Método de concentração de Strout
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	Coeficiente de confiança (z = 1,96)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 <i>Trypanosoma vivax</i> E <i>Trypanosoma evansi</i>	19
3.2 TRANSMISSÃO	20
3.3 CICLO BIOLÓGICO DO <i>Trypanosoma vivax</i> E <i>Trypanosoma evansi</i>	21
3.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	233
3.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	23
3.6 EPIDEMIOLOGIA.....	25
4 METODOLOGIA.....	27
4.1 ÁREA EXPERIMENTAL E ANIMAIS	27
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	28
4.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	28
4.3.1 Extração de DNA e PCR convencional para gene endógeno	28
4.3.2 PCR convencional para <i>Trypanosoma sp</i>	29
5 RESULTADO E DISCUSSÕES.....	30
6 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	35

1 INTRODUÇÃO

A família Trypanosomatidae corresponde a um agrupamento monofilético de parasitas obrigatórios de alta prevalência, distribuição geográfica e nichos ecológicos, grande diversidade de hospedeiros, sendo importante para o interesse médico veterinário. Ao passo que, como representam organismos eucariotos unicelulares ancestrais, são de grande importância para os estudos acerca da evolução desse grupo. (TEIXEIRA et al., 2011). Sendo constituída por um grupo de 9 gêneros de tripanossomatídeos, sendo eles: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, e *Rynchoidomonas*, representante dos parasitas monogênicos de insetos; *Endotrypanum*, *Leishmania*, e *Trypanossoma*, que são representantes dos protozoários heteroxênicos, que possuem ciclo biológico alternativo entre hospedeiros vertebrados e invertebrados; Além disso, os gêneros *Wallaceina* e *Sergeia* foram propostos por Podlipaev (2001) e Svobodová et al., (2007), como constituintes dos protozoários monoxênicos de insetos, bem como os gêneros *Angomonas* e *Strigomonas*, como endossimbiontes bacterianos. (TEIXEIRA et al., 2011).

A família Trypanosomatidae possui ampla prevalência, distribuição geográfica e nichos ecológicos além de extensa diversidade de hospedeiros, representando um grupo monofilético de parasitas obrigatórios. Os tripanossomas são parasitas hemoflagelados que fazem parte do reino Protista, filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, superclasse Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Cinetoplastida, família Trypanosomatidae, e gênero *Trypanosoma* (HOARE, 1972).

O gênero *Trypanossoma* compreende a espécies classificadas como parasitas heteroxênicos. São parasitas de grande diversidade de hospedeiros com grande distribuição mundial. Vários são os fatores que contribuem para a distribuição, diversidade e densidade dos vetores e hospedeiros, dessa maneira regulando as interações com os tripanossomas. Originalmente *T. vivax* e *T. evansi* são oriundos da África, acometendo a espécie bovina, bubalina, ovina, caprina, equina e suína. (PÉREZ, 2012).

As tripanossomoses são doenças que possuem ampla distribuição cosmopolita e de grande importância econômica na África, em áreas ocupadas pelo seu vetor biológico, a mosca tsé-tsé (BATISTA et al. 2008).

De modo geral, os hemoflagelados pertencem à família Trypanosomatidae, e de acordo com a forma de transmissão podem ser classificados em duas seções: Salivaria e Stercoraria. Na secção Salivaria são OS tripanossomas transmitidos por meio das glândulas salivares (inoculativa), e na Stercoraria os tripanossomas transmitidos através das fezes dos insetos

vetores (contaminativa). Existindo ainda uma subdivisão da seção salivaria em 4 subgêneros (*Dutonella*, *Pycnomonas*, *Nannomonas* e *Trypanozoon*) bem como a seção Stercoraria em 3 subgêneros (*Herpetosoma*, *Megatrypanum* e *Schizotrypanum*) (HOARE 1972; LOSOS, 1986). *Trypanosoma vivax* é uma das principais espécies transmitidas por moscas tsé-tsé, que possui impacto negativo na saúde e produtividade de animais de interesse econômico. A importância no estudo dessa espécie é primordial, por ser a única das três espécies de tripanossomas de importância em ungulados na África (*T. vivax*, *T. brucei*, *T. congolense*). O parasita saiu desse continente, adquirindo novos hospedeiros e meio de transmissão por ausência do vetor natural (MOLOO et al., 2000) se distribuindo com êxito no continente americano. Este possui grande diversidade entre os hospedeiros ungulados (HOARE, 1972, DHOLLANDER et al., 2006; PINCHBECK et al., 2008; DUFFY et al., 2009), introduzidos nas Américas provavelmente nas importações.

No Brasil, *T. vivax* foi diagnóstico na região amazônica (1972) no Estado do Pará. A detecção do parasita ocorreu em esfregaços sanguíneos de um búfalo- aquático, com histórico de febre e perda de peso (SHAW & LAINSON, 1972). No ano de 2002, o primeiro surto de tripanossomíase foi descrito no Semiárido brasileiro, sendo caracterizado pelas altas taxas de morbidade, mortalidade e perdas econômicas (BATISTA et al., 2007).

No Brasil, o *T. evansi* foi observado na Ilha de Marajó, entre 1827 e 1830, onde teve início epizootias graves entre os equinos da região. A doença se espalhou da Ilha de Marajó pela América do Sul, estendendo-se pelo Brasil, Guiana, Bolívia, Venezuela e Colômbia (HOARE, 1972).

Trypanosoma evansi não possui apenas a maior diversidade de hospedeiros vertebrados, como também a maior distribuição geográfica entre os tripanossomas patogênicos, com presença na Europa, Ásia, Oriente Médio, Américas Central e do Sul, além da África. A ampla distribuição geográfica e a diversidade de hospedeiros de *T. evansi*, juntamente com as características da doença nos animais infectados, mostram a extrema necessidade da realização de estudos epidemiológicos para compreensão da dinâmica e da estrutura populacional, além da diversidade das populações desse parasita, assim como determinar seus reservatórios. (PÉREZ, 2012).

A doença causada por *Trypanosoma evansi* afeta principalmente equinos. A prevalência varia com a região (HERRERA et al., 2004, HOARE, 1972). Pode ser transmitida mecanicamente através de insetos hematófagos das famílias Tabanídea e Stomoxidae e por morcegos hematófagos (HOARE, 1972).

Desse modo, o estudo realizado teve como objetivo identificar a presença do *T. vivax* e *T. evansi* em esfregaço sanguíneo e a detecção molecular do DNA desses parasitas em sangue de equídeos na Ilha de São Luís.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de agentes causadores de tripanossomíase em uma população de jumentos e burros (*Equus asinus*) na ilha de São Luís do Maranhão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a presença de *Trypanosoma evansi* e *T. vivax* em jumentos e burros (*Equus asinus*) em esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa;
- Detectar a presença do DNA de *Trypanosoma evansi* e *T. vivax* em amostras de sangue dos jumentos e burros pela Reação em Cadeia pela Polimerase;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Trypanosoma vivax* E *Trypanosoma evansi*

Trypanosoma Vivax é considerado um hemoprotozoário eucariótico, dotado de flagelos. Pertencente a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e subgênero Duttonella (HOARE, 1972). É uma das principais espécies transmitidas pelas moscas tsé-tsé, causando um grande impacto negativo na saúde e produtividade dos animais de importância econômica na África. O estudo a respeito dessa espécie é fundamental por se tratar de ser uma das únicas das três espécies de tripanossomas que conferem importância em ungulados na África (*T. vivax*, *T. brucei brucei*, *T. congolense*). O parasita é mais frequente encontrado no sangue de equídeos oriundos da África (HOARE, 1972, DHOLLANDER et al, 2006; PINCHEBECK et al, 2008; DUFFY et al., 2009).

Trypanosoma vivax é um organismo unicelular, eucarioto, com núcleo grande e central, cinetoplasto grande, e flagelo livre (HOARE, 1972). O núcleo e estruturas são bem visíveis, o que o torna muito importante para o diagnóstico, contribuindo na identificação em esfregaços sanguíneos (HOARE, 1972).

Trypanosoma evansi faz parte no subgênero *Trypanozoon*, bem como outras espécies muito relacionadas *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. Brucei brucei* e *T. equiperdum* (HOARE, 1972). Essas espécies representam um grupo de parasitas que são indistinguíveis quanto aos aspectos morfológicos, embora representem diferentes importâncias epidemiológicas, com ampla distribuição geográfica e preferências de hospedeiros, mecanismos de transmissão e patogenicidade (GODFREY et al., 1990).

Na observação de amostras de sangue fresco, é possível perceber que *T. evansi* possui as características de parasitas *Trypanozoon* delgados, sendo esses: tamanho pequeno, em comparação com *Trypanosoma theileri*, porém grande em comparação com *T. congolense*, bem como a extremidade posterior delgada, flagelo livre, movimentos ativos, mas com a capacidade de obter deslocamentos limitados no microscópio campo, além de ter membrana ondulante altamente visível.

Em esfregaço corado com Giemsa, pode ser observado que *T. evansi* é descrito como um parasita tripomastigota fino monomórfico. Comparado com *T. brucei*, possui um formato mais delgado com flagelo livre longo e extremidade posterior delgada com cinetoplasto pequeno subterminal, além de possuir outras formas intermediárias com flagelo livre mais curto

e com a extremidade posterior com cinetoplasto quase terminal) e bastante polimórfico, com aspecto inconsistente. (HOARE, 1972).

Este subgênero representa espécies de caráter patogênicas para o homem e para outros animais domésticos e silvestres, sendo responsáveis por determinadas doenças conhecidas como Naga em bovinos (*T. b. Brucei*), doença do sono em humanos (*T. b. Gambiense*, *T. b. rhodesiense*), Surra ou Mal de cadeiras em mamíferos domésticos e silvestres (*T. evansi*) e Durina em equinos (*T. equiperdum*) (HOARE, 1972). Exceto *T. evansi* e *T. equiperdum*, as espécies causadoras de tripanossomas desse subgênero, possuem mecanismo de transmissão por meio cíclico, através das moscas tsé-tsé na África, onde são muito difundidos.

3.2 TRANSMISSÃO

T. vivax, possui como habitat natural a África tropical, com prevalência na área de distribuição da mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.) (HOARE, 1972; SILVA et al., 1999). No continente africano *T. vivax* distribui-se em boa parte da região, sendo disseminado pelo vetor, a mosca tsé-tsé. O vetor atua como transmissor, na região do Oeste da África, possui bastante patogenicidade, principalmente em bovinos (BATISTA et al., 2008).

Os estudos de *T. vivax* em burros africanos são principalmente da Etiópia, que é o lar de cerca de 6 milhões de burros, com poucos relatos da Gâmbia, Quênia, Sudão e Burkina Faso, onde a tripanossomose é um grande constrangimento para a produção animal em ambas as áreas infestadas e livres de tsé-tsé (*Glossina* spp.). Nesses países, o *T. vivax* causa infecções leves ou sem sintomas nos burros, enquanto o gado pode desenvolver doenças debilitantes (DHOLLANDER et al., 2006, PINCHBECK et al., 2008, EYOB et al., 2011, DAGNACHEW et al., 2014).

A transmissão de *T. evansi* ocorre de forma mecânica por moscas hematófagas. O vetor não se desenvolve de forma cíclica, os tripanosomas ficam alocados na probóscide. Mais comumente, os vetores fazem parte do gênero *Tabanus*, no entanto insetos que pertencem aos gêneros *Stomoxys*, *Haematopota* e *Lyperosia* também podem atuar na transmissão. Diante disso, como principal vetor do *T. evansi*, tem-se o *Tabanus importunus* (mutuca). Outro aspecto importante, é que na América Central e do Sul, o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, pode participar na transmissão, atuando com importante vetor, visto que os parasitas podem se desenvolver e se replicar, dessa maneira sobrevivendo por um longo tempo. Concluindo que,

os morcegos hematófagos podem participar na transmissão, tanto como vetores e também como reservatórios. (TECSA, 2021).

Diferente do que ocorre na transmissão cíclica, (podendo ser tão longa quanto o tempo de vida do vetor) a capacidade de transmissão de *T. evansi* de forma mecânica, ocorre por um pequeno período de tempo (em minutos) e está diretamente relacionada com a permanência e sobrevivência dos parasitas na peça bucal do vetor (TECSA, 2021).

É comum encontrar a doença em hospedeiros como camelos, cavalos, burros, bovinos, zebuínos, caprinos, suínos, cães, búfalos, elefantes, capivaras, coatis, antas, veados e pequenos roedores silvestres. Até certo tempo acreditava-se que o homem era refratário ao *T. evansi*, porém, houve ocorrência na Índia do primeiro caso em humanos. Dessa forma, transformando-se em uma doença de caráter zoonótico, de grande importância na saúde pública. (VANHOLLEBEKE et al., 2006).

O grau de evolução da infecção por *T. evansi* pode variar desde o nível agudo com alta mortalidade em animais susceptíveis como cavalos e cães (SILVA et al., 1995; DOS ANJOS et al., 2007), até doenças crônicas com a presença de sinais de distúrbios motores e fraqueza aparente, que demonstra os graus da evolução da tripanossomíase (HÖRCHNER et al., 1983; MONZON et al., 1984; RODRIGUES et al., 2005; ZANETTE et al., 2008; BERLIN et al., 2009).

3.3 CICLO BIOLÓGICO DO *Trypanosoma vivax* E *Trypanosoma evansi*

São distribuídos em duas secções: a Secção Salivaria possui como vetor biológico os dípteros do gênero *Glossina* (mosca tsé-tsé), possuindo distribuição numa ampla região da África subsaariana, com grupos de espécies associadas aos diversos ecótopos da região. (PÉREZ, 2012). Os tripanossomas dessa secção, são altamente patogênicos para pessoas e animais domésticos e estão distribuídos em quatro subgêneros: *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*), *Nannomonas* (*T. congolense*, *T. simiae*), *Duttonella* (*T. vivax*) e *Pycnomonas* (*T. suis*) (CONNOR et al., 2004).

A Secção Stercoraria é formada pelos subgêneros *Schizotrypanum*, *Herpetosomae* *Megatrypanum*, sendo as espécies-tipo: *T. cruzi*, *T. lewisi* e *T. theileri*, para cada um dos subgêneros, respectivamente (HOARE, 1964, HOARE, 1972).

O ciclo biológico do *T. vivax* corresponde a dois hospedeiros, que são considerados parasitas digenéticos. Os vetores na América do Sul diferenciam-se da mosca tsé-tsé pois não

apresentam capacidade de desenvolvimento cíclico. O hospedeiro definitivo é o animal vertebrado, que geralmente são os mamíferos ungulados (OSÓRIO et al., 2008), visto que variados invertebrados são hospedeiros intermediários (SILVA et al., 2002). Na América Latina, hospedeiros invertebrados atuam na transmissão do parasita por meio de moscas hematófagas dos gêneros *Tabanus* spp. (mutuca) e *Stomoxys* spp. (mosca dos estábulos), sem a ocorrência de desenvolvimento cíclico nesses insetos (SILVA et al., 2002; DESQUESNES, 2004).

Os animais infectados com *T. vivax* podem desenvolver uma forma aguda ou crônica da doença. Na forma aguda, a morte pode ocorrer em até 5 semanas e os sinais clínicos apresentam-se por febre, letargia, fraqueza, anemia, perda da condição corporal, lacrimejamento, edema subcutâneo ventral, epistaxe e disenteria. Nos casos crônicos, observa-se anemia e emaciação progressiva. Abortos também podem ocorrer (LOSOS et al., 1972; SILVA et al., 1999; DÁVILA et al., 2000). Em geral, as infecções em equinos resultam em uma forma leve e crônica da doença, caracterizada por baixa mortalidade. Análises moleculares têm indicado jumentos como reservatórios assintomáticos deste parasita (RODRIGUES et al., 2015).

Quando as formas infectantes (tripomastigotas), são inoculadas nos hospedeiros definitivos por meio da picada das moscas hematófagas, e atingem a corrente sanguínea, multiplicam-se por divisão binária (GARDINER, 1989; SILVA et al., 2002).

A evolução da infecção por *T. evansi* varia na apresentação da doença pela forma aguda com alta mortalidade em animais susceptíveis como cavalos e cães (SILVA et al., 1995; FRANCISCO, 2007), até mesmo na forma crônica sendo observado o quadro clínico por distúrbios motores e fraqueza progressiva (HORCHNER et al., 1983; MONZON et al., 1984; RODRIGUES et al., 2005; 2009; ZANETTE et al., 2008; BERLIN et al., 2009) em grande parte dos animais de interesse econômico (LUCKINS, 1988).

Os sintomas ocasionados pela *T. evansi*, apresentam-se através de uma rápida perda de peso, febre intermitente, edema dos membros pélvicos e das partes baixas do corpo, cegueira (COLPO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005), alterações hemostáticas (COLPO et al., 2005) e fraqueza progressiva (LEVINE, 1973).

Um dos principais sintomas observados é a anemia de natureza hemolítica (HABILA et al., 2012) resultante da eritrofagocitose no baço, fígado, pulmões, nódulos linfáticos, medula óssea e na circulação sanguínea. Estágios crônicos são caracterizados por mucosas pálidas, nódulos linfáticos superficiais intumescidos, incoordenação motora e paralisia dos membros posteriores (ZANETTE et al., 2008). Os animais afetados tendem a morrer em semanas ou

poucos meses, portanto a doença assume importância veterinária e econômica no âmbito da criação de equinos (HABILA et al., 2012).

A forma crônica da doença é caracterizada por alterações reprodutivas, pela perda generalizada da condição corporal, neuropatia, supressão do sistema imune, anemia, chegando até a morte, podendo afetar animais domésticos e silvestres, com consideráveis alterações histopatológicas (DAMAYANTI et al., 1994; HOLLAND et al., 2001; CORTEZ et al., 2009).

Contudo, alguns fatores inerentes ao parasita e hospedeiros e também quanto ao manejo animal, interferem diretamente na severidade das apresentações das formas clínicas da doença, bem parecido com o descrito na tripanossomíase por *T. vivax*.

3.4 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A patogenia de *T. vivax* é muito variável e abrangente, até mesmo na África. As manifestações clínicas possuem diferenças entre as populações do agente da costa leste e oeste, onde levam um quadro crônico. Alguns autores relacionam o maior potencial patogênico ao serodema da costa oeste, pois deu origem a população inicial do agente para a América do Sul. (PAIVA et al, 1997).

Quanto aos sinais clínicos relacionados ao agente são: febre, anemia, inapetência, fraqueza progressiva, emaciação, aborto, síndromes hemorrágicas e morte (WOO, 1970; SOLTYS & WOO, 1978; PEREIRA & ABREU, 1978; GARDINER et alii 1989; KIMETO alii, 1990, MAIKAJE et alii 1991; VALLI, 1993). LOSOS & IKEDE (1972). De acordo com as características e sinais clínicos atribuídos pelas tripanosomíases, infecções secundárias podem ocorrer tornando o diagnóstico um pouco mais difícil.

Quanto à *T. evansi*, a sintomatologia caracteriza-se por caquexia e anemia. Durante esse momento de apresentação clínica pode ter o aparecimento de emagrecimento progressivo, bem como letargia, incoordenação, instabilidade dos membros pélvicos, e atrofia musculares dos membros pélvicos, assim como dificuldade para levantar, fraqueza muscular, palidez das mucosas, icterícia, edema subcutâneo e abortamento. Durante a fase aguda da doença, os animais podem apresentar o emagrecimento progressivo podendo até não se recuperar. Os poucos animais que sobrevivem podem permanecer em mau estado corporal (RODRIGUES, 2006).

3.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das tripanossomíases pode ser realizado por meio de diferentes métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (CONNOR et al., 2004). Os métodos diagnósticos parasitológicos mais frequentemente utilizados são os esfregaços corados pelo Giemsa (ECG), esfregaços sanguíneos úmidos (ESU), método de concentração de Strout (MCS), método do micro hematócrito ou método de Woo (HCT), método da capa flogística (MCF) e inoculação em camundongos (SILVA et al., 1999).

Para o diagnóstico molecular a técnica de escolha é a reação em cadeia da polimerase (PCR) (SILVA et al., 2002). Essa técnica tem sido muito utilizada, por ser sensível e específica, o que permite detectar animais infectados com baixa parasitemia (HERRERA et al., 2004).

O diagnóstico definitivo de *T. vivax* pode ser realizado através de exames diretos, por meio da técnica microhematócrito (WOO, 1970), a técnica *buffy coat* (TBC) (MURRAY, 1977) onde é possível fazer a confirmação das formas tripomastigotas do parasito em esfregaços sanguíneos. De acordo Woo (1970), a técnica de microhematócrito (MHCT), é um método de rotina muito utilizado, visto que possui execução muito simples, sendo possível identificar até mesmo no microtubo do hematócrito.

A realização do exame direto de um material fresco tem como resultado uma baixa sensibilidade. No entanto, em algumas ocasiões não é possível a confirmação da espécie do parasita baseado na morfologia e motilidade do mesmo (DESQUESNES, 2004). Quanto a outra técnica direta, a *Buffy coat* (BCT), possui algumas vantagens em comparação a técnicas convencionais, que consiste em colocar uma camada leucocitária de esfregaço sanguíneo e posteriormente sendo visualizado pelo microscópio (MURRAY, 1977; DESQUESNES e TRESSE, 1996; MATTIOLI et al., 2001; DELAFOSSE et al., 2006).

Por outro lado, também são realizados exames indiretos, entre estes, ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) os quais possibilitam a observação de títulos de anticorpos anti-*T. vivax* (MADRUGA et al., 2006, AQUINO et al., 2010).

O método molecular, possui como objetivo a identificação de um segmento de DNA permitindo a realização do diagnóstico espécie-específico de infecções ativas por *Trypanossoma*, visto que, depois da morte do parasito, há a livre circulação de DNA no hospedeiro, perdurando por até no máximo dois dias (DESQUESNES, 2004). Isso influencia na identificação, caracterização e diagnóstico das mais variadas espécies de *Trypanosoma* (DESQUESNES e DÁVILA, 2002). Entre as técnicas moleculares tem-se a PCR para a

identificação do DNA de *T. vivax* e *T. evansi* (VENTURA et al., 2001, DESQUESNES e DÁVILA, 2002).

A técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) possui a finalidade de detecção do DNA do parasito, sendo utilizado em uma enorme variedade de amostras biológicas, tanto nas espécies domésticas, como nas silvestres e de animais de produção (BENVENGA, 2013; BRASIL, 2011; ASSIS et al., 2010; MANNA et al., 2004.) Através de alguns estudos, foi possível avaliar a eficácia da PCR em amostras de swabs conjuntivais, obtendo bons resultados para cães, gatos e equinos (LEITE et al., 2010; BARBOSA et al., 2012; BENASSI, 2015; PEREIRA et al., 2016).

A técnica da PCR, independentemente do tipo de amostra utilizada, apresenta alta sensibilidade e especificidade; no entanto, é uma técnica complexa e laboriosa, não sendo adequada para o uso a campo. (GONTIJO et al., 2003; IKONOMOPULOS et al., 2003).

3.6 EPIDEMIOLOGIA

No continente Americano, o primeiro relato de tripanossomíases por *T. vivax* foi em um gado da Guiana Francesa em 1919 (LEGER & VIENNE, 1919) e logo depois, houveram relatos do parasita na Venezuela (1920), Ilha de Guadalupe e Martinica (1926 e 1929, respectivamente), Panamá (1941), Guiana (1952), no Pantanal da Bolívia (GONZALES et al., 2007) e recentemente na Costa Rica (OLIVEIRA et al., 2009).

A espécie alcançou as Américas possivelmente através das importações de bois oriundos da Europa há mais ou menos quatro séculos atrás (JONES & DÁVILA, 2001, OSÓRIO et al., 2008). No novo continente, o parasita adapta-se ao meio de transmissão mecânico por insetos hematófagos nessas regiões, disseminando-se entre animais domésticos e silvestres que não foram previamente expostos ao patógeno.

A tripanossomíase causada por *T. vivax* possui amplo desenvolvimento no Brasil, sendo diagnosticada em vários estados, como Tocantins, Paraíba, Maranhão, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (LINHARES et al., 2006; BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2009; GALIZA et al., 2011; GUERRA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; SILVA et al., 2009). No Rio Grande do Sul houve a primeira descrição de *T. vivax* em equinos no Brasil (SILVA et al., 2011).

T. evansi e *T. vivax* são as únicas espécies que possuem ampla distribuição nas regiões fora da África, com hematófagos e tabanídeos da família *Muscidae* (HOARE, 1972). Alguns estudos realizados recentemente, a respeito do aspecto filogenético, confirmaram o surgimento

de um grupo com todos os subgêneros de tripanossomas agrupados em um só gênero monofilético (STEVENS et al., 2001; HAMILTON et al., 2004; ADAMS et al., 2010a) sendo constituído somente por tripanossomas africanos.

Possivelmente a entrada de *T. vivax* e *T. evansi* nas Américas aconteceu por meio dos animais trazidos da África por seus colonizadores europeus. Diante disso, ocorrendo a disseminação, por conta da fácil adaptação através da transmissão mecânica. Ambas, podem ser encontradas na América Central e do Sul, sobre influência de fatores climáticos e de densidade (JONES & DÁVILA, 2001; OSÓRIO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

O primeiro relato de *T. vivax* no Brasil, foi em um búfalo de água próximo a Belém, Pará (SHAW, LAISON, 1972). Tempos depois, o protozoário foi novamente encontrado, mas em ovinos e bovinos nos estados de Amapá e Pará, por volta do final da década de 1970 (SERRA-FREIRE, 1981). A doença logo foi descrita no Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul (PAIVA et al., 1997), sendo esses surtos possivelmente relacionados com o aumento no comércio de gado e deslocamento de animais e vetores entre as regiões Norte e Centro-Oeste. Já no restante do continente os relatos são existentes em El Salvador, Equador, Peru e Paraguai através de estudos sorológicos (JONES & DÁVILA, 2001; OSÓRIO et al., 2008).

Vale ressaltar que em se tratando da epidemiologia das tripanossomíases por *T. vivax* o fato de que animais domésticos oriundos de regiões endêmicas possuem capacidade de proteção, o que leva a não apresentação de sinais clínicos nos animais infectados ou uma manifestação da doença sem demonstrativo de risco para a saúde animal. Que pode ser explicado possivelmente, pela prévia exposição ao parasita, visto que animais de regiões não endêmicas possuem alta susceptibilidade a manifestação da doença clínica de modo severo no período de infecção primária (BATISTA et al., 2007).

Contudo, existem fatores inerentes ao hospedeiro como raça, idade, sexo, prenhes, estado nutricional, estresse de produção, infecções intercorrentes, bem como fatores ambientais e dos fatores de manejo animal, vacinação, introdução de animais de regiões endêmicas a regiões livres da doença, sendo pontos de grande importância epidemiológica na prevalência e na manifestação clínica da doença. (PEREZ, 2012)

Estudos epidemiológicos sugerem que o diagnóstico de *T. vivax* em animais domésticos e silvestres ainda possui grandes barreiras, relacionada às parasitemias baixas nos animais infectados a nível crônico, influenciando no diagnóstico. Mesmo sendo realizado por métodos parasitológicos pouco sensíveis, que contribuem em avanços no diagnóstico, e conhecimento sobre os riscos de transmissão entre isolados da África e América do sul, ainda não foi possível

desfazer essas barreiras (DICKIN & GIBSON, 1989; DIRIE et al., 1993; VENTURA et al., 2001; CORTEZ et al., 2006; DUFFY et al., 2009; ADAMS et al., 2010a).

4 METODOLOGIA

4.1 ÁREA EXPERIMENTAL E ANIMAIS

O trabalho foi executado na ilha de São Luís no Estado Maranhão, que correspondem a: São Luís (coordenadas geográficas: Latitude: 2° 31' 51" Sul, Longitude: 44° 18' 24" Oeste), São José de Ribamar (coordenadas geográficas: Latitude: 2° 33' 47" Sul, Longitude: 44° 3' 45" Oeste), Paço do Lumiar (coordenadas geográficas: Latitude: 2° 31' 50" Sul, Longitude: 44° 6' 19" Oeste) e Raposa (coordenadas geográficas: Latitude: 6° 31' 0" Sul, Longitude: 44° 10' 60" Oeste).

Figura 1 - Imagem representativa da região metropolitana de São Luís, Maranhão.



Fonte: o imparcial (2017)

Como não existe determinação de prevalência de *Trypanosoma* nestes municípios, será pressuposto uma prevalência esperada de 50%, conforme Stevenson, 2005.

O tamanho da amostra foi determinado através do método de amostragem aleatória sistemática, onde o número mínimo de animais teve 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 (CEEAA) com o protocolo de Nº 04/2021 na data de 02/03/2021 do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletados 10ml de sangue diretamente da veia jugular de 100 jumentos e burros, machos e fêmeas de qualquer idade. Os animais escolhidos para amostragem foram jumentos e burros nascidos e criados nos municípios de São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa, os quais constituem a Ilha de São Luís. Foram amostrados aleatoriamente jumentos e burros dos quatro municípios, totalizando 100 animais.

Foram colhidas amostras (cerca de 5ml) de sangue da veia jugular de cada animal, utilizando material descartável, os quais foram acondicionados em tubos esterilizados contendo anticoagulante universal EDTA, o sangue foi utilizado para realização de esfregaços sanguíneos finos corados para a possível detecção do protozoário.

4.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

4.3.1 Extração de DNA e PCR convencional para gene endógeno

A extração do DNA do sangue total foi realizada com base no protocolo de isolamento do DNA genômico, conforme descrito por Kuramae-Izioka (1997). Para verificar a contaminação da amostra, foi adicionada água autoclavada ultrapura de DNase e RNase (Invitrogen®, Carlsbad, EUA), denominada controle de extração, em cada bateria de extração. Cada DNA será submetido à análise espectrofotométrica (Nanodrop 2000®, Thermo Scientific, EUA), obtendo suas concentrações e razões 260/280 e 260/230. Todas as amostras e controles de extração foram submetidos à PCR para o gene endógeno Citocromo b cyt b1: CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA cyt b2: GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA. (STEUBER; ABDEL-RADY; CLAUSEN, 2005). Os primers que amplificaram a região V7/V8 do gene 16S SSU rRNA SSU561F: 5'TGGGATAACAAAGGAGCA3'; SSU561R: 5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3' ≈650pb (SANTOS, 2020).

4.3.2 PCR convencional para *Trypanosoma sp*

A PCR para o *Trypanosoma sp*, foi realizado usando iniciadores com base na sequência de DNA do gene 16S SSU rRNA SSU561F: 5'TGGGATAACAAAGGAGCA3'; SSU561R: 5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3' ≈650pb conforme descrito por Santos 2020, que amplificaram a região V7/V8 do gene 16S SSU. Todos os ensaios de PCR serão conduzidos em termociclador (T100™ Thermal Cycler, Bio Rad, EUA). Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio. A imagem do gel foi obtida usando o sistema de imagem ChemiDoc™ MP (Bio-Rad). Os padrões de tamanho de DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder; Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) foram incorporados no gel.

5 RESULTADO E DISCUSSÕES

A partir da observação das amostras de sangue realizado por esfregaço sanguíneo, dos burros e jumentos provenientes da Ilha de São Luís, Maranhão mostrou que os animais não estão infectados por *Trypanosoma vivax e evansi* na localidade.

Com base no que foi dito por Radostits et al. (2002), a observação direta por esfregaço sanguíneo é comumente realizada ainda no estágio inicial da doença, onde ocorre o pico da parasitemia, sendo possível visualizar o agente etiológico. O que poderia explicar a não observação dos parasitas na lâmina.

Nesse estudo utilizou-se o método de estudo direto pela técnica por esfregaço sanguíneo com objetivo de observar a presença de ambos os parasitas. A qual nos permitiu observar a ausência do parasita em todas as lâminas confeccionadas.

Em animais com a infecção, a identificação dos parasitas estudados ocorre com a visualização dos parasitas por meio dos esfregaços sanguíneos corados pelo método Giemsa, que na maioria das vezes apresenta melhores resultados (OIE, 2004). Durante a fase aguda, a detecção direta pode ser feita por meio de observação de esfregaços sanguíneos. (HINCHCLIFF et al., 2004).

Apesar de não ter sido diagnosticado a presença de nenhum animal com a Trypanosomíase, de acordo com Gaunt 2000, a anemia é um dos sinais mais comuns que pode ser encontrado nas infecções por *T. evansi*. Em nosso trabalho observou-se clinicamente a presença de alguns animais aparentemente anêmicos e com baixo peso corporal, e também se observou a presença de moscas nos animais, entretanto não foi possível a coleta desses vetores.

Quando os animais apresentam a infecção de forma aguda, está relacionada ao mecanismo imunomediados (DONELSON et al., 1998) bem como, na fase crônica, pode relacionar-se também com a deficiência da eritropoiese (JAIN, 1993). Ainda de acordo com o autor, a anemia é de origem hemolítica em decorrência da eritrofagocitose que ocorre em órgãos como baço, fígado, pulmões, nodos linfáticos, medula óssea e circulação sanguínea.

Foram realizadas coletas de burros e jumentos, totalizando 100 animais. No momento das coletas, em muitos casos foi possível notar o peso corpóreo do animal, alguns com a presença de ectoparasitas. De acordo com Pérez (2012), *Trypanosoma evansi* é uma espécie patogênica que infecta uma gama de espécies hospedeiras pelo mundo, sendo transmitidos mecanicamente por moscas hematófagas. E por relatos de muitos proprietários, muitos animais estavam anêmicos. Frazer e Simonds (1909), afirmam que, a sintomatologia de *T. evansi* é

caracterizada por rápida perda de peso, e variados graus de anemia, bem como, febre intermitente, edema dos membros pélvicos e das partes baixas do corpo e fraqueza progressiva (Levine 1973).

Tabela 1 - Distribuição de animais na Ilha de São Luís.

Animais		Sexo	
Espécie	n	M	F
Jumentos	86	46	40
Burros	14	9	5
Total	100	55	45

Com base no que afirma Silva et al (2002), o diagnóstico das tripanossomíases é realizado por diversos métodos, sendo eles: o parasitológico, sorológico e molecular. Entre essas técnicas, tem-se o aspirado de linfonodos, esfregaço sanguíneo, técnica de observação do tubo de micro-hematócrito, testes sorológicos, (MONZÓN, 1993), e diagnósticos moleculares.

Quanto ao diagnóstico molecular, a técnica de predileção é a reação em cadeia da polimerase (PCR) (SILVA et al., 2002). A PCR é bastante utilizada, por ser sensível e específica, permitindo identificar os animais infectados até mesmo em grau de baixa parasitemia (HERRERA et al., 2004). Em contrapartida, animais que realizaram quimioterapia podem demonstrar falsos negativo nessa técnica (AQUINO et al., 1999).

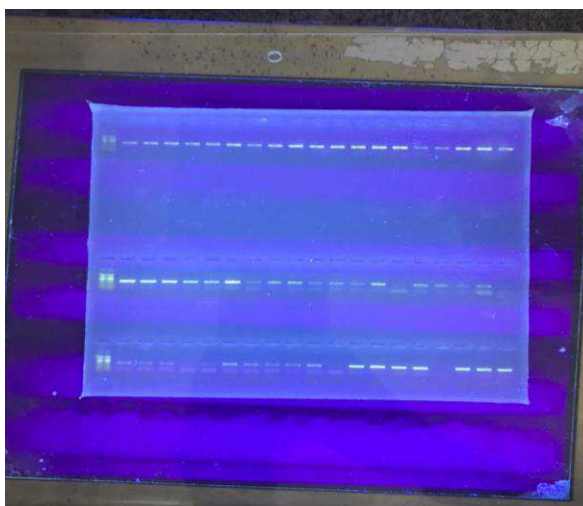
Em nosso estudo, as análises de 100 amostras de sangue de animais avaliados, pela técnica de PCR, mostraram que nenhum dos animais (jumentos e burros) amostrados da Ilha de São Luís, Maranhão, estavam infectados com a doença.

Tabela 2 - Tabela da quantidade de animais por município.

Municípios	Amostras Testadas	PCR Amostras reagentes	%
São Luís	60		16,67%
Raposa	16		6,67%
Paço do Lumiar	14		10,00%
São José de Ribamar	10		23,33%
Total	100		100,00%

Na primeira etapa do processamento das amostras, foi realizada a PCR para o gene endógeno, para certificação de qualidade das etapas anteriores executadas. Primeiramente, foi realizada a PCR com 57 amostras, onde observou-se através da eletroforese em gel, que todas as amostras estavam positivas, mostrando que anteriormente tudo foi realizado de forma correta.

Figura 2 - Imagem das amostras positivas para o gene endógeno.



Na segunda etapa do processamento das amostras, foi realizada a PCR para o gene endógeno novamente, porém com as 43 amostras restantes e foi possível notar que 9 amostras deram negativo, podendo evidenciar algum erro nas etapas anteriores de processamento, incluindo até mesmo desde a coleta.

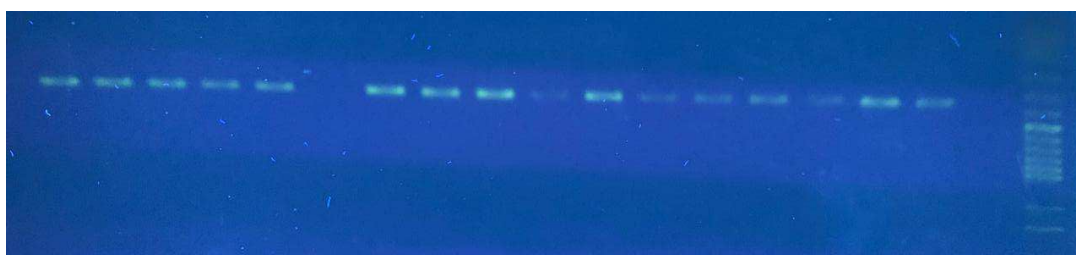


Figura 3 - Imagem das amostras negativas para o gene endógeno.

Na PCR para detecção do *Trypanosma*, mostrou-se todos os animais negativos para a doença. Caracterizando a não ocorrência de *T. vivax* e *T. evansi* nos jumentos e burros da Ilha de São Luís, Maranhão. De acordo com Silva et al, 2002 os surtos decorrentes de *T. evansi* em animais de produção no Brasil costumam ocorrer em regiões de clima quente. Em comparação

a um estudo realizado no estado do Rio Grande do Sul, boa parte dos casos ocorreram no verão, (CONRADO et al., 2005; MORAES et al., 2007; RODRIGUES et al., 2005; ZANETTE et al., 2008) sendo justificado pelo alto número de insetos hematófagos durante esse período. Dessa maneira, ocorre a disseminação mais fácil entre os animais do flagelado.

Corroborando aos nossos estudos, o fator clima pode ser um dos motivos relacionados ao não parasitismo dos animais, visto que boa parte das coletas foram realizadas ainda durante o inverno.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho observou-se que nenhum dos animais estudados na Ilha de São Luís, Maranhão, foram positivos para *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi*. Sendo necessário a continuidade de novas pesquisas para podermos afirmar se os parasitas circulam nos animais da espécie equídea na Ilha de São Luís.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ADAMS, E.R.; HAMILTON, P.B.; RODRIGUES A.C.; MALELE I.I.; DELESPAUX, V.; TEIXEIRA, M.M.; GIBSON, W.C. Novos genótipos de *Trypanosoma (Duttonella) vivax* de moscas tsé-tsé na África Oriental. **Parasitology** , v.137, p. 641 – 650, 2010. 10.1017 / S0031182009991508
- 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.
- 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.
- ASHOUR, A.A.; ABOU EL-NAGA, TR; BARGHASH SM; SALAMA MS. *Trypanosoma evansi*: detection of *Trypanosoma evansi* DNA in naturally and experimentally infected animals using TBR (1) & TBR (2) primers. **Exp Parasitol.** v.134, n.1, p.109-14, 2013. doi: 10.1016/j.exppara.2013.02.003. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23454630.
- ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; SILVEIRA, R.C.V.; NUNES, C.M.; OLIVEIRA, T.M.S.; MACHADO, R.Z. Comparative study of diagnostic methods for visceral leishmaniasis in dogs from Ilha Solteira. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v.19, n.1, p.17-25, 2010.
- BARBOSA, V.T.; SILVA, M.A.G.; SOUSA, M.G.; GERING, A.P.; SANTOS, H.D.; LAUS, J.L. Detection of amastigotes forms in a parasitological exam of smears made from conjunctival swab in dogs with visceral leishmaniasis. **Arq Bras Med Vet Zootec.**v.64, n.6, p.1465-1470, 2012.
- 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.
- 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.; OLIVEIRA, A. F.; RODRIGUES, C. M. F.; DAMASCENO, C. A. R.; OLIVEIRA, I. R. S.; ALVES, H. M.; ... & TEIXEIRA, M. M. G. Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: from acute disease outbreak to chronic cryptic infection. **Veterinary parasitology**, v.165, n.1-2, p.131-135, 2009.

BENASSI, J.C. Detecção de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos [dissertação]. Pirassununga: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2015.

BENVENGA, G.U. Ocorrência de *Leishmaniose* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de SP [dissertação]. Pirassununga: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2013

BERLIN, D.; LOEB, E., & BANETH, G. Disseminated central nervous system disease caused by *Trypanosoma evansi* in a horse. **Veterinary Parasitology**, v.161, n.3-4, p.316-319, 2009.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2011.

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.

COLPO, CB, MONTEIRO, SG, STAINKI, DR, COLPO, ETB, & HENRIQUES, GB. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural** , v.35 , p.717-719, 2005.

CONNOR, R. J. & VAN DEN BOOSCHE, P. African animal trypanossomoses. **Oxford University Press**, v.1, p.251-296, 2004.

CONRADO, A. D. C.; LOPES, S. T. D. A.; OLIVEIRA, L. S. S. D.; MONTEIRO, S. G.; VARGAS, D. D. L. B.; & BUENO, A. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região Central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.35, p.928-931, 2005.

- CORTEZ, A. P.; VENTURA, R. M.; RODRIGUES, A. C.; BATISTA, J. S.; PAIVA, F.; ANEZ, N., ... & TEIXEIRA, M. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitology**, p.159-169, 2006.
- CORTEZ, A.P.; RODRIGUES, A.C.; GARCIA, H.A.; NEVES, L.; BATISTA, J. S.; BENGALY, Z.; PAIVA, F.; TEIXEIRA, M.M. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America--characterization, relationships and diagnostic implications. **Mol Cell Probes**. v.23, n.1, p.44-51, 2009.
- DAGNACHEW, S.; TEREFE, G.; ABEBE, G.; BARRY, D.J.; GODDEERIS, B.M. Alterações bioquímicas comparativas em bovinos zebuínos infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax* em áreas infestadas por tsé-tsé e não tsé-tsé do noroeste da Etiópia. **Vet Parasitol**. P. 205, 2014.
- DAMAYANTI, R.; GRAYDON, R. J.; LADDS, P. W. The pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of comparative pathology**, v. 110, n. 3, p. 237-252, 1994.
- 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.; 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.
- 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., DIA, ML, BOUYER, J., & FATEHI, M. Transmissão mecânica de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma congolense* por tabanídeos africanos comuns *Atylotus agrestis* e *Atylotus fuscipes*, 2004.
- DHOLLANDER, S.; JALLOW, A.; MBODGE, K.; KORA, S.; SANNEH, M.; GAYE, M.; ... & GEERTS, S. Tripanossomose equina na Divisão Central River da Gâmbia: um estudo de registros de consultas em clínica veterinária. **Medicina veterinária preventiva** , v.75, p.3-4, p.152-162, 2006.

- DICKIN, S. K.; GIBSON, W. C. Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 135-142, 1989.
- DIRIE MF. OLLE MJ THATTHI R. GARDINER PR Comparative studies of *Trypanosoma* (Dulfonella) *vivax* isolates from Colombia. **Pärasitol** , v.106, p.21-9, 1993.
- DONELSON, J.E.; HILL, K.L.; EL-SAYED, N.M. Múltiplos mecanismos de evasão imunológica por tripanossomas africanos. **Parasitologia molecular e bioquímica** , v.91, n.1, p.51-66, 1998.
- DOS ANJOS, C. F. S. T.; GONZALEZ, L. M. M. T. S.; GARMATZVI, M. P. W. B. C.; PAIMVII, C. B. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 288-291, 2007.
- DUFFY, C.W.; MORRISON, L.J.; BLACK, A.; PINCHBECK, G.L.; CHRISTLEY, R.M.; SCHOENEFELD, A.; ... & MACLEOD, A. *Trypanosoma vivax* exhibe uma estrutura populacional clonal. **International Journal for parasitology** , v.39, n.13, p.1475-1483, 2009.
- EYOB, A.; MEKURIA, S.; REGASSA, A.; ABEBE, R. Um estudo transversal da tripanossomose equina e seus vetores na zona de Wolayta, sul da Etiópia. **J Vet Med Anim Health**. P. 21–6, 2011.
- FRANCISCO, A. F.. Efeito do tratamento com benzonidazol sobre o curso da infecção pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* em camundongos descobertas à alteração dos estoques de ferro pelo uso da desferrioxamina. 2007.
- FRAZER H. & SYMONDS S.L. Surra in federated Malay states. J. Comp. Pathol. Ther. 22:185-192, 1909.
- GALIZA, G. J. N., GARCIA, H. A., ASSIS, A. C. O., OLIVEIRA, D. M., PIMENTEL, L. A., DANTAS, A. F. M., ... & RIET-CORREA, F. High mortality and lesions of the central nervous system in trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. **Veterinary Parasitology**, v.182, n.2-4, p.359-363, 2011.
- GARDINER, P.R. Estudos recentes da biologia do *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 229-317, 1989.
- GAUNT, S.D. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and protozoa. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's Veterinary hematology**. Philadelphia : Lippincott,. Cap.27, p.154-162, 2000.

- GODFREY, D.G.; BAKER, R.D.; RICKMAN, L.R.; MEHLITZ, D. A. Distribuição, relações e identificação de variantes enzimáticas dentro do subgênero *Trypanozoon*. **Advances in parasitology** , v.29, p.1-74, 1990.
- GONTIJO, B., & CARVALHO, M. D. L. R. D. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, p.71-80. 2003.
- GONZALES, J.L.; CHACON, E; MIRANDA, M.; LOZA, A; SILES, L.M. Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. **Veterinary Parasitology** v.146, p.9-16, 2007.
- GUERRA, R. D. M. S. N. D. C.; FEITOSA JÚNIOR, A. B.; SANTOS, H. P.; ABREU-SILVA, A. L.; & SANTOS, A. C. G. D. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.833-835, 2008.
- HABILA, N.; INUWA, M.H.; AIMOLA, I.A.; UDEH, M.U.; & HARUNA, E. (). Mecanismos patogênicos de infecções por *Trypanosoma evansi*. *Research in Veterinary Science* , v.93, n.1, p.13-17, 2012.
- HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; GAUNT, M. W.; GIDLEY, J.; & GIBSON, W. C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International journal for parasitology**, v.34, n.12, p.1393-1404, 2004.
- HERRERA, H. M.; DÁVILA, A. M. R.; NOREK, A.; ABREU, U. G.; SOUZA, S. S.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 263-275, 2004.
- HINCHCLIFF, K.W.; KANEPS, A.J.; & GEOR, R.J. *Equine Sports Medicine and Surgery*. Saunders Ltd. 2004.
- HOARE C.A. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes X Revision of the systematic. **J Protozool**. v.11, p.200-207, 1964.
- HOARE, C. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**. 1972.
- HOLLAND, W. G.; CLAES, F.; MY, L. N.; THANH, N. G.; TAM, P. T.; VERLOO, D.; ... & VERCRUYSSSE, J. A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. **Veterinary Parasitology**, v.97, n.1, p.23-33, 2001.

- HÖRCHNER, F.; SCHÖNEFELD, A.; WÜST, B. Experimental infection of horses with *Trypanosoma evansi*. I. Parasitological and clinical results. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, v. 63, n. 2, p. 127-35, 1983.
- IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; & GORGOULIS, VG (). Diagnóstico molecular da leishmaniose em cães: aplicação comparativa dos métodos diagnósticos tradicionais e do ensaio proposto em amostras clínicas. **Veterinary parasitology**, v.113, n.2, p.99-113, 2003.
- JAIN, N.C. Hemolytic anemias associated with some Infectious agents. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger,. Cap.10, p.177-192, 1993.
- JONES, TUDOR W.; DÁVILA, ALBERTO MR. *Trypanosoma vivax* – out of Africa. **TRENDS in Parasitology** , v. 17, n. 2, p. 99-101, 2001.
- KIMETO, B. A.; MUGERA, G. M. & NYAGA, P. N. **Hemorrhagic pancarditis in cattle infected with Trypanosoma vivax**. **Veterinary Parasitology** 34(4): 295-302, 1990.
- KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of Colletotrichum gloeosporioides and Fusarium oxysporum. **Revista Unimar**. V.19, n.3, p.683-689, 1997.
- LEGER, M., & VIENNE, M. An Epizootic caused by Trypanosomes in Cattle in French Guiana. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v.12, p.5, 1919.
- LEITE, R.S.; FERREIRA, S.D.E.A.; ITUASSU LT, DE MELO M.N.; DE ANDRADE, A.S. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Vet Parasitol**. v.170, n.3-4, p.201-206, 2010.
- LEVINE, N. D. Protozoan parasites of domestic animals and man. 2. ed. Minneapolis: Burgers, p. 48-9. 1973.
- LINHARES, G. F. C.; DE CARVALHO DIAS FILHO, F., 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.; IKEDE, B.D. Review of pathology of diseases of domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **Veterinary Pathology**, v. 9 (Suppl.), p. 1-71, 1972.

LOSOS, GEORGE J. **Infectious tropical diseases of domestic animals. Longman Scientific & Technical**, 1986.

LUCKINS, A. G. *Trypanosoma evansi* in Asia. **Parasitology Today**, v. 4, p. 137-42, 1988.

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 a new 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.

MAIKAJE, D.B.; SANNUSI, A.; KYEWALABYE, E.K. & SAROR, D.I. The course of experimental *Trypanosoma vivax* infection in udder sheep. *Veterinary parasitology*, 38: 267-274, 1991.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; DELLA MORTE, R.; ... & GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v.125, n.3-4, p.251-262, 2004.

MASIGA, D. K.; SMYTH, A. J.; HAYES, P.; BROMIDGE, T. J.; & GIBSON, W. C. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. **International journal for parasitology**, v.22, n.7, p.909-918, 1992.

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 trypanosomiasis on health and productivity of N'Dama cattle in The Gambia. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.25-35. 2001.

MOLOO SK, KABALA JM GITIRE NM. Study on the mechanical transmission by tsetse fly *Glossina morsitans centralis* of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* or *T. brucei* to goats. *Acta Trop*, v.74, p.105-108, 2000.

MONZON, C. M.; MANCEBO, O. A.; DÁGOSTINHO, B. I. Consideraciones clínicas de la tripanosomiasis equina experimental (*Trypanosoma equinum*, Vóges 1901). **Rev Med Vet (Bs As)**, v. 65, p. 13-8, 1984.

MONZON, C. M. Serological diagnosis of *Trypanosoma evansi* (Steel 1885) in horses using a direct agglutination test. *Veterinary Parasitology*, v. 47, n. 1-2, p. 25-35, 1993.

MORAES, C.M.; CURCIO, B.R.; RIBAS, L.M.; NIZOLI L.Q. & NOGUEIRA, C.E.W.. Infecção por *Trypanosoma evansi* em equinos do Brasil. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**. v.102, n.1, p.159-163. 2007.

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.

O IMPARCIAL. **Quais municípios estão na região metropolitana de São Luís?**. 2017. Disponível em <<https://oimparcial.com.br/noticias/2017/01/quais-municipios-sao-da-regiao-metropolitana-de-sao-luis/>> Acesso em 02 de jun de 2021.

OLIVEIRA, J. B.; HERNÁNDEZ-GAMBOA, J.; JIMÉNEZ-ALFARO, C.; ZELEDÓN, R.; BLANDÓN, 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.

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

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. **Revta Bras. Parasitol. Vet.** v.6, v.2, Supl.1, p.349, 1997.

PEREIRA, V. F.; BENASSI, J. C.; STARKE-BUZETTI, W. A.; SILVA, D. T.; FERREIRA, H. L.; KEID, L. B.; ... & OLIVEIRA, T. M. F. D. S. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.1, p.104-106, 2016.

PEREZ, H. A. G. **Diagnóstico, caracterização molecular e epidemiologia de Trypanosomas de ungulados**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2012.

PEREIRA, L. J. & ABREU, A. C. V. V. de. **Ocorrência de tripanosomas em bovinos e ovinos na região amazônica**. Pesq. Agropec. Bras. 13(3):17-21, 1978.

PINCHBECK, G.L.; MORRISON, L.J.; TAIT, A.; LANGFORD, J.; MEEHAN, L.; JALLOW, S.; ... & CHRISTLEY, RM. Tripanossomose na Gâmbia: prevalência em cavalos de trabalho e burros detectados por amplificação do genoma completo e PCR, e evidências de interações entre espécies de tripanossoma. **BMC veterinary research** , v.4, n.1, p.1-7, 2008.

PODLIPAEV S. The more insect Trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **Int. J. Parasitol.**; v.31, p.648-52, 2001.

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.

RODRIGUES, ALINE. "**Infecção natural por Trypanosoma evansi em eqüinos.**", 2006.

RODRIGUES, A.; FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SCHILD, A. L.; SOARES, M. P.; MILANO, J.; BARROS, C. S. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 239–249, 2005.

RODRIGUES, C. M., BATISTA, J. S., LIMA, J. M., FREITAS, F. J., BARROS, I. O., GARCIA, H. A., ... & TEIXEIRA, M. M. Field and experimental symptomless infections support wandering donkeys as healthy carriers of *Trypanosoma vivax* in the Brazilian Semiarid, a region of outbreaks of high mortality in cattle and sheep. **Parasites & vectors**, 8(1), 1-11, 2015.

SANTOS, W. J. D. Pesquisa de *Trypanosoma* spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões do Brasil, 2020.

SERRA-FREIRE, N.M. Oiapoque - outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.4, p.30-31,1981.

SHAW, J. J., & LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v.66, n.1, p.25-32, 1972.

SILVA, R. A. M. S.; AROSEMENA, N. A. E.; HERRERA, H. M.; SAHIB, C. A.; & FERREIRA, M. S. J. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.60, n.1-2, p.167-171, 1995.

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, n.1, p.87-93, 1999.

SILVA, R. A. M. S.; RIVERA DÁVILA, A. M.; SEIDL, A.; & RAMIREZ, L. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. **Embrapa Pantanal-Livro científico**, 2002.

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

SILVA, A. S.; BELLE, L. P.; BITENCOURT, P. E.; SOUZA, V. C.; COSTA, M. M.; OLIVEIRA, C. B.; ... & MONTEIRO, S. G.. Activity of the enzyme adenosine deaminase in serum, erythrocytes and lymphocytes of rats infected with **Trypanosoma evansi**. **Parasitology**, v.138, n.2, p.201, 2011.

SOLTYS, M. A. & WOO, P.T.K. African trypanosomes in livestock. In Parasitic Protozoa, Vol. II. Edited by J.P. Kreier. Academic press. London. Pp241-267, 1978.

STEUBER, Stephan; ABDEL-RADY, Ahmed; CLAUSEN, Peter-Henning. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology research**, v. 97, n. 3, p. 247-254, 2005.

STEVENS, JAMIE; RAMBAUT, ANDREW. Diferenças de taxa de evolução em tripanossomas. **Infeção, Genética e Evolução**, v. 1, n. 2, p. 143-150, 2001.

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

SVOBOVÁ, M; ZIDKOVÁ, L; CEPICKA, I; OBORNIK, M; LUKES, J; VOTÝPKA, J.; SERGEIA PODLIPAEVI. gen. nov., sp. Nov (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **In J Syst Evol Microbol.**; v.57, p423-432, 2007.

TECSA, **Equideocultura**. *Trypanosoma evansi* em equinos. 2021. Disponível em <<http://www.tecsa.com.br/assets/pdfs/Trypanosoma%20Evansi%20em%20Equinos.pdf>> Acesso em 04 de Julho de 2021.

TEIXEIRA, MMG; BORGHESEN, TC; FERREIRA, RC; SANTOS, MA; TAKATA, CS; CAMPANER, M; NUNES, VL; MIDER, RV; DE SOUZA, W; CAMARGO, EP. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. **Protist**. v.162, p.503-24, 2011.

VALLI, V.E.O. **The haematopoietic System**. In JUBB, K.V.F; KENNEDY, P.C. & PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. Vol.(3), 4 edition, Academic Press, San Diego, U.S.A.. pp 101-265, 1993.

VANHOLLEBEKE, B., TRUC, P., POELVOORDE, P., PAYS, A., JOSHI, P. P., KATTI, R., JANNIN, J. G. & PAYS, E. Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of apolipoprotein LI. **New England Journal of Medicine**, V. 355, p.2752- 2756, 2006.

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.

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

ZANETTE, R. A.; SILVA, A. S. D.; COSTA, M. M. D.; MONTEIRO, S. G.; SANTURIO, J. M.; & LOPES, S. T. D. A. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em equinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1468–1471, 2008.