
ADONY QUERUBINO DE ANDRADE NETO

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA EPIDEMIOLÓGICA DA
TRIPANOSSOMOSE EM REBANHOS LEITEIROS NA REGIÃO
DO AGRESTE DOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS,
BRASIL.**

GARANHUNS/PE

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

ADONY QUERUBINO DE ANDRADE NETO

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA EPIDEMIOLÓGICA DA
TRIPANOSSOMOSE EM REBANHOS LEITEIROS NA REGIÃO
DO AGRESTE DOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS,
BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Dr. José Augusto Bastos Afonso

GARANHUNS/PE

2016

Ficha catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

A553c Andrade Neto, Adony Querubino de

Caracterização clínica epidemiológica da tripanossomose em rebanhos leiteiros na região do Agreste dos Estados de Pernambuco e Alagoas, Brasil / Adony Querubino de Andrade Neto. - Garanhuns, 2016.

89 f. : il.

Orientador: José Augusto Bastos Afonso

Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes) - Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2016.

Inclui bibliografias, anexos e apêndice

CDD: 636.20896047

1. Ruminante - Doenças
2. Tripanossomose em animais
3. Infecção
- I. Afonso, José Augusto Bastos
- II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA EPIDEMIOLÓGICA DA
TRIPANOSSOMOSE EM REBANHOS LEITEIROS NAS REGIÕES
DO AGRESTE DOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS,
BRASIL.**

Dissertação elaborada por
ADONY QUERUBINO DE ANDRADE NETO
Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Dr. JOSÉ AUGUSTO BASTOS AFONSO DA SILVA
Orientador - Clínica de Bovinos, Garanhuns – UFRPE

Dra. CARLA LOPES DE MENDONÇA
Clínica de Bovinos, Garanhuns – UFRPE

Prof^a Dra. GÍLCIA APARECIDA DE CARVALHO
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG/UFRPE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao grande homem, excelente filho, irmão, esposo, pai e avô, Adony Querubino de Andrade, que no início do mestrado tive que lidar com sua perda física, mas que espiritualmente sempre esteve ao meu lado, e que durante os vinte e sete anos que esteve ao meu convívio e oitenta e sete anos de vida material, sempre exaltou a ética, os bons costumes, o respeito, a honestidade, a bondade, o patriotismo, a amizade, a pureza e a paciência, princípios de um ser na essência da palavra ético e moral.

Ofereço a meus pais Antônio Pinheiro Sobrinho e Maria D'ajuda Pereira

Ramos Pinheiro e meus irmãos

Marcelo Pedreira Pinheiro e Renata Ramos Pinheiro por sempre acreditarem e me apoiarem nas minhas decisões, me dando amor, educação e carinho...

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter me abençoado e ter me dado força para chegar até o final e concluir mais uma etapa da minha vida.

Ao meu pai, Antônio Pinheiro Sobrinho, por todo o Amor, paciência, apoio e dedicação, homem pelo qual tenho um maior orgulho, admiração e respeito.

A minha mãe Maria D'ajuda Pereira Ramos Pinheiro por confiar em mim e na realização desse sonho, me apoiando e me mostrando sempre o caminho certo a seguir.

Aos meus Avós, Adony Querubino de Andrade (in memoria) e Wilma Carvalho que sempre rezaram e torceram para que meus objetivos fossem alcançados, me apoiando e me dando estrutura para seguir em frente.

Aos meus irmãos, primos e tios pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo, em especial meus irmãos Marcelo Pedreira e Renata Ramos pelo carinho, amor e apoio durante essa jornada da minha vida;

Ao Meu Orientador Dr. José Augusto Bastos Afonso da Silva, pela confiança, pela oportunidade, pelo incentivo, pela amizade, pelos conselhos, pela paciência e pelo exemplo de orientador e profissional, para mim, fonte de exemplo para continuar buscando a ciência veterinária e a buiatria.

Ao corpo Técnico da Clínica de Bovinos, Msc Jobson Filipe, Msc. Rodolfo Souto, Msc. Luiz Teles, Msc. Nivan Antônio, Msc. Maria Isabel, Dr. Nivaldo Azevedo Costa, Dra. Carla Lopes, pelos conhecimentos passados, pelos conselhos, pelo exemplo de profissionais e pelo incentivo ao estudo, sem dúvida, me tornei um profissional e uma pessoa melhor graças a vocês.

Ao corpo de profissionais e estudantes do Departamento de Patologia Veterinária, setor de Imunoparasitologia da UNESP Campus Jaboticabal, Carla Freschi, Márcia Jusi, Aline Papete, Rafaela Beraldo, Keyla Carstens, Mayra Araguaia, May Luzzi, e aos amigos que muito me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, Paulo Henrique Sampaio, Luís Otávio Fidélis, Luíz Ricardo Gonçalves, Carlos Antônio Matos, Dasiel Obregon e Renan Amaral. Em especial, meu agradecimento a professora Rosangela Zacarias Machado e ao professor Marcos Rogério André pela oportunidade concedida a mim nas análises de diagnóstico deste trabalho.

Aos amigos da pós-graduação, Alonso Pereira, Rafael Otaviano, Jomel Francisco, Alexandre Mota, Elizabeth Hortencio, Rafael Silva, Cleyber Trindade, Osires Lustosa, Gliere Soares e Bruno Pajeú.

Aos Residentes da Clínica de Bovinos pela amizade, pelas conversas e pela troca de informações e conhecimentos.

Aos Tratadores da Clínica, Sebastião (Gago), Júlio, Daví, Cicero, Jocélio.

Aos Vigilantes da Clínica de Bovinos, pela ajuda, pelas conversas, e pelo apoio dado durante esses anos.

Aos Funcionários da Clínica de Bovinos, Rosilene, Silene, Dona Selma, Luciana, Luciano, Suzane, Priscila, Everaldo, Savio, Ivanilda, Timóteo.

A CAPES pela concessão da Bolsa de mestrado e a CAPES/PROCAD NF (Programa Nacional de Cooperação Acadêmica) pelo auxílio a pesquisa (processo nº 2009/362-10).

Por fim, gostaria de agradecer aos meus familiares, amigos e colaboradores, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foram exclusivas, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que essa etapa da minha vida fosse realizada.

MUITO OBRIGADO!

“O homem nasceu para aprender” (Guimarães Rosa).

RESUMO

O *Trypanosoma vivax* é o hemoparasito mais patogênico para ruminantes, causando grandes perdas econômicas para o produtor quando prevalente no rebanho. Este trabalho se propõe a caracterizar a tripanossomose em bovinos através dos achados clínicos, fatores epidemiológicos de risco e diagnóstico dessa doença em surtos ocorridos no agreste pernambucano e alagoano. Nas propriedades foram realizados levantamentos dos históricos e exames clínicos, coletas de sangue e acompanhamento clínico de 109 animais doentes por um período de um ano. Os achados clínicos foram: febre, apatia, anorexia, diarreia, emagrecimento progressivo, linfadenomegalia, mucosas pálidas, incoordenação motora, agressividade, aborto, queda na produção de leite e alta mortalidade. Das 109 amostras colhidas para exames laboratoriais, em dois momentos com intervalo de oito meses, 97,2% (106/109) foram positivas no ELISA, 90% (98/109) foram positivas para RIFI, 15% (16/109) positivas para PCR e 10,1% (11/109) foram evidenciadas presença do *Trypanosoma* spp. no esfregaço sanguíneo. Em 13 amostras, foram realizados hemogramas o que revelou que 69,23% (9/13) apresentaram anemia normocítica normocrômica e 53,84% (7/13) apresentaram leucocitose, em 46,15% (6/13) neutrofilia e desvio a esquerda regenerativo. Em 72 amostras analisou-se também o hematócrito, proteína plasmática e o fibrinogênio. O hematócrito, teve valor médio de 22% (10% a 37%), a proteína plasmática teve valor médio de 7,55 g/dl (5,4g/dl a 10,0g/dl) e o fibrinogênio plasmático teve valor médio de 700mg/dl (200mg/dl a 1600mg/dl). O sequenciamento das amostras de DNA revelou 100% de similaridade com *T. vivax*. Os principais fatores envolvidos na propagação da doença foram: a entrada de animais portadores do *T. vivax* nas propriedades sem exames prévios e quarentena, a aplicação de ocitocina com compartilhamento de agulhas contaminadas por sangue no momento da ordenha e a restrição da doença ao rebanho em lactação. A transmissão do *T. vivax* ocorreu com o compartilhamento de agulhas entre os animais da lactação, durante aplicação de ocitocina, após a entrada de animais portadores no rebanho. Os testes sorológicos demonstraram uma maior sensibilidade e especificidade, entretanto, o PCR e o esfregaço sanguíneo revelou uma baixa sensibilidade em virtude dos animais já estarem sendo medicados com drogas tripanocidas. Conclui-se que a tripanossomose é uma doença a ser considerada na bovinocultura das regiões estudadas como causadora dos surtos. Medidas higiênicas e de segurança devem ser adotadas durante a administração de ocitocina nas vacas em lactação, sendo esta prática, quando realizada de forma errada e sem critérios higiênicos e com compartilhamento de agulhas, o principal fator de risco na transmissão da tripanossomose em rebanhos leiteiros em regiões onde a doença é prevalente, aumentando o desafio de reinfecções entre os animais.

Palavra-chave: diagnóstico, doença, ruminante, hemoparasito.

ABSTRACT

Trypanosoma vivax is the most pathogenic ruminant's hemoparasite, causing huge economic losses to the producer when prevalent in the herd. This study aims to characterize the tripanossomose in cattle through clinical findings, epidemiological risk factors and diagnosis of this disease in outbreaks occurred in the pernambucano and alagoano wild. On the properties were permormed analysis of historical and clinical examinations, blood collection and clinical monitoring of 109 sick animals for a period of one year. The clinical findings were fever, apathy, anorexia, diarrhea, progressive weight loss, lymphadenopathy, pale mucous, incoordination, aggressiveness, abortion, decrease in milk production and high mortality. Of the 109 samples analyzed in laboratory tests, in two occasions with an interval of eight months, 97.2% (106/109) were positive by ELISA, 90% (98/109) were positive for IFAT, 15% (16/109) positive in the PCR and 10.1% (11/109) were observed the presence of *Trypanosoma* spp in the blood smear. In 13 samples, blood counts were made which revealed that 69.23% (9/13) showed normocytic normochromic anemia and 53.84% (7/13) had leukocytosis, in 46.15% (6/13) neutrophilia and shift left regenerative. In 72 samples also examined whether it hematocrit, plasma protein and fibrinogen. Hematocrit, had average 22% (10% to 37%) to plasma protein had a mean value of 7.55 g / dl (5.4 g / dl to 10.0 g / dl) and plasma fibrinogen had a mean value 700mg / dl (200mg / dl to 1600mg / dl). The sequencing of DNA samples revealed 100% similarity with *T. vivax*. The main factors involved in the spread of the disease were: the ingress of animals without prior tests and quarantine infected with *T. vivax* in the properties, application of oxytocin with sharing needles contaminated by blood at the time of lactation and the restriction of the disease in the lactation herd. The transmission of *T. vivax* occurred with the sharing of needles among animals lactation during application of oxytocin after the entry of carrier animals in the herd. Serological tests demonstrated a higher sensitivity and specificity, entretando, PCR and blood smear revealed a low sensitivity because the animals were already being treated with trypanocidal drugs. It is concluded that trypanosomiasis is a disease to be considered in the cattle regions studied as the cause of outbreaks. Hygienic and security actions must be taken during the administration of oxytocin in lactating cows being this practice, when carried incorrectly and without hygienic crtiterios and sharing needles, the main risk factor in the transmission of trypanosomiasis in leiteitos herds among regions where the disease is prevalent, increasing the challenge of reinfection of animals.

Keyword: diagnosis, disease, ruminant, hemoparasite

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1.

Figura 1. Localização geográfica dos 20 municípios, pontos azuis, pertencentes ao Agreste Meridional do estado de Pernambuco, responsáveis por 80% da produção de leite do estado..... 20

Figura 2. Forma tripomastigota sanguínea. Cinetoplasto (C); Núcleo (N) e Flagelo (F). Retirado de: **SILVA, et al, 1995**..... 23

Figura 3. Distribuição de *T. vivax* no Brasil..... 25

CAPITULO 2.

Figura 1. Diagnóstico parasitológico, sorológica e molecular da tripanossomose em três propriedades leiteiras..... 76

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 2%. Os amplímeros mostrados na foto correspondem a; (1) marcador de peso molecular em escala de 50 pares de bases (Invitrogen®); (2) controle positivo; (3) controle Negativo; (4-9,11,15-18) amostras negativas; (10, 12-14) amostras positivas.....76

Figura 3. *T. vivax*, oito meses após surto na propriedade 2.....76

APÊNDICE

Figura 4. Animal apresentando diarreia, escore corporal grau II na propriedade do primeiro surto..... 86

Figura 5. Rebanho acometido pelo *T. vivax* da propriedade do segundo surto..... 86

Figura 6. Rebanho da propriedade do terceiro surto acometido por *T. vivax*..... 86

Figura 7. Bovinos mortos na propriedade do primeiro surto..... 87

Figura 8. Mucosa ocular pálida de bovino da propriedade do primeiro surto..... 87

Figura 9. Agulhas e seringas contaminadas por sangue utilizadas nos animais em lactação na propriedade do segundo surto..... 87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Ocorrência da tripanossomose bovina em alguns estados do Brasil..... 26

CAPITULO 2

Tabela 1. Hemogramas de bovinos (n =13) naturalmente acometidos por *Trypanosoma vivax*..... 72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AST - Aspartato aminotransferase
CK – Creatina quinase
DAI - Dia pós-infecção
DNA - Ácido desoxirribonucleico
ECC - Escore de condição corporal
EDTA - Ácido etileno diamino tetracético
ELISA- Enzyme-linked immunoabsorvent assay
FA – Fosfatase alcalina
GGT – Gama glutamiltransferase
IgG – Imunoglobulina - G
IL-1 – Interleucina-1
IL-2 - Interleucina-2
INF- γ – Interferon γ
IMA- Instituto Mineiro de Agropecuária
Kg – Kilograma
KDa- kilodalton
LAMP - Loop-mediated isothermal amplification
LDH- Lactatodesidrogenase
mg – miligrama
mL – mililitro
mmol – milimol
 μ mol – micromol
PBS – Tampão fosfato salino
PCR- Reação em cadeia da polimerase
PFAs- Proteínas de fase aguda
RIFI- Reação de imunofluorescência indireta
TCH- Técnica de centrifugação de hematócrito
TNF- α – Fator de Necrose tumoral α
VAT- Variante antigênico
VG- volume globular

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	12
CAPÍTULO 1.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específico.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Bovinocultura leiteira no agreste meridional de Pernambuco e Alagoas.....	17
3.2 Tripanossomose em bovinos.....	19
3.2.1 Definição.....	19
3.2.2 Aspectos etiológicos.....	20
3.2.3 Fatores epidemiológicos.....	21
3.2.3.1 Distribuição Geografica e Prevalência.....	21
3.2.3.2 Mecanismos de transmissão.....	25
3.2.4 Ciclo Biológico.....	26
3.2.5 Patogenia e Evasão do Sistema Imune do Hospedeiro.....	28
3.2.6 Achados clínicos.....	30
3.2.7 Alterações hematológicas.....	32
3.2.8 Alterações anatomopatológica e histológica.....	35
3.2.9 Diagnóstico.....	36
3.2.9.1 Métodos parasitológicos.....	37
3.2.9.2 Métodos sorológicos.....	38
3.2.9.2.1 Reação de Imunofluorescência.....	38
3.2.9.2.2 Ensaio Imunoenzimatico Indireto.....	39
3.2.9.3 Métodos moleculares.....	41
3.2.9.4 Sequenciamento do DNA.....	43
3.2.10 Tratamento.....	43
3.2.11 Controle.....	46
3.2.12 Referências.....	48
CAPÍTULO 2	64
4. ARTIGO CIENTÍFICO	64
ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO DE BOVINOS LEITEIROS NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Tripanosoma vivax</i> NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS, BRASIL.....	64
Abstract.....	64
Resumo.....	65
Introdução.....	65
Material e Métodos.....	66
Resultados.....	70
Discussão.....	74
Conclusão.....	77
Referências.....	78
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
6. APÊNDICE.....	83
7. ANEXO.....	85

CAPITULO 1

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA EPIDEMIOLÓGICA DA TRIPANOSSOMOSE EM REBANHOS LEITEIROS NAS REGIÕES DO AGRESTE DOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E ALAGOAS, BRASIL.

1. INTRODUÇÃO

A Tripanossomose é uma doença causada por protozoários patogênicos pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, gênero *Trypanosoma* podendo acometer o homem, animais domésticos e silvestres, causando perdas econômicas significantes, especialmente em países da África e nas Américas (GONZATTI et al., 2014; DAGNACHEW E BEZIE, 2015). Na África as perdas econômicas são enormes, estima-se que 4,5 bilhões de dólares são gastos anualmente, cerca de três milhões de bovinos são mortos e aproximadamente 35 milhões de doses de medicamentos são administradas no combate à doença (FAO, 2004; SCHOFIELD E KABAYO, 2008).

Na América do Sul, em países como Colômbia e Venezuela, a tripanossomose é endêmica, considerada na Colômbia como a terceira doença parasitária de maior importância com prevalência de 48,2%, e na Venezuela a prevalência é em torno de 78% (WELLS, 1982; RIVERA, 1996). Na região do Pantanal do Brasil e das planícies baixas da Bolívia, estimou-se um custo equivalente de 17% do valor total do animal (SEIDL et al., 1999), podendo exceder \$160 milhões (DÁVILA E SILVA, 2000). No estado de Minas Gerais, Abrão et al. (2009) relataram uma redução de 27% na produção de leite e queda de 45% na taxa de prenhez em um surto da doença; e no estado de Goiás, 25% de queda na produção de leite foi observada quatro dias após o início de um surto (BARBOSA et al., 2015).

No estado de Pernambuco foi realizado o primeiro registro da infecção na zona da mata, (PIMENTEL et al., 2012), e o primeiro inquérito sorológico para detecção de

anticorpos contra *T. vivax* confirmou em todas as mesorregiões estudadas (Litoral, Zona da Mata, Agreste e Sertão) frequências de 11,90% a 15,99%, caracterizando o estado como área de instabilidade enzoótica (GUERRA et al., 2013). No estado de Alagoas não há estudos da prevalência da tripanossomose.

A taxa de mortalidade em animais infectados pelo parasita geralmente é alta, podendo chegar a 80% (CORTEZ et al., 2006). Os principais sinais clínicos incluem apatia, anorexia, diminuição abrupta da produção de leite, emagrecimento progressivo, mucosas pálidas, diarreia, fraqueza, linfonodos aumentados e febre, assim como sérios danos reprodutivos em bovinos e ovinos, como abortos, distorcias e infertilidades. Alterações nervosas também são observadas, como agressividade, incoordenação e ataxia (BATISTA et al., 2012).

Nesse contexto, os efeitos da tripanossomose bovina despontam como um dos principais responsáveis por acarretarem prejuízos econômicos oriundos da baixa produtividade dos animais, mortalidade, gastos com o tratamento e medidas de controle da doença, em áreas onde a enfermidade é prevalente (PAIVA et al., 2000).

No período compreendido entre dezembro de 2013, janeiro e outubro de 2014, em propriedades localizadas no agreste dos estados de Pernambuco (Bom Conselho, Pedra) e Alagoas (Arapiraca), foram diagnosticados três surtos de *Trypanosoma vivax*, acarretando sérios danos a produção leiteira nestas regiões, aliada à alta taxa de mortalidade dos animais, motivando a realização deste estudo, tendo em vista o desconhecimento prévio desta enfermidade e o impacto que geraria para a bacia leiteira das regiões.

Diante do exposto, se propôs realizar um estudo sobre a tripanossomose nesta região, estabelecendo sua ocorrência, por meio da caracterização dos principais achados clínicos, aliado aos principais fatores epidemiológicos envolvidos, procurando identificar os principais fatores de risco envolvidos a fim de minimizar o impacto econômico representado por esta parasitose nestas regiões.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar os aspectos etiológicos, clínicos e os fatores epidemiológicos da tripanossomose em bovinos leiteiros criados no agreste dos estados de Pernambuco e de Alagoas.

2.2 ESPECÍFICOS

Caracterizar os principais achados clínicos e laboratoriais dos animais acometidos pela doença, bem como o acompanhamento destes, por meio de um estudo prospectivo por um período de um ano.

Avaliar o hemograma, proteína plasmática e fibrinogênio dos animais acometidos.

Identificar o agente pela técnica do esfregaço sanguíneo.

Avaliar sorologicamente os animais pertencentes aos rebanhos envolvidos através das técnicas de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA).

Realizar o diagnóstico molecular através do uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) das amostras colhidas e obter a identidade do parasito por meio da realização de Sequenciamento do DNA de amostras positivas.

Conhecer os fatores epidemiológicos de risco associados ao hospedeiro, ambiente e vetores, com a ocorrência da doença e sua forma de transmissão.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BOVINOCULTURA LEITEIRA NO AGRESTE DE PERNAMBUCO E ALAGOAS.

A pecuária brasileira de exploração leiteira a cada ano constitui importante atividade econômica para o país, colocando o Brasil na quinta posição mundial de produção de leite. Aliada a uma forte competição no setor lácteo associada a exigência dos consumidores por produtos mais seguros, a cadeia leiteira está constantemente evoluindo e buscando melhorias em termos socioeconômicos, tecnológicos e ambientais (EMBRAPA, 2012b).

Entretanto, o Brasil é pouco eficiente levando em conta a produtividade de leite por animal. Em 2014, a produção de leite no país foi de 35,17 bilhões de litro, o país ocupou, a segunda posição mundial em relação ao efetivo de vacas ordenhadas, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA), ficando atrás apenas da Índia, que possui o maior rebanho de bovinos do mundo (IBGE, 2014).

É dado como característica marcante da produção primária do leite no Brasil a predominância de produtores pouco especializados, produção sazonal, pequenos volumes por produtor (40-50 litros/dia). A produção de leite no país apresenta heterogeneidade de situações, indo desde o produtor especializado (raças puras, alimentação e sanidade adequadas, economia de escala, etc.) até o produtor de gado de corte, para o qual o leite é um subproduto do bezerro capaz de gerar pequena renda mensal (ZOCCAL et al., 2009).

A região Nordeste vem apresentando aumento na participação da produção de leite do país e os maiores representantes da região são os estados da Bahia e Pernambuco ocupando a sétima e oitava colocação produzindo 1.354.714 mil litros e 964.769 mil litros, respectivamente (EMBRAPA, 2012a). No estado de Pernambuco destaca-se o território do Agreste Meridional (Figura. 1) com área de 13.153 km². Atualmente esse território é composto por 20 municípios: Águas Belas, Buíque, Iati, Ibimirim, Inajá, Itaíba, Pedra, Venturosa, Angelim, Bom Conselho, Caetés, Capoeiras, Garanhuns,

testes de tuberculose, brucelose e vacinas para outras enfermidades são realizadas em poucas propriedades.

A sanidade do rebanho do agreste meridional em sua grande maioria é considerada deficiente e por isso aliado as condições de sazonalidades de ofertas de volumosos de bom valor nutricional e água, assim como práticas inadequadas de manejo, são fatores que limitam a exploração leiteira nessa região, tornando-a pouco eficiente. Priorizar medidas que visem diminuir a dispersão de agentes infecciosos e parasitários melhorando as condições sanitárias do rebanho, nutricionais e de manejo são cruciais para torna-se eficiente na atividade leiteira (MONTEIRO et al. 2007).

Segundo Dutra et al., (2005) os desafios da produção animal são enormes e seus reflexos na sanidade estão relacionados ao aumento na suscetibilidade às enfermidades, aos gastos expressivos com medicamentos, à baixa fertilidade, à resposta imune insatisfatória nos programas de vacinação, à ocorrência de mortes e aos baixos índices zootécnicos. Nesse sentido se encaixam, as práticas incorretas de manejo como; o não uso de período de quarentena, manejo higiênico sanitário na ordenha deficientes, uso de medicamentos com compartilhamento de agulhas e seringas, baixa oferta de volumoso, instalações mal implantadas, aumento da população de vetores o que favorecem a disseminação de agentes infecciosos no rebanho. Em consequência do manejo incorreto nas propriedades rurais, os rebanhos ficam susceptíveis as infecções por agentes patogênicos como, por exemplo, o *Trypanosoma* spp.

3.2 TRIPANOSSOMOSE EM BOVINOS

3.2.1 DEFINIÇÃO

A Tripanossomose causada pelo hemoparasito, *Trypanosoma* spp é uma doença parasitária de evolução aguda, subaguda ou crônica que acomete principalmente bovinos, búfalos, equinos, caprinos, ovinos e animais silvestres. Caracterizando clinicamente por apresentar crise hemolítica extravascular levando a grave anemia, febre, fraqueza, anorexia, perda de peso progressiva, diarreia, linfadenopatia, sinais nervosos, abortos e alta mortalidade (GARDINER, 1989; LOSOS e IKEDE, 1972).

3.2.2 ASPECTOS ETIOLÓGICOS

As tripanossomoses são causadas por espécies do gênero *Trypanosoma*, pertencentes ao Reino Protista, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Kinetoplastida, sendo esta ordem dividida em duas Subordens; Bodonina e Trypanosomatina. A sub-ordem Trypanosomatina contém uma única família, Trypanosomatidae, que por sua vez contém oito gêneros (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Phytomonas*) (HOARE, 1972; SILVA et al., 2002).

Esses protozoários se caracterizam pela presença da organela cinetoplasto localizada na base do flagelo a qual contém o material genético do parasito, o DNA mitocondrial. A morfologia dos tripanossomas podem ser caracterizadas desde formas mais delgadas com a porção posterior da célula arredondada, até formas largas e curtas denominadas formas “atarracadas”, com a região posterior final do corpo mais estreita, membrana ondulante evidente e cinetoplasto menor (HOARE, 1972). O comprimento total varia entre 21 e 25,4 µm, possuindo um único flagelo livre. Seu cinetoplasto é grande, em forma de meia lua e localizado na porção terminal ou subterminal, sendo a sua posição um fator de identificação morfológica da espécie (Figura. 2) (STEVENS e BRISSE, 2004).

Das tripanossomoses bovinas no continente africano, três espécies se destacam pela atuação conjunta e quase sinérgica, que são: *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*, *Trypanosoma (Duttonella) vivax*, e *Trypanosoma (Trypanosoon) brucei*. Estas espécies, frente às condições existentes no continente africano, provocam grandes prejuízos à pecuária e, em algumas regiões, constituem fator impeditivo à atividade econômica. O *T. congolense* causa uma doença conhecida por nagana na África, o *T. evansi* causa a surra uma doença de bovinos na Índia (SILVA et al., 2004).

Na América do Norte, o *T. theileri* é o único agente relatado e é principalmente de interesse acadêmico por ser relativamente não patogênico, este ocasionalmente é visto livre no plasma de esfregaços de sangue de bovinos, sendo que raramente produz sinais clínicos com exceção quando em alta parasitemia. Na América do Sul, as tripanossomoses em animais domésticos são causadas por *Trypanosoma cruzi*, *T. theileri*, *T. equiperdum*, *T. evansi* e *T. vivax*, sendo os três últimos os mais patogênicos e de maior importância veterinária (MADRUGA, 1964).

No Brasil, a espécie *T. vivax* é, em maior parte dos casos, a responsável por causar doença em bovinos (SILVA et al., 2004; BATISTA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; CADIOLI et al., 2012; GUERRA et al., 2013). Entretanto o *T. evansi* que afeta principalmente equinos também pode causar doença clínica em bovinos (SILVA et al., 1995; HERRERA et al., 2004; DA SILVA et al., 2007;). Devido a esse fato, ambos se destacam como importantes hemoparasitos causadores da tripanossomose em bovinos no país.

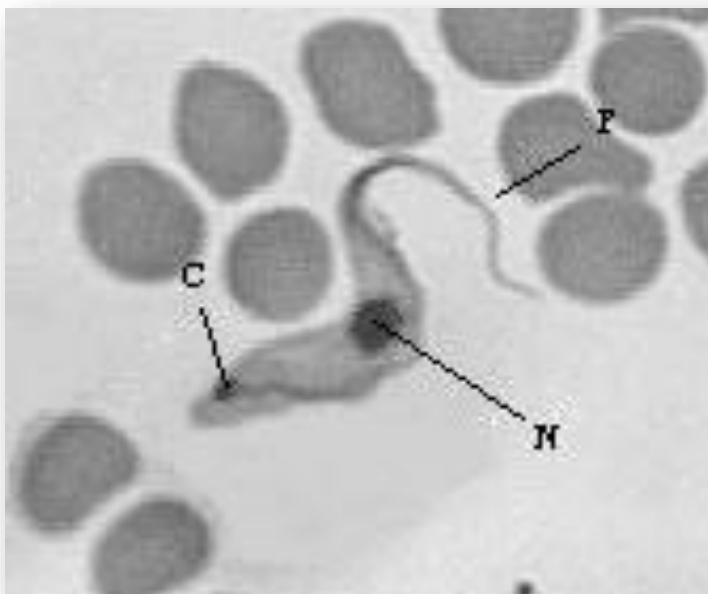


Figura 2. Forma tripomastigota sanguínea. Cinetoplasto (C); Núcleo (N) e Flagelo (F). Retirado de: **SILVA, et al, 1995.**

3.2.3 FATORES EPIDEMIOLÓGICOS

3.2.3.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E PREVALÊNCIA

As Tripanossomoses têm larga distribuição na África, principalmente em áreas ocupadas pela mosca tsé-tsé (*Glossina* spp) (GARDINER, 1989). No Oeste da África, *Trypanosoma vivax* é considerado o mais patogênico e importante tripanossoma de bovinos. A ampla distribuição geográfica de *Trypanosoma vivax* fora do seu local de origem, o continente africano, é atribuída a sua habilidade de adaptação à transmissão mecânica por insetos hematófagos tais como *Tabanus* spp e *Stomoxys* spp o que permitiu

a expansão de *T. vivax* para América Central, América do Sul e Caribe (ANOSA, 1983; SILVA, et al. 2003).

Estudos morfológicos (GARDINER, 1989), genéticos (VENTURA et al., 2000) e bioquímicos (DIRIE et al., 1993) demonstraram similaridade entre isolados de *T. vivax* sul-americanos com isolados do Oeste da África, que se caracterizam por apresentar alta patogenicidade. No entanto, verifica-se baixa frequência de manifestação clínica da doença no continente americano, o que não se deve à falta de patogenicidade de *T. vivax*, e sim às características epidemiológicas e formas de transmissão do parasito (STEPHEN, 1986).

No continente americano o estabelecimento da espécie de *T. vivax* ocorreu, segundo WELLS (1984), pela importação de espécies domésticas pelos colonizadores portugueses e espanhóis de gado do Senegal em 1830 para a Guiana Francesa e ilhas de Martinica e Guadalupe. Considerando a diversidade ecológica existentes no novo mundo, apenas *T. vivax* conseguiu manter-se na ausência do vetor biológico (*Glossina morsitans*, *G. pallidipes* e *G. swynnertoni* adaptando-se à transmissão mecânica por insetos nativos do grupo dos tabanídeos (Subordem Brachycera, família Tabanidae) e por *Stomoxys calcitrans*. Esta adaptação mostrou-se irreversível, pois as amostras da população sul-americana perderam a capacidade de infectar moscas tsé-tsé (WOO, 1970; DIRIE et al., 1993); além do que, apesar de fenotipicamente semelhantes ao serodema da costa oeste da África, amostras de populações americanas diferem antigenicamente das amostras africanas (DIRIE et al, 1993).

A infecção natural deste hemoparasito já é bem conhecida e relatada em vários países da América do Sul e Central: Venezuela, Paraguai, Colômbia, Suriname, Guiana, Bolívia, Peru, Costa Rica, Equador, Argentina (DESQUENES et al., 1993; SILVA et al., 1998; JONES et al., 2001; QUISPE et al., 2003; SUAREZ et al., 2009; MONZON, et al., 2010; HENRY, et al., 2014).

No Brasil, os primeiros surtos de *T. vivax* ocorreram no estado do Pará em ruminantes (BOULHOSA, 1946; SHAW et al., 1972) e a partir de então vários outros foram relatados no país (Figura 3) como no Mato Grosso (SILVA et al., 1996), Amapá e Rio de Janeiro (MADRUGA et al., 2006), Paraíba (BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008; BATISTA et al., 2012), Tocantins (LINHARES et al., 2006), Maranhão (GUERRA et al., 2008), Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008; CUGLOVICI et al., 2010, FRANGE, et al., 2013), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009), Santa Catarina

(DA SILVA et al. 2007), São Paulo (CADIOLI et al., 2012), Goiás (BASTOS, et al., 2015).

No estado de Pernambuco o qual é ligado economicamente ao comércio de gado ao estado do Maranhão, onde já foram descritos surtos do *T. vivax* (GUERRA et al., 2008), a ocorrência desta doença é considerada pouco frequente. Nesse estado, foi realizado o primeiro registro na zona da mata, (PIMENTEL et al., 2012), e o primeiro inquérito sorológico para detecção de anticorpos contra *T. vivax* confirmou em todas as mesorregiões estudadas (Litoral, Zona da Mata, Agreste e Sertão) frequências de 11,90% a 15,99% caracterizando o estado como área de instabilidade enzoótica (GUERRA et al., 2013).



Figura 3. Distribuição de *T. vivax* no Brasil.

No Brasil, a situação epidemiológica, com exceção da região Norte e do Pantanal, onde a doença tem caráter endêmico, é dada, em sua maioria, pelo relato de surtos ou de trabalhos epidemiológicos bastante pontuais (Tabela. 1). As diferenças epidemiológicas encontradas da tripanossomose em diversas áreas do Brasil mostra que o *T. vivax* está distribuído de forma endêmica em algumas localidades, como no pantanal Mato-grossense, mas em regiões caracterizadas como zona de instabilidade enzoótica é

extremamente importante o conhecimentos dessas áreas para controlar há ocorrência de surtos e evitar alta mortalidade dos hospedeiros (PAIVA et al., 2000; MADRUGA et al., 2006; BATISTA et al., 2012; GUERRA et al., 2013).

Tabela 1. Ocorrência da tripanossomose bovina em alguns estados do Brasil.

ESTADO	OCORRÊNCIA (%)	REFERÊNCIA
PARÁ	30,7 (ELISA)	MADRUGA, et al (2006)
	93, 1 (ELISA)	GUEDES JUNIOR, et al (2008)
MATO GROSSO	54 (RIFI)	WELLS, et al, (1977)
	34,5 (TCH)	SILVA, et al, (1996)
	56 (ELISA)	MADRUGA, et al., (2006)
PARAÍBA	49,2 (vacas) (<i>Buffy Coat</i>)	BATISTA, et al, (2007)
	32 (bezerros)	
	13,3 a 46,6 (vacas) (<i>Buffy Coat</i>)	BATISTA, et al, (2012)
	63,3 a 80 (bezerros)	
MARANHÃO	1,06 a 6,21 (PCR)	MELO, et al (2011)
PERNAMBUCO	11,9 a 15,99 (RIFI)	GUERRA, et al., (2013)
MINAS GERAIS	35,7 (PCR)	GUCLOVICI et al., (2010)
	7,4 a 47 (RIFI)	
	16,2 (RIFI)	FRANGE et al., (2013)
	50 (TCH)	
	2,38 (RIFI)	MENESES, (2016)
SÃO PAULO	98,36 (ELISA)	CADIOLI, et al., (2012)

1 RIFI (Reação de Imunofluorescência indireta), ELISA (Ensaio Imunoenzimático ligado a enzima), TCH (técnica de centrifugação de hematócrito) realizada conforme Woo (1969); *Buffy coat* realizado de acordo com Murray et al. (1977); PCR (reação em cadeia da polimerase). *Adaptado*: Meneses, 2016.

Nos dias atuais, a ocorrência da tripanossomose bovina vem preocupando muitos criadores em vários estados do Brasil, em especial o estado de Minas Gerais. No ano de 2014 surtos de tripanossomose ocorridos na região central mineira contabilizaram prejuízos e mortes de mais de 500 animais o que reduziu a produção leiteira em cerca de 60%, tornando essa doença uma preocupação, uma vez que o estado detém 30% da produção leiteira nacional e comercializa recursos genéticos para todo o país. Em 2015, em todo o estado mineiro, foram envolvidos 1.891 bovinos em 22 propriedades que registraram animais doentes. Os números podem ser muito maiores, uma vez que a doença é subnotificada (IMA, 2015).

3.2.3.2 MECANISMOS DE TRANSMISSÃO

A mais significativa fonte de infecção para os rebanhos são animais infectados sintomáticos ou portadores assintomáticos. A principal forma de introdução da tripanossomose em um rebanho é a aquisição de animais infectados, entretanto, os novos focos de tripanossomose em áreas em que o *T. vivax* não havia sido detectado anteriormente está baseada na introdução de animais portadores, manejo inapropriado dos bovinos e a presença também de vetores mecânicos (CARVALHO et al., 2008; SILVA et al., 2009; CUGLOVICI et al., 2010; CADIOLI et al., 2012).

Diversos animais selvagens e domésticos podem assumir papel importante como reservatórios do *Tripanosoma* spp em condições de introduzir ou reintroduzir a doença em rebanhos bovinos. Os animais domésticos com infecção crônica, cervídeos, gambás e capivaras, podem ser reservatórios naturais de *T. vivax*, cabras e búfalos são conhecidos reservatórios, porém podem desenvolver a doença; ovinos e bovinos, são bastante susceptíveis à infecção por *T. vivax* (NUNES et al., 1993; BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008).

O *T. vivax* não causa doença no homem, apenas o *Tripanosoma cruzi*, agente etiológico da doenças de chagas ou tripanossomose americana tem caráter zoonótico (HOARE, 1972). Na África este hemoparasito é transmitido ciclicamente por dípteros hematófagos do gênero *Glossina* spp (moscas *tsé-tsé*), entretanto, nas Américas Central e do Sul e na Ásia a transmissão é mecânica pelos dípteros do gênero *Tabanus*, *Stomoxys* e pela via iatrogênica através de fômites, principalmente em aplicações de medicamentos em que se utiliza a mesma agulha e seringa entre os animais, (PAIVA et al., 2000; VENTURA et al., 2000; OSORIO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; CADIOLI et al., 2012).

Apesar da evidência da transmissão vertical transplacentária por *T. vivax* em bovinos e ovinos (BATISTA et al., 2012), a importância epidemiológica desse tipo de transmissão é pouco conhecida. Especula-se que esse tipo de transmissão está associada com a ocorrência de abortos, prematuridade, retardo da involução uterina e mortalidade perinatal. A transmissão transplacentária foi confirmada pela primeira vez em 1972 pelo achado de alta parasitemia no sangue quatro horas após o nascimento de cordeiros de ovelhas experimentalmente inoculadas com *T. vivax* no terço final da gestação (LOSOS e IKEDE, 1972).

A infecção pelo *T. vivax* se propaga nos animais independentemente do sexo, da raça ou da idade. A introdução e a manutenção da doença em um rebanho é fortemente influenciadas por características da unidade de criação, entre as quais se destacam o tipo de exploração, o tamanho do rebanho, densidade populacional de vetores, animais portadores assintomáticos, e as práticas zootécnicas e sanitárias (MADRUGA, et al., 2006).

O uso da mesma agulha para diversos animais durante campanhas de vacinação tem grande impotência na disseminação de *T. vivax* (DÁVILA e SILVA, 2000). Surtos ocorridos em Mato Grosso (BASTOS et al., 2015) e em Goiás (BARBOSA et al., 2015), foram relacionados à administração diária de ocitocina em vacas, via intravenosa, anterior à ordenha, para auxiliar na ejeção do leite, empregando-se a mesma agulha e seringa para todos os animais.

Atualmente, no Brasil, observa-se que a doença é mais frequente em rebanhos leiteiros do que em rebanhos de corte. Isso se deve, basicamente, pela adoção de práticas incorretas de manejo que estão sendo utilizadas nas propriedades rurais, dentre estas o uso de ocitocina com compartilhamento de agulha e seringas entre os animais da lactação. O que após a entrada de animais portadores no rebanho, a doença é facilmente propagada. Embora, em bovinos de corte a transmissão por vetores mecânicos assume maior importância, estes em áreas endêmicas ficam submetidos as mesmas condições de risco (LINHARES et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; CUGLOVICI et al., 2010, FRANGE, et al., 2013; BASTOS, et al., 2015).

3.2.4 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo de vida dos tripanossomas é digenético, ou seja, necessitam de dois hospedeiros para completa-lo, vertebrado e invertebrado. Nesse curso passam por vários estágios de desenvolvimento: amastigota, promastigota, epimastigota e tripomastigota (estágio tripanossomo “verdadeiro”). Nos hospedeiros vertebrados, os estágios tripomastigotas e ocasionalmente epimastigotas ocorrem no sangue e nos tecidos corporais. As quatro formas podem ocorrer no hospedeiro invertebrado (vetor) ou em cultura (HOARE, 1972).

Na África, o ciclo do *T. vivax* tem vetor biológico, as moscas do gênero *Glossina* spp. (tsé-tsé), e secundariamente o ciclo mecânico por outras moscas hematófagas. Nas Américas, o *T. vivax* perdeu a capacidade de se desenvolver ciclicamente, se adaptando a transmissão mecânica por insetos hematófagos da família Tabanidae, Muscidae e Hippoboscidae (PAIVA et al., 2000).

Nos vetores biológicos o ciclo do parasito é confinado à região da probóscide da mosca, podendo haver uma invasão no intestino médio, onde o parasito não sobrevive por longo tempo. A maturação do tripanossoma está relacionada com a modulação da superfície de revestimento por glicoproteínas e a perda da adesão flagelar das formas epimastigotas (HOARE, 1972; GARDINER, 1989). Os vetores ao ingerirem as formas sanguíneas tripomastigotas durante a hematofagia no hospedeiro infectado, estas ficam localizadas no esôfago e faringe desenvolvendo-se em formas epimastigotas. Após 24 horas as formas epimastigotas migram em direção ao canal alimentar onde se multiplicam intensivamente e localizam-se nas paredes do labro. Posteriormente essas formas migram em direção à hipofaringe onde se desenvolvem para tripomastigotas, e depois em formas infectantes tripanossomas metacíclicos, também chamadas “metatripanosomas” (SILVA et al., 2002).

O desenvolvimento dos tripanosomas nos hospedeiros mamíferos é relativamente simples. As formas sanguíneas dos tripanosomas são inoculadas pelos insetos hematófagos durante a hematofagia. O sucesso na transmissão pode normalmente ser efetuada somente após o parasita ter completado seu ciclo de desenvolvimento no hospedeiro intermediário e produzido os metatripanosomas. Os estágios intermediários no vetor não são infectivos para o hospedeiro vertebrado (HOARE, 1972; GARDINER, 1989).

Inicialmente, após a inoculação dos tripanossomas metacíclicos por *Glossina* spp durante a hematofagia, na pele, forma-se a primeira manifestação clínica denominada “cancro de inoculação”. Isso ocorre com mais frequência com as cepas africanas. Essa lesão primária ocorre em virtude da inflamação e é transitória, caracterizando macroscopicamente pelo desenvolvimento de uma região tumefeita e circunscrita que em corte histológico apresenta grande número de tripanossomas e infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares e mononucleares (GARDINER, 1989).

Após a multiplicação no local da picada, os tripanossomas invadem os nódulos linfáticos que drenam o local e após ganham a corrente sanguínea (GARDINER, 1989;

CONNOR et al., 2004). Ocorre a rápida multiplicação por divisão binária da forma tripomastigota no sangue promovendo um gradual aumento da parasitemia, seguindo então as primeiras manifestações clínicas da fase aguda, causando ataques febris e reações inflamatórias (LUCAS et al., 1992).

No caso da transmissão mecânica, as formas sanguíneas dos tripanossomas são transferidas diretamente de um mamífero, para outro, por insetos hematófagos (p.ex. espécies de Tabanidae e Stomoxyidae) ou artificialmente por agulhas contaminadas com sangue infectado. No caso da transmissão mecânica com agulhas, pode-se dizer também que é uma infecção com ação de veículo. Em contraste com a transmissão cíclica, que pode ser tão longa quanto for a vida do vetor, a habilidade para transmitir os tripanossomas mecanicamente é de curta duração (geralmente mensuradas em minutos), dependendo da sobrevivência dos parasitos nas peças bucais do inseto (SILVA et al., 2002).

3.2.5 PATOGENIA E EVASÃO DO SISTEMA IMUNE DO HOSPEDEIRO

A patogenia da tripanossomose em ruminantes sofre variação de acordo com fatores inerentes ao parasito como; a cepa do tripanossoma envolvido e a sua migração extracelular, fatores relativos ao hospedeiro como; espécie do hospedeiro, estresse e outras afecções concomitantes e fatores ambientais como as condições epizootiológicas locais e a prevalência de vetores. A interação desses fatores influencia o curso da infecção que pode ser aguda, subaguda ou crônica, apresentando sinais clínicos diversos (MERKURIA et al., 2011).

O pico parasitemico da infecção por *T. vivax* é variável, dependendo do hospedeiro e do parasito. Em ovinos e caprinos, dura de quatro a 12 dias. Em bovinos, varia de nove a 14 dias para os isolados virulentos, e de nove a 59 dias em infecções com cepas menos patogênicas. Parasitemia por *T. vivax* apresentam flutuações irregulares, como regra geral, no entanto, um período inicial de parasitemia vai durar por vários meses antes de se tornar indetectável no sangue. Após essa fase, períodos de recorrência podem ocorrer (HOARE, 1972; MORAES, 2001). Os períodos de flutuações da parasitemia ou os intervalos aparasitêmicos (MORAES, 2001; ALMEIDA et al., 2010), podem estar relacionados à resposta imunológica do hospedeiro e à variação antigênica (VATs) das glicoproteínas variantes de superfície (GVS) dos tripanossoma (NANTULYA, 1990; CROSS, 2003).

As GVS são glicoproteínas que revestem *Trypanosoma* spp e possuem papel na evasão do sistema imune do hospedeiro. Essas proteínas de superfície não só são as proteínas mais abundantes no tripanossoma, como também as mais imunogênicas. As GVS do *T. vivax* também estimulam o hospedeiro, a produzir IL-1 e TNF- α (VINCENDEAU et al, 2006), as quais podem levar à supressão de eritropoiese (ANOSA et al, 1992) e à produção de proteínas de fase aguda (PFAs) (HEINRICH et al, 1990).

A resposta imune humoral é relevante contra a infecção por tripanossoma, pela sua localização extracelular. Os linfócitos T participam controlando a infecção por meio da produção de citocinas como a interleucina (IL)-2, que atuam em linfócitos B e nos próprios linfócitos T, os quais produzem interferon (INF)- γ , que participa na ativação de macrófagos que vão atuar no controle da tripanossomose. A eliminação do tripanossoma é resultado da ação de anticorpos, do complemento e das células fagocíticas. Os parasitos são destruídos em grande parte pelas células de Kupffer no fígado (MADRUGA et al., 2006).

Um aspecto importante da imunidade contra tripanossoma é que quando um bovino se infecta por um tripanossoma com um tipo de VAT em particular, uma resposta humoral forte e rápida se desenvolve, protegendo-o contra este VAT, mas não contra outras. A variação antigênica permite ao hemoparasito escapar desses mecanismos imunes, fazendo com que novas respostas tenham que ser montadas contra sucessivas VATs (WHITELOW et al., 1989).

Um fato bem caracterizado na tripanossomose bovina é a imunossupressão, que não se limita a resposta específica aos antígenos do tripanossoma, mas também de outros agentes infecciosos. Os animais que não controlam a infecção desse hemoparasito produzem menos IgG que os animais resistentes, sugerindo que a produção dessa imunoglobulina está inibida assim como os níveis séricos de complemento nos animais susceptíveis, o que resulta em uma deficiência na fagocitose e da atividade imunomoduladora do complemento o que participa na produção de IgG e na formação de células de memória (WILLIAMS et al., 1996).

Em uma primo-infecção os anticorpos produzidos, podem eliminar cerca de 90% da população original do hemoparasito, no entanto, uma parte destes altera a constituição das GVS e a nova glicoproteína não é reconhecida pela resposta imune inicial (MADRUGA et al., 2006), um fato interessante que, bovinos da raça N' Dama apresentam resistência natural contra tripanossoma, chamados tripanotolerantes,

evidências sugerem que esses animais possuem as células T CD8 e T $\gamma\delta$ aumentados em relação a animais susceptíveis (DÁVILA e SILVA, 2000).

Os aspectos de patogenia do *T. vivax* são variáveis também entre regiões; mesmo na África, há diferenças de manifestações clínicas entre as populações do agente da costa leste e oeste, em que as primeiras seriam responsáveis por um quadro crônico e as últimas por formas aguda. Diversos autores atribuem maior potencial patogênico ao serodema da costa oeste, justamente de onde se originou a população inicial do agente para a América do Sul. (WHITELAW, et al., 1989).

Em regiões endêmicas a tripanossomose assume caráter subclínica, embora cause consideráveis perdas na produção. Animais recuperados da doença pode se tornar reservatórios, com baixa parasitemia ou mesmo aparasitemicos em esfregaços sanguíneos e afebris. Na fase aparesitemica, os tripanossomas podem ser encontrados extravascularmente, em nódulos linfáticos, líquido sinovial, humor aquoso e no líquido cerebroespinhal (HOARE, 1972; WHITELAW et al., 1989; TUNTASUVAN et al., 1997).

A patogênese das lesões teciduais varia de acordo com a espécie de tripanossoma. O *T. vivax* são parasitos principalmente intravasculares; induzem alterações no endotélio dos capilares e, dessa forma, causam lesões indiretas aos tecidos adjacentes. Nesses casos, a anemia tem papel secundário na infecção, devido às alterações inflamatórias, degenerativas e necróticas resultantes da invasão dos tripanossomas nos espaços extravasculares (LOSOS e IKEDE, 1972). Dessa maneira, os achados clínicos dependem da distribuição dos parasitos nos tecidos e da gravidade das lesões induzidas nos diferentes órgãos e tecidos (GIBSON, 1998).

3.2.6 ACHADOS CLÍNICOS

A taxa de mortalidade em animais infectados pelo parasito geralmente é alta, podendo chegar a 80% (CORTEZ et al., 2006). Os principais sinais clínicos incluem emagrecimento progressivo, linfadenopatia, palidez das mucosas, diarreia, fraqueza e febre, assim como sérios danos reprodutivos, como aborto, distocia e infertilidade. Alterações nervosas também são observadas, como agressividade, incoordenação e ataxia (LINHARES et al., 2006; BATISTA et al., 2007; CUGLOVICI et al., 2010; BATISTA et al., 2012).

O curso da infecção por *T. vivax* em bovinos pode apresentar-se na forma aguda, (LOSOS e IKEDE, 1972); subaguda, que resulta em morte dentro de poucas semanas após a infecção (GARDINER, 1989); e a forma crônica, caracterizada por anemia e emaciação progressiva (UNSWORTH et al, 1952) associadas à baixa parasitemia e progressivo desenvolvimento da doença (GARDINER,1989).

As manifestações clínicas na fase aguda caracterizam-se por anorexia, letargia, febre intermitente, adenopatia generalizada, palidez de mucosas, lacrimejamento, conjuntivite, diarreia, abortos, incoordenação motora, tremores musculares e cegueira. Em algumas ocasiões morte em menos de uma semana, podendo ocorrer síndrome hemorrágica, coagulação intravascular disseminada e consequentes alterações isquêmicas, degenerativas e necróticas em decorrência da migração extravascular do parasita, causando danos teciduais severos como verificados nos testículos, epidídimo, ovário, placenta, feto, coração, olhos e sistema nervoso central (ANOSA, 1983; STEPHEN et al., 1986; GARDINER, 1989; BEZERRA et al., 2008; GALIZA et al., 2011; BATISTA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2013).

As lesões nervosas causadas durante a infecção por tripanossoma têm sido associadas à presença destes parasitos em tecidos e fluidos cerebrospinais, às alterações circulatórias provocadas pela formação de êmbolos, á reações autoimunes ocorridas no cérebro e apoptose de células endoteliais dos vasos do cérebro e cerebelo. Isso ocorre após os parasitos romperem a barreira hematoencefálica e invadirem o sistema nervoso central, provocando uma leptomeningite que se estende aos espaços perivasculares de Virchow-Robin e, finalmente, ocorre uma encefalite difusa e sintomatologia nervosa (THOMPSON, 1992; STILES et al., 2004).

Em fêmeas bovinas naturalmente infectadas por *T. vivax*, várias desordens reprodutivas podem ocorrer sendo as mais reportadas; aborto, repetição de cio, natimortos ou nascimento de crias fracas e anestro temporário ou permanente (SILVA et al., 2004; BEZERRA et al., 2006; BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008). Em machos, patologias reprodutivas ocasionadas pelo tripanossoma estão especialmente ligadas a lesões do testículo e epidídimo, como queda na qualidade do sêmen, oligoespermia ou mesmo azoospermia, esses danos aos testículos e epidídimos são progressivos e se agravam com o decorrer da infecção (SEKONI et al., 2004; ADAMU et al., 2007).

A importância do *T. vivax* como causador de desordens reprodutivas como aborto e mortalidade perinatal, como já demonstrados em infecção em bovinos, ovinos e caprinos na região semiárida brasileira é demonstrada e atribuída a diversos fatores, desde os

efeitos sistêmicos maternos a lesão na placenta e nos fetos, ambos, capazes de interromper a gestação (BEZERRA et al., 2006; BATISTA et al., 2009; GALIZA et al., 2011; PIMENTEL et al., 2012).

Segundo Mellado et al., (2004) os fatores atribuídos as desordens reprodutivas em infecções por *T. vivax* estão relacionadas com o baixo escore corporal, manifestações sistêmicas importantes como hipertermia e anemia, baixos níveis de progesterona, que são atribuídos à degeneração do hipotálamo, hipófise e gônadas causando a interrupção das concentrações e secreções plasmáticas de hormônios necessários aos processos reprodutivos, hipoglicemia materna e fetal, seguido por aumentos de corticoides, estrógeno e prostaglandina, causando luteólise e aborto.

3.2.7 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

As formas tripomastigotas do parasito na circulação pode provocar diferentes graus de alterações hematológicas, que são principalmente caracterizadas pela diminuição de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito, assim como alterações bioquímicas e metabólicas (ANOSA, 1983).

A anemia hemolítica é a principal consequência da tripanossomose em bovinos, e sua persistência é responsável por causar insuficiência cardíaca congestiva. Sendo a principal causa de morte em bovinos acometidos no campo (MURRAY et al., 1985; GARDINER, 1989; SALGADO et al., 2011). O mecanismo patofisiológico da anemia hemolítica por tripanossoma é bem complexo e tem origem multifatorial (NAESSEENS et al., 2005). A anemia inicialmente é macrocítica e posteriormente pode tornar-se microcítica, acompanhada ou não de reticulocitose (ANOSA et al., 1980). Sendo atribuída á hemólise extravascular, diminuição ou inibição da eritropoiese e hemorragias. Dentre estas as principais são:

Liberação de hemolisinas e enzimas pelos tripanossomas, que irão induzir lesões diretamente às membranas dos eritrócitos; Diversas substâncias químicas ativas são produzidas por tripanossomas vivos e mortos que podem levar a lesões nos eritrócitos. Entre estas, as mais comuns são proteases, neuraminidase, fosfolipase, ácidos graxos livres, piruvatos e subprodutos aromáticos (TIZARD et al., 1978; CONNOR et al., 2004; NAESSEENS et al., 2005; GUEGAN et al., 2013).

A neuraminidase tem sido produzida *in vitro* por *T. vivax*, durante períodos de parasitemia, tornando os eritrócitos propensos à fagocitose pelo sistema mononuclear fagocitário expandido (MPS) clivando e desativando os receptores de ácido siálico na superfície das hemácias. A liberação de enzimas lisossomais proteolíticas (proteases) dos flagelos e de tripanossomas danificados ou mortos agem também clivando os receptores de ácido siálico na membrana das hemácias causando fragilidade osmótica e lise (ESIEVO, 1979; ADAMU et al., 2009; GUEGAN et al., 2013).

Aumento da fragilidade dos eritrócitos devido ao aumento da temperatura corporal; existe uma relação direta entre o pico febril e a flutuante parasitemia (MBAYA et al., 2009a). Em condições de laboratório, eritrócitos submetidos a temperaturas acima da fisiológica do corpo sofreram alterações na fragilidade osmótica e na permeabilidade, sendo relatado também uma diminuição na plasticidade e longevidade do eritrócito *in vivo*, ocorrendo reações químicas com consequente peroxidação lipídica (WOODRUFF et al., 1972; KARLE, 1974; IGBOKWE, 1994).

Lesões induzidas aos eritrócitos devido à força de locomoção flagelar e presença de corpo microtubular reforçado, em decorrência de vários parasitos na circulação. Dano à membrana dos eritrócitos tem sido associado também com a adesão via receptores de ácido siálico à superfície dos eritrócitos, plaquetas e reticulócitos por tripanossomas levando a áreas de descontinuidade na membrana das células eritrocitárias (ANOSA, 1983; SHEHU et al., 2006).

Adesão dos complexos antígeno-anticorpo às membranas eritrocitárias e dos componentes do complemento aos eritrócitos, que irão promover eritrofagocitose; Desse modo, a principal causa da anemia é a retirada dos eritrócitos danificados da corrente sanguínea pelas células do sistema fagocítico mononuclear no baço, medula óssea, pulmões e linfonodos. A hemossiderose extensa observada nesses casos e a captura de ferro no citoplasma dos macrófagos irão contribuir para a eritropoiese deficiente (CONNOR et al., 2004).

Peroxidação lipídica; A formação de radicais livres e super-óxidos atacam a integridade celular dos eritrócitos durante a tripanossomose o que levam a hemólise (UMAR et al., 2007).

Agregação plaquetária; tripanossomas ou seus fragmentos podem causar agregação plaquetária ou microangiopatia. Isso pode levar a liberação de autoanticorpos de plaquetas, liberando pró-coagulantes, aminas vasoativas, citocinas, causando deposição de fibrina, ocorrendo posteriormente formação de microtrombos e coagulação

intravascular disseminada. Essas alterações podem ser ainda mais proeminentes na infecção por *T. vivax* (DAVIES et al., 1974; IGBOKWE, 1994; CONNOR et al., 2004).

Desnutrição; Tripanossomose pode causar uma queda no consumo de alimentos, portanto, há déficit de energia e perda de tecido associados com catabolismo de gordura corporal, deficiências de vitamina C, B e aminoácidos essenciais. Fornecimentos de energia inadequada aos eritrócitos podem alterar a superfície da membrana do eritrócito, portanto, levando ao enfraquecimento da membrana celular, aumento da fragilidade osmótica e hemólise (JENNINGS, 1975; IGBOKWE, 1994).

Além de fatores ainda em estudo como o soro idiopático e fator de necrose tumoral como agentes inibidores da eritropoiese (RUE et al., 2000; CONNOR et al., 2004).

A anemia em ruminantes causada por tripanossoma apresenta vários estágios ao longo do curso da doença (ABENGA et al., 2006). Sendo descrita três fases:

A fase I ou fase de crise aguda, essa fase tem início com o surgimento do tripanossoma na circulação periférica, associada geralmente a alta parasitemia que se apresenta flutuante e evidente na maioria dos dias;

A fase II ou fase crônica, caracterizada por baixa parasitemia, sendo que nessa fase o baixo a moderado valor eritrocitário persiste com uma menor flutuação, este período varia de semanas a meses;

A fase III ou fase recorrente sendo caracterizada pela baixa, infrequente ou ausência de parasitemia (MBAYA et al., 2007; MBAYA et al., 2009a; MBAYA et al., 2009b; MBAYA et al., 2009c). Nesse período, o declínio do valor eritrocitário retorna aos valores iniciais da infecção e as alterações patológicas sofrem auto recuperação, o que é comumente encontrado em animais com tripanotolerancia (MBAYA et al., 2009d; MBAYA et al., 2009e; MBAYA et al., 2010; MBAYA et al., 2011a; MBAYA et al., 2011b).

Em relação ao leucograma nas infecções por *T. vivax* as alterações não são consistentes. Os valores leucocitários podem estar normais (RUE et al., 2000; HERRERA et al., 2004), aumentados (ANOSA, 1983) ou diminuídos (SILVA et al., 1995). Todavia em ocasiões onde há severa anemia, leucopenia pode estar presente, entretanto, leucocitose mostra-se mais predominante (MAXIE, 1979; ESIEVO, 1983; SILVA et al., 1999; CADIOLI et al., 2012), corroborando com estas informações, ANOSA et al, (1980) observaram leucopenia na fase inicial da infecção, em decorrência de linfopenia, neutropenia e eosinopenia, com leucocitose em fase posterior da enfermidade (ESIEVO, et al 1983).

As proteínas plasmáticas totais assim como o fibrinogênio plasmático geralmente encontram-se dentro dos valores fisiológicos. Entretanto, as proteínas plasmáticas totais em alguns animais podem estar elevadas em decorrência do aumento das globulinas séricas (HERRERA et al., 2004) e o fibrinogênio pode também estar aumentado (CADIOLI et al., 2012).

A síndrome hemorrágica aguda verificada em infecções por *T. vivax*, é ocasionada pela severa trombocitopenia que ocorre, devido ao consumo de plaquetas para a formação de microtrombos, induzido pelo parasita (OLUBAYO et al., 1985).

3.2.8 ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS

As alterações na necropsia não são características. Destacando as mais comuns como palidez das mucosas, emaciação, atrofia serosa da gordura, esplenomegalia com hiperplasia de polpa branca, linfadenomegalia, hepatomegalia, hidropericárdio, congestão e hemorragia pulmonar, além de hemorragias petequiais em vários órgãos, além dessas, caprinos podem apresentar edema escrotal (DARGANTES et al., 2005).

Segundo Fidelis Junior et al (2016) poucas alterações macroscópicas podem ser observadas, como hepatomegalia e esplenomegalia, com presença de petéquias em ambos os órgãos, e hiperplasia de polpa branca, enfartamento de linfonodos, principalmente os submandibulares e pré-escapulares. O coração e rins podem apresentar petéquias em sua superfície, palidez de carcaça com leve icterícia, acúmulo de fluido serosanguinolento na cavidade abdominal e no saco pericárdico, áreas de ulcerações e congestão do abomaso e hemorragias petequiais nos rins, pulmões, esclera e mucosas oral e vaginal, além de congestão e enfisema pulmonares e áreas de malácia na substância cinzenta do córtex parietal.

Os principais órgãos afetados ao exame histopatológico são fígado, baço, coração, pulmão, linfonodo, rim e córtex do SNC. As alterações histopatológicas em infecções por *T. vivax* são frequentemente observadas, acometendo diversos órgãos com lesões de intensidades diferentes (ALMEIDA, 2007). As principais lesões encontradas em bovinos experimentalmente infectados pelo *T. vivax* foram: hepatite focal, nefrite focal, hiperplasia folicular de folículos linfóides, pneumonia focal e adrenalite (MORAES, 2001). Paiva et al. (2000), avaliando bovinos experimentalmente e naturalmente

infectados, observaram pequeno aumento no tamanho do baço e do fígado, glomerulonefrite, miocardite não supurativa multifocal de discreta a moderada.

3.2.9 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tripanossomose pode ser efetuado por métodos diretos e indiretos. Os diretos envolvem a detecção e identificação do agente etiológico no material biológico. Os indiretos pesquisam uma resposta imunológica do hospedeiro ao agente etiológico. Os métodos diretos mais utilizados são os parasitológicos e os moleculares. Já os métodos indiretos mais utilizados são os sorológicos (SILVA et al., 2003).

O diagnóstico clínico, associado a testes parasitológicos, sorológicos ou moleculares, é uma ferramenta importante no monitoramento da doença no rebanho. Apenas as características clínicas e exames parasitológicos diretos não são suficientes para prever o status da doença nos rebanhos, uma vez que o diagnóstico de animais cronicamente infectados e ou subclínicos podem estar mascarados por estes testes, pela baixa parasitemia nessas fases da doença (ROSSI, et al 2008).

Por outro lado, além dos exames laboratoriais que confirmam o diagnóstico da infecção pelo *T. vivax*, são necessários indicadores clínicos que permitam avaliar a gravidade da infecção, o prognóstico e eventualmente, a fase da infecção na qual o hospedeiro se encontra, para que novas medidas de intervenção possam ser implementadas no combate a esta enfermidade. Neste contexto, destacam-se as Proteínas de Fase Aguda (PFA), as quais aumentam rapidamente sua concentração plasmática frente ao estímulo inflamatório (ECKERSALL et al, 1988) visando o combate ao agente infeccioso, além de prevenir danos teciduais e promover reparação tissular (BAUMANN et al, 1994). Como se relaciona com a severidade da enfermidade e a extensão do dano tecidual, a sua quantificação pode fornecer informações sobre o diagnóstico e prognóstico da tripanossomose (MURATA et al, 2004).

A tripanossomose deve ser diferenciada das doenças que apresentam as mesmas manifestações clínicas, embora, podendo estar associadas frequentemente ao mesmo tempo. Na fase febril aguda, deve ser diagnóstico diferencial de babesiose e anaplasmoses. Sendo que a tripanossomose raramente produz icterícia e não é acompanhada por hemoglobinúria. Estas características e conclusões parasitológicas permitem diferenciar

de babesiose e anaplasiose. Na fase crônica da doença, onde os animais se encontram afebris, nos quais a anemia, emagrecimento, diarreia e aumento dos linfonodos são sintomas comuns, é importante diferenciar esta doença de desnutrição e helmintoses (CONNOR et al., 2004). Em vacas que abortaram deve-se fazer o diagnóstico diferencial com doenças infecciosas como brucelose, leptospirose. Nas manifestações nervosas da doença realizar diagnóstico diferencial para raiva e intoxicação por plantas (SILVA et al., 2002).

3.2.9.1 MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

Dentre os métodos parasitológicos a técnica da centrifugação do microhematócrito ou teste de Woo, o teste da capa leucocitária ou *Buffy Coat*, da gota espessa, o esfregaço sanguíneo e o aspirado de linfonodos podem ser utilizados, entretanto apresentam baixa sensibilidade na fase crônica da doença (WOO, 1970; SILVA et al., 2003; MADRUGA et al., 2004).

O método parasitológico mais empregado no Brasil (MADRUGA, 2004), é o esfregaço sanguíneo corado (NDAO et al., 2000; SILVA et al., 2002), esta técnica, deve ser executada dentro de 2-4h após a coleta do sangue fresco e após fixar e corar as lâminas as espécies de *Trypanosoma* spp. são visualizadas em microscópio óptico, e podem ser também diferenciadas pelo tamanho, formato do corpo, posição do núcleo e do cinetoplasto e grau de desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo (SILVA et al., 2002). Este teste requer pelo menos 10^4 - 10^5 parasitos/mL, o que torna a sua sensibilidade muito baixa (DESQUESNES, 2004), em torno de 10% (QUISPE et al., 2003).

Outra técnica parasitológica amplamente utilizada no país é a concentração em tubo de microhematócrito - TCH ou teste de Woo, (WOO, 1970), que consiste no preenchimento de dois tubos capilares com amostras de sangue, com posterior centrifugação por cinco minutos e leitura em microscópio óptico para visualização dos tripomastigotas, os quais se concentram entre o plasma e a camada leucocitária. Para a detecção de *T. vivax*, pelo menos 700 parasitas/mL de sangue é necessário (DESQUESNES E TRESSE, 1996), ou seja, é uma técnica de baixa sensibilidade, especialmente, na fase crônica da doença (MASAKE et al., 1994). Em animais infectados experimentalmente, observou-se sensibilidade desse teste de 68% (MASAKE et al., 1994; REBESKI et al., 1999).

As técnicas parasitológicas produzem resultados com erros que variam na ordem de 20 a 25% devido a oscilações características da parasitemia relacionadas com a variação antigênica dos tripanossomas e são mais sensíveis na fase aguda da doença, portanto, são muito valiosas durante a ocorrência de surtos em diagnóstico a campo. Os parasitos também podem ser detectados além de amostras de sangue e linfonodos, também em líquido, secreções genitais e esfregaços de órgãos (DESQUESNES, 2004).

3.2.9.2 MÉTODOS SOROLÓGICOS

Em investigações epidemiológicas os testes sorológicos de Imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA), são mais usados e apresentam boas sensibilidades, especialmente indicados quando há infecção subclínica nos rebanhos. Estes métodos visam detectar anticorpos anti-*T. vivax* no soro do animal suspeito que teve contato prévio com o parasito, mas não permitem indicar se ainda há infecção ou se o animal respondeu ao tratamento (NANTULYA, 1990; GONZATTI et al., 2014).

Nos métodos sorológicos, diversos antígenos comuns a várias espécies de tripanosoma são utilizados, não representando métodos espécie específicos mas é uma ferramenta importante para avaliar a prevalência de animais que se infectaram (DESQUESNES, 2004). No entanto, é importante destacar, que o sistema imune necessita de duas semanas após a infecção para soroconversão, de forma que, se a infecção é recente, outros métodos, como os parasitológicos ou os moleculares são necessários. Caso contrário, o teste sorológico deve ser repetido, pelo menos, 15 dias após (MENESES, 2016).

3.2.9.2.1 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCENCIA INDIRETA (RIFI)

Para a realização dessa reação, lâminas de RIFI são preparadas e sensibilizadas a partir de amostras de sangue de animais experimentalmente inoculados com o *T. vivax*, obtendo-se o antígeno do sangue total (GONZÁLEZ et al 2005) e posteriormente, distribuído nas cavidades designadas nas lâminas. Estas já sensibilizadas com o antígeno, são secas a temperatura ambiente, fixadas com acetona, embrulhadas com papel higiênico, recobertas em papel alumínio, acondicionadas em recipientes hermeticamente

fechado e congeladas a -20°C até o momento do uso (SAMPAIO, 2013; FIDELIS JUNIOR, 2014). O plasma ou o soro do animal a ser avaliado é diluído em solução salina e colocado em cada cavidade designada na lâmina, estas são incubadas em câmara úmida em estufa e posteriormente lavadas e, em seguida, um anticorpo anti-IgG bovino marcado por fluoresceína é adicionado as lâminas que são incubadas novamente em estufa úmida e secas. Então, sob microscópio acoplado a uma luz ultravioleta são visualizadas e observa-se a fluorescência nos casos positivos (DESQUESNES, 2004).

A Reação de Imunofluorescencia indireta é uma técnica sorológica que possibilita a identificação do *T. vivax* em áreas mais prevalentes, além de fornecer o grau de exposição ao parasito, uma vez que, quanto maior a diluição utilizada no soro do animal a ser testado, com visualização da fluorescência, maior é o título de anticorpos do animal testado. Esta técnica possui relato de reações cruzadas entre *T. evansi* e *T. vivax*, além da interpretação ser subjetiva, especialmente em casos próximos ao ponto de corte (FERENC et al., 1990).

Segundo Teixeira (2010), IgG anti-*Trypanosoma evansi* são detectados pela RIFI em bovinos experimentalmente infectados a partir do 14º dia após a infecção (DAI) sendo que os títulos de anticorpos variam entre 80 até 1280. Corroborando com esses dados Sampaio, (2013), observou o mesmo comportamento de anticorpos em bovinos naturalmente infectados por *T. vivax*, e uma sensibilidade do teste de 89,74%. No entanto, segundo Platt e Adams, (1976) antígenos de *T. vivax* não possuem reação cruzada com *Anaplasma marginale*, *Eperythrozoon* spp, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Trypanosoma theileri*, neste caso, podendo ser amplamente utilizado em países como o Brasil.

3.2.9.2.2 ENSAIO IMUNOENZIMATICO INDIRETO (ELISA)

No ensaio imunoenzimatico indireto (ELISA), o antígeno a ser utilizado é diluído e distribuído a uma placa para sua fixação, a placa é incubada em câmara úmida e após coloca-se os soros a serem testados. Havendo anticorpos nos soros, uma ligação antígeno-anticorpo será detectada após a adição de um conjugado (anti-IgG bovino) com uma enzima (peroxidase), que, posteriormente, age sobre o substrato, (peróxido de hidrogênio) que é adicionado a um cromógeno, produzindo uma coloração, que pode ser detectada visualmente ou mensurada por espectrofotometria ou através de reação de quimioluminescência (MADRUGA, 2002; DESQUESNES, 2004).

Os antígenos são usualmente obtidos através de sangue de animais experimentalmente inoculados, posteriormente purificados e sonicados em aparelhos próprios, o conteúdo proteico do antígeno solúvel é determinado utilizando o método do ácido bicicônico através de kit reagente e calculado por regressão linear. Antígenos brutos de *T. evansi* tem sido utilizados para detectar *T. vivax* devido à alta resposta cruzada e à fácil propagação de *T. evansi* em roedores para a produção dos antígenos (GONZÁLEZ et al. 2005; SUÁREZ et al., 2009).

Em comparação com a RIFI, esta possui resultados melhores devido à sua excelente repetibilidade, baixo custo e facilidade para o processamento de muitas amostras, sendo indicada para pesquisas epidemiológicas (FERENC et al., 1990; MADRUGA et al., 2006; OSÓRIO et al., 2008). No entanto, um problema é a padronização do antígeno, que usualmente é produzido por cada laboratório, o que torna a técnica variável. A escolha do limite para positividade é arbitrária (DESQUESNES, 2004), com padrões sendo desenvolvidos (WRIGHT et al., 1993), inclusive no Brasil (MADRUGA et al., 2006).

Segundo Teixeira, (2010) o ELISA é capaz de detectar IgG anti-*T. evansi* em bovinos mais precocemente do que a RIFI, por volta do quinto dia pós-infecção (DAI). Sampaio, (2013) em infecção natural em rebanhos leiteiros pelo *T. vivax* encontrou uma prevalência de 93,09% utilizando o teste. Em geral, o ELISA, tem baixa especificidade entre os tripanossomas patogênicos (FERENC et al., 1990). Contudo, em se tratando da sensibilidade, ela é satisfatória (por volta de 90%). Para um único lote de antígeno, a repetibilidade é muito boa, mas pode variar entre lotes e entre estirpes do parasito (DESQUESNES, 2004).

Embora as reações cruzadas entre espécies de *Trypanosoma* dificultem o diagnóstico espécie-específico, para *T. vivax*, a sensibilidade utilizando ELISA indireto com antígeno homólogo e heterólogo (*T. evansi*) é similar (DESQUESNES, 2004). Madruga, et al (2006) desenvolveu um antígeno bruto de *T. vivax* de um isolado brasileiro que mostrou sensibilidade e especificidade de 97,6% e 96,9%, respectivamente. E ao inocular três bezerros com *T. evansi* para avaliar a resposta cruzada, apenas um deles, aos 45 dias pós-inoculação, apresentou-se positivo no teste.

Uma das vantagens da utilização do ELISA em estudos de soroprevalência na região Sul-Americana é a ausência de espécies de *Trypanosoma* que induzem forte reação cruzada com *T. vivax*, como ocorre com o *T. congolense* no continente africano. Entretanto, em animais com baixa parasitemia ou em áreas endêmicas a outras espécies

de tripanossomas os testes tradicionais de detecção do parasita apresentam baixa especificidade, em virtude disso, técnicas moleculares com alta sensibilidade e especificidade, foi desenvolvida (SILVA et al., 2002; CORTEZ et al., 2009).

3.2.9.3. MÉTODOS MOLECULARES

Métodos moleculares como o de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (CLAUSEN et al., 1998), PCR em tempo real (KNOWLES JUNIOR et al., 2008) e à amplificação circular isotérmica do DNA (LAMP) (KUBOKI et al., 2003; LAOHASINNARONG et al., 2011) são ótimos indicadores da presença do DNA de *T. vivax* no sangue dos animais, sendo entretanto métodos mais caros e que necessitam de estrutura adequada para sua realização.

A detecção do ácido desoxirribonucleico (DNA) das diferentes espécies de *Trypanosoma*, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), é uma alternativa de teste com elevada sensibilidade e especificidade como foi demonstrado para diversos parasitos de importância veterinária (ZARLENGA et al., 2001), inclusive *T. vivax* (DELESPAUX et al., 2003).

O DNA utilizado nessa PCR, como em outras reações, é extraído pelo processo de fenol/clorofórmio ou com kits comerciais que são laboriosos e de custo elevado. Alternativas que tornam a extração de DNA mais rápida e econômica têm sido descritas (MORLAIS et al., 1998), o que torna prático e econômico o emprego da PCR, principalmente como ferramenta de estudo epidemiológico. Apesar da aparente simplicidade, na PCR existe uma complexa interação entre os componentes da prova, fazendo com que pequenas variações produzam alterações no resultado (GEYSEN et al., 2003; DELESPAUX et al., 2003).

A detecção de um segmento de DNA permite realizar um diagnóstico espécie-específico de infecções ativas por tripanossoma, pois após a morte do parasito, a circulação de DNA livre no hospedeiro é de no máximo dois dias (DESQUESNES, 2004). Além de ser ótima ferramenta de diagnóstico em infecções subclínicas (SANNNI et al., 2013). Desde os anos 80, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada e tem contribuído para a identificação, caracterização e diagnóstico de diversas espécies de *Trypanosoma* (DESQUESNES e DÁVILA, 2002).

A PCR com primers desenhados com base em sequência repetitiva do gene que codifica o antígeno de 8 kDa detectou 75% de bovinos positivos em um grupo de animais

infectados experimentalmente, contra 42% no método de diagnóstico parasitológico, e 55% no ELISA para detecção de antígeno de *T. vivax* (MASAKE et al., 1997). É importante enfatizar que nem todas as infecções podem ser detectadas pela PCR, especialmente durante a ausência de parasitemia, que é limitante para esse método diagnóstico (DESQUESNES E DÁVILA, 2002).

O PCR apresenta de modo geral uma capacidade de detectar mais amostras positivas do que os testes parasitológicos, diversas técnicas como o buffy coat e o sedimentação do plasma aumenta ainda mais a sensibilidade da técnica podendo até detectar duas vezes mais amostras positivas (SOLANO et al., 1999; DESQUESNES, 2004). Adicionalmente, vários marcadores moleculares tem sido utilizados para a PCR, tais como antígeno específico reconhecido pelo anticorpo monoclonal Tv27 (MASAKE et al., 1994), sequências satélites ou microsátélites (MASIGA et al., 1992; MORLAIS et al., 2001), sequências spliced-leader (VENTURA et al., 2001) e espaçadores de transcritos internos de DNA ribossomal (ADAMS et al., 2008). Porém, a identificação molecular de diversos isolados de *T. vivax* de diferentes regiões geográficas pode ser difícil devido à variabilidade genética, particularmente em isolados da África (CORTEZ et al., 2009).

Outro método de diagnóstico molecular que atualmente está sendo usado é a amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP), esta técnica utiliza enzima que permite rápida amplificação sob condições isotérmicas e se baseia em sequências satélites de DNA (GONZATTI et al., 2014). Para *T. vivax*, essa técnica, que consiste numa variação da PCR convencional, se mostrou altamente sensível, detectando 1 tripanossoma/mL de sangue, enquanto na PCR convencional, a detecção varia de 10 a 10³ parasitos/mL (NJIRU et al., 2011), constituindo-se uma ferramenta promissora para diagnóstico molecular (GONZATTI et al., 2014).

Segundo Cadioli et al., (2015), comparando o PCR convencional e o LAMP no diagnóstico de *T. vivax* de bovinos supostamente aparasitemicos, o LAMP se mostrou mais eficaz na detecção de animais positivos do que o PCR convencional. O PCR foi capaz de detectar 66,67 % de amostras positivas e o LAMP 95,24%. Isso demonstra a alta capacidade do LAMP em detectar amostras positivas para o *T. vivax*, e corrobora com os resultados obtidos anteriormente por (KUBOKI et al. 2003; LAOHASINNARONG et al., 2011).

Além disso, o LAMP oferece menos risco à presença de inibidores em amostras de sangue do que o PCR convencional, o que faz dessa técnica uma ferramenta estratégica importante para a detecção de animais infectados com *T. vivax* (GRAB et al., 2011).

3.2.8.4 SEQUENCIAMENTO DO DNA

O sequenciamento dos produtos amplificados e purificados pode ser realizado através do método automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977). O sequenciamento pode ser feito dos produtos diretos da PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de PCR ou o sequenciamento de produtos amplificados clonados. Sempre que possível, fragmentos amplificados pela PCR devem ser sequenciados para confirmar a validade dos resultados da PCR quando o ensaio está sendo feito para diferenciar espécies de parasitos (HANCOCK et al., 2001; MASSUNG e SLATER, 2003; DAGNONE et al., 2009).

3.2.10 TRATAMENTO

O tratamento satisfatório da tripanossomose requer mais do que uma droga tripanocida aplicada corretamente; o estado nutricional a duração da doença e a quantidade de exercício que os animais terão que fazer durante a fase de convalescência da doença, está diretamente relacionada com a recuperação dos animais tratados. Animais bem alimentados se recuperam mais rápido do que aqueles que terão que percorrer longas distâncias para buscar alimentos e água. Bovinos cronicamente infectados, geralmente falham em responder ao tratamento. Nesses casos, o distúrbio do metabolismo do ferro e a falha na hematopoese parecem ser irreversíveis e os animais afetados podem tornar-se magros e anêmicos apesar do tratamento tripanocida. Além disso, como a tripanossomose é frequentemente uma doença enzoótica, emergência clínica ocorre durante as estações desfavoráveis para o gado em relação a alimentos ou falta de água (CONNOR, et al., 2004).

O tratamento da tripanossomose pode ser curativo, usando uma droga que dá pouca ou nenhuma ação residual, ou preventivo. A diferença entre cura e prevenção vai depender da droga que está sendo usada e, em alguns casos, da dosagem que está sendo administrada (PEREGRINE, 1994). As drogas curativas são usadas quando a incidência é baixa e poucos casos ocorrem em um rebanho. A profilaxia é necessária quando os animais estão sob constante risco e quando a enfermidade ocorre em um alto nível durante o ano (SILVA et al., 2002).

Drogas consideradas como eficazes no tratamento de infecção por *T. vivax* incluem diaceturato diminazeno (Beronal ®, Berenil ®, e Ganaseg ®) (WHITELOW, et al., 1989) e cloreto de Isometamídio (Trypamidum ®) (GEERTS, et al., 2001). Na América do Sul, nem todos os compostos tripanocidas estão disponíveis comercialmente. No Brasil e Argentina, por exemplo, apenas o aceturato de diminazene é comercializado (DAVILA, et al., 2003).

Diminazene é uma diamidina aromática e é comercializada em combinação com antipirina, que é um estabilizador que prolonga a atividade do composto em solução. Populações de *T. vivax* sensíveis ao produto são eliminadas por tratamento muscular a uma dosagem de 3,5 mg/kg. Entretanto, nessa dosagem, pode haver recorrência da infecção. O diminazene é o fármaco mais comumente utilizado nas tripanossomoses, apresentando melhores índices terapêuticos do que outras drogas na maioria dos animais infectados e uma baixa taxa de resistência. Entretanto, em processos onde ocorre alta parasitemia e recorrência da doença a dosagem recomendado é de 7,0 mg/kg sendo recomendado somente duas doses no período de 60 dias (SILVA, et al., 2008).

A resposta da terapia com aceturato de diminazeno é variável há quase 40 anos (PEREIRA E ABREU, 1978). Linhares et al. (2006) relataram sucesso em alguns bovinos tratados com diminazeno na dose de 3,5mg/kg. Em um surto no Pantanal Mato-grossense, a utilização de aceturato de diminazeno se mostrou eficaz para a cura dos animais doentes (SILVA et al., 1996). Já na Paraíba, animais doentes se recuperaram após a administração de 5mg/kg da droga, mas apresentaram recidiva (BATISTA et al., 2007). Em outra ocasião, bezerros foram tratados com 5mg/kg de aceturato de diminazeno e seis meses após nenhum deles apresentaram parasitemia, enquanto em outra propriedade que não realizou o tratamento a frequência de bezerros positivos foi 81,82%, com mortalidade de 12,73% e letalidade de 15,55%, similar a seis meses antes (BATISTA et al., 2008).

Atualmente, a dosagem recomendada para o aceturato de diminazene nos animais infectados com *T. vivax* é de 7,0 mg/kg, e uma vez a doença diagnosticada no rebanho recomenda-se o tratamento de todos os animais (SILVA et al., 2004).

Para tratamento de tripanosomose o diaceturato é tido como de eleição, além do cloreto isometamídio e brometo de etídio com alto índice terapêutico e baixa incidência de resistência (PEREGRINE et al, 1993; IHEDIOHA et al, 2010). Atualmente, relata-se diminuição da sensibilidade do microrganismo (SINYANGWE et al, 2004; BASTISTA et al, 2007; MIRUK et al, 2008), e até mesmo a ocorrência de resistência em bovinos tratados com a dose mais alta do diaceturato (7,0 mg/kg) (CADIOLI et al, 2012) mas tem

mostrado limitada ação profilática devido sua atividade sérica média de 21 dias (MILLER et al, 2005).

O cloreto de Isometamidium (Tripamidium®, Vivedium®) considerado o medicamento mais eficaz no combate a tripanossomose bovina, não é registrado seu uso no país e não pode ser comercializado, o que torna um entrave ao combate à doença. Além da barreira da legislação brasileira, a liberação da importação do medicamento enfrenta outros obstáculos; é que não há estudos científicos no país sobre o uso do medicamento em gado de leite e a doença é subnotificada pelos profissionais e produtores. Não se sabe se o medicamento deixa ou não resíduo no leite, ao contrário do gado de corte em que o período de carência é de 30 dias. Para adquirir o produto é necessário formalizar o pedido junto ao departamento de fiscalização de insumos pecuários, na coordenação de produtos veterinários, na sede do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em Brasília (IMA, 2016).

Segundo Silva, et al., (2004) o Cloreto de Isometamidium é uma amidina aromática da fenantridina formada pela combinação do homidium com a p-aminobenzamida diazotizada do dimenazene e tem atividade profilática e terapêutica. A dosagem recomendada para fins profiláticos é de 0,5-1,0 mg/kg, pela via intramuscular, em intervalos de 4 a 4 meses. O composto tem sido usado com sucesso para manter a produtividade do gado zebu exposto ao desafio com a mosca tsé-tsé no leste da África. Contudo, considerável variação tem sido observada com a dosagem de 1,0 mg/kg, demonstrando a profilaxia no gado bovino de 2 à 22 semanas. Tais variações na atividade profilática parecem ser independentes do nível do desafio com tripanosoma e da presença ou ausência de infecção no período do tratamento. As variações na sensibilidade entre diferentes populações de tripanosomas parecem ser o maior fator determinante da duração da profilaxia.

Outras drogas como suramine, quinapiramina, melarsoprol, homidium são eficazes no tratamento da tripanossomose. Entretanto, resistência a essas drogas ocorrem frequentemente, e pode restringir seu uso (SILVA, et al., 2002). O reaparecimento dos tripanosomas na corrente sanguínea após o tratamento com dose correta da droga, está relacionado com a sobrevivência dos parasitos resistentes a mesma, ou ser o resultado da localização extravascular, especialmente no sistema nervoso, migração do parasito oculto no líquido cerebral (LCR) ou humor aquoso (GARDINER, 1989).

3.2.11 CONTROLE

O controle da doença deve combinar o movimento restrito de animais doentes, o tratamento de todos os animais infectados, vigilância epidemiológica da distribuição e da gravidade da doença, eliminação ou controle de vetores, assim como o descarte de fômites que entraram em contato com sangue de animal portador (DWINGER et al., 2000).

O conhecimento do ciclo do parasito é fundamental para seu controle. A elaboração de estratégias adequadas de controle depende, principalmente, de informações sobre a epidemiologia da tripanossomose, especialmente na dinâmica da transmissão mecânica do parasito, seja por fômites ou por vetores. A eliminação dos vetores constitui-se em uma medida importante na profilaxia da doença e durante décadas vários métodos estão sendo utilizados, principalmente em lugares endêmicos da tripanossomose, tais como desmatamento, uso de machos estéreis e armadilhas impregnadas com inseticidas, pulverização de inseticidas nos animais, na vegetação, uso de inseticidas pour on e quimioprofilaxia. Entretanto, apenas essa medida isolada de controle, só protege parcialmente contra a transmissão da doença, visto que, essa ocorre muitas vezes por transmissão mecânica por compartilhamento de agulhas contaminadas com sangue de animais infectados para animais susceptíveis, aumentando o risco de reinfecção entre os animais no rebanho. Levando em consideração esse aspecto, o uso individual de agulhas e seringas e a esterilização das mesmas após o uso é extremamente necessário para evitar reinfecções e a propagação da tripanossomose em rebanhos por meio de fômites. (SILVA et al, 2002).

Todos os animais diagnosticados com a doença devem ser agrupados e separados do rebanho assim como ter movimentação restrita na propriedade. Outro aspecto importante são os animais cronicamente infectados. Esses desenvolvem uma ótima imunidade contra o desenvolvimento da doença clínica e representam o principal reservatório do parasito para animais susceptíveis. A eliminação desses animais do rebanho é fundamental para o controle da doença (MADRUGA et al., 1964; PAIVA et al, 2000).

Embora, o uso correto de medicamentos possam reduzir as taxas de mortalidade, geralmente tem baixo impacto na produção animal. A forma como os produtores usam as drogas tripanocidas contribuem para isso seja na forma terapêutica ou profilaticamente. Sendo que o desenvolvimento de resistência aos medicamentos é uma ameaça constante a utilização sustentável no controle da doença (SILVA, et al., 2004). O tratamento

profilático como medida de controle somente dos casos clínicos é sugerido por Batista et al, 2008. Entretanto, o que se tem visto é a ocorrência de recidivas frequentemente, sendo necessário o tratamento profilático massal do rebanho após a confirmação de um animal positivo e o monitoramento constante do rebanho através de testes parasitológicos.

3.2.12 REFERÊNCIAS

- ABRÃO, D.C.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J. Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no estado de Minas Gerais. *Ciência Animal Brasileira*, In: **VIII Congresso Brasileiro de Buiatria**, 2009. Anais... suplemento 1, p. 672-676, 2009.
- ABENGA, J.N. & ANOSA, V.O. Clinical studies on experimental Gambian trypanosomosis in vervet monkeys, *Journal Veterinarski Arhiv*, v.76, n.1, and p.11-18. 2006.
- ADAMS, E.R.; HAMILTON, P.B.; MALETE, I.I. The identification, diversity and prevalence of trypanosomes in field caught tsetse in Tanzania using ITS-1 primers and fluorescent fragment length barcoding. *Journal Infection Genetics Evolution*, v. 8, p. 439-444, 2008.
- ADAMU S., FATIHU M.Y., USEH N.M MAMMAN M., SEKONI V.O. & ESIEVO k.A.N. Sequential testicular and epididimal damage in Zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Veterinary Parasitology*, v.43, p.29-34, 2007.
- ADAMU, S., MAASHIN USEH, N., IBRAHIM, D.N., NOK, A.J. & ESIEVO, K.A.N. Erythrocyte surface sialic acid depletion as predisposing factor to erythrocyte destruction in sheep experimental model of African trypanosomosis: A preliminary Report, *Slovenian Veterinary Research*, v.46, n.1, p.19-28, 2009.
- ALMEIDA, K. S. **Alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e histopatológicas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905)**. 2007, 110 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.
- ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; TEBALDI, J. H.; ALESSI, A. C.; MACHADO R. Z.; NASCIMENTO, A. A. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 3, p. 669-676, 2010.
- ANOSA, V. O.; LOGAN-HENFREY, L. L.; SHAW, M. K. A light and electron microscopic study of changes in blood and bone marrow in acute hemorrhagic *Trypanosoma vivax* Infection in calves. *Veterinary Pathology*, v. 29, n. 1, p. 33-45, 1992.
- ANOSA, V. O.; ISOUN, T. T. Haematological studies on *Trypanosoma vivax* infection of goats and intact and splenectomized sheep. *Journal Comparative Pathology*, v. 90, n. 1, p.155-168, 1980.
- ANOSA V.O. Diseases produced by *Trypanosoma vivax* in ruminantes, horses and rodents. *Veterinary Medical act*, v.30, p. 717-741, 1983.

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

BASTOS, T.S.A; MADRID D.M.C; FARIA A.M; BESSA L.C; SOUZA, A.M; LINHARES, G.F.C. Detecção de *Trypanosoma vivax* por diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico realizadas a Campo. II Simpósio Internacional de Medicina Veterinária Preventiva (II SIMPREV - 2015). **Revista Ars Veterinária**, v.31, n.2, p.40, 2015.

BATISTA J. S., BEZERRA F.S.B., LIRA R.A., CARVALHO J.R.G., ROSADO NETO A.M., PETRI A.A & TEIXEIRA M.M.G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 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., PAIVA E.S., BRITO P.D., MEDEIROS J.M.F., RODRIGUES A.C., 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, p.131-135, 2009.

BATISTA J.S., RIETE-CORREA F., TEIXEIRA M.M.G., MADRUGA C.R., SIMÕES S.V.D & MAIA 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.174-181, 2007.

BATISTA J.S., RODRIGUES C.M., OLINDA R.G., SILVA T.M, VALE R.G., CÂMARA A.C., REBOUÇAS R.E., BEZERRA F.S., GARCIA H.A., TEIXEIRA M.M. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Journal Parasitology Research**, v. 110, p. 73-80, 2012.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, n. 2, p.74-80. 1994.

BEZERRA F.S.B., GARCIA H.A., ALVES H.M., OLIVEIRA I.R.S., SILVA A.E., TEIXEIRA M.M.G., BATISTA J.S. *Trypanosoma vivax* in testicular and epididymal tissues of experimentally infected sheep, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.575-582, 2008.

BEZERRA F.S.C., BATISTA J.S., SOUSA F.D.N., LIRA R.A., CARVALHO J.R.G & GODOI R.M.I. Aspectos clínicos e reprodutivos da infecção natural por *Trypanosoma vivax* em bovinos leiteiros no Alto Sertão da Paraíba. In: **Anais IV Congresso Nordestino de Produção Animal**, Petrolina, p.1135-1137, 2006.

BOULHOSA J. **Informação Científica, Boletim Técnico Ministério da Agricultura**, p.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. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, p.118-124, 2012.

CADIOLI F.A; FIDELIS JUNIOR O.L; SAMPAIO P.H; SANTOS G.N; ANDRÉ M.R; CASTILHO K.J.G.A; MACHADO, R.Z. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. **Veterinary Parasitology**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.001>. 2015.

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 Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n.3, p. 769-771, 2008.

CONNOR, R.J.; VAN DEN BOOSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Eds.). Infectious diseases of livestock. 2nd ed. South Africa: **Oxford University Press**, v.1, p.251-296, 2004.

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

CORTEZ A.P., VENTURA R.M., RODRIGUES A.C., BATISTA J.S., PAIVA F., AÑES N., MACHADO R.Z., GIBSON W.C & TYEIXEIRA M.M.G. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South América and África. **Veterinary Parasitology**, v.133, p.159-169, 2006.

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

CROSS, G. A. M. Antigenic variation in African Tripanosomes and malaria. In: MARR, J. J.; NILSEN, T. W.; KOMUNIECKY, R. W. **Molecular Medical Parasitology**, p. 82-110, 2003.

CUGLOVICI D.A., BARTHOLOMEU D.C., REIS-CUNHA J.L., CARVALHO A.U., RIBEIRO M.F. Epidemiologic aspectos of in outbreak of *Tripanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.320-326, 2010.

DAGNACHEW, S.; BEZIE, M. Review on *Trypanosoma vivax*. **African Journal Basic & Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 41-64, 2015.

DAGNONE, A.S.; SOUZA, A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, RZ. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.20-25, 2009.

DAVILA A.M.R., HERREIRA H.M., SCHLENBINGER T., SOUSA S.S., TRAUB-CSEKO Y.M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomiasis in the Pantanal, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.1-13, 2003.

DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Animal tripanossomíases in South América. Current status, partnership, and information technology. **In: Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 199-212, 2000.

DAVIES, C.E., ROBINS, R.S., WELLER, R.D. & BROUDE, A.I. Thrombocytopenia in experimental trypanosomiasis, **Journal of Clinical Investigation**, v.53, n. 1, p.1359-1367, 1974.

DA SILVA A.S., OLIVAEIRA B.C., ZANETTE A. R., SOARES C.D.M., CORADINI G., POLENS C.H., SANTURIO J.M & MONTEIRO S.G. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira, Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.3, p.373-376, 2007.

DARGANTES, A.P., CAMPBELL, R.S., COPEMAN, D.B., REID, S.A. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. II. Pathology. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p.267-276, 2005.

DELESPAUX, V.; AYRAL, F.; GEYSEN, D.; GEERTS, S. PCR- RFLP using Ssu-rDNA amplification: applicability for the diagnosis of mixed infections with different trypanosome species in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 185-193, 2003.

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

DESQUENES, M., GARDINER, P.R. Épidémiologie de la trypanosome bovine (*Trypanosoma vivax*) em Guyana Française. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, v.46, p. 463-470, 1993.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité du test de WOO pour la détection de *Trypanosoma vivax*. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, v. 49, p. 315-321, 1996.

DIRIE M.F., OTTE M.J., THATTHI R & GARDINER P.R. Comparative studies of *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.106, p. 21-29, 1993.

DUTRA, S. I. Sanidade permitirá que pecuária eleve rentabilidade. **Revista visão agrícola** n° 3, p.29-31, 2005.

DWINGER R.H., Hall M.J.R. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* in ruminants in Latin America a review. **In 51-58 International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria (eds), Animal Trypanosomiasis: Diagnosis and Epidemiology. Backhuys Publishers**, p.50-55, 2000.

ECKERSALL, P. D.; CONNER, J. G. Bovine and canine acute phase protein. **Veterinary Research Communications**, v. 12, p.169-178, 1988.

EMBRAPA (a), **Gado de leite. Panorama do leite. Ano 6 - Nº 62** - Janeiro de 2012. O Brasil produziu 30 bilhões de litros de leite. Disponível em: <

<http://www.cileite.com.br/content/obrasil-produziu-30-bilh%C3%B5es-de-litros-em-2010>>. Acesso 06/06/ de 2016.

EMBRAPA (b), **Gado de leite. Tabelas informativas**: Ranking da produção de leite por Estado, 2010/2011 Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/p/roducao/tabela0240.php>> Acesso em: 06/06/2012.

ESIEVO, K.A.N. **In-vitro production of neuraminidase (sialidase) by *Trypanosoma vivax***, **Proceedings of the 16th meeting of the International Scientific Council for Trypanosomiasis. Nairobi, Kenya: Organization of African Unity, Scientific, Technical and Research and Control**, p.205-210, 1979.

FAO. The state of food and agricultura 2003-2004. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, 2004.

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

FIDELIS JUNIOR, O. L. **Patogenicidade do isolado “Lins” de *Tripanosoma vivax* em bovinos natural e experimentalmente infectados**. 2014. 82 f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2014.

FIDELIS JUNIOR, O.L; SAMPAIO, P.H; MACHADO, Z.R; ANDRÉ, R.M; MARQUES, C.L; CADIOLI, A.F. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 25, p. 69-81, 2016.

FRANGE, C.C.R; BITTAR, R.E; BITTAR, F.F.J; CAMPOS, G.T.M. Tripanossomíase em vacas da microrregião de Uberaba – Mg: estudo soropidemiológico. **Revista Encontro de Pesquisa em Educação**, v. 1, p. 3, 2013.

GALIZA, G.J.; GARCIA, H.A.; ASSIS, A.C; OLIVEIRA D.M; PIMENTEL L.A; DANTAS A.F; SIMÕES S.V; TEIXEIRA M.M; RIETE-CORRÊA F. High mortality and lesions of the central nervous system in Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 359-363, 2011.

GARDINER, P. R.; ASSOKU, R. K. G.; WHITELAW, D. D.; MURRAY, M. Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection in ayrshire cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 31, p. 187-197, 1989.

GIBSON, W. African trypanosomosis. In: PALMER, S.R., SOULSBY, L., SIMPSON, D.I.H. Zoonoses. Biology, clinical practice, and public health control. New York: **Oxford University Press**, cap. 41, p. 501-512, 1998.

GEERTS S., HOLMES P.H., EISLER M.C., DIALLO O. African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. **Trends Parasitology**, v.17, p.25-28, 2001.

GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 171- 180, 2003.

GONZATTI, M.I.; GONZÁLEZ-BARADAT, B.; ASO, P.M. et al. *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Trypanosomosis in Latina America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In: **MAGEZ, S.; RADWANSKA, M. Trypanosomes and Trypanosomiasis. Springer-Verlag Wien, London, 2014.**

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

GRAB, D.J., NIKOLSKAIA, O.V., INOUE, N., THEKISOE, O.M., MORRISON, L.J., GIBSON, W., DUMLER, J.S. Using detergent to enhance detection sensitivity of Africantrypanosomes in human CSF and blood by loop-mediated isothermalamplification (LAMP). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1249. 2011.

GUEDES JÚNIOR, D.S.; ARAÚJO, F.R.; SILVA, F.J.M. et al. Frequency of antibodies to Babesia bigemina, B. bovis, Anaplasma marginale, *Trypanosoma vivax* and Borrelia burdgorferi in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v.12, p.105-109, 2008.

GUEGAN, F., N. PLAZOLLES, T. BALTZ & V. COUSTOU. Erythrophagocytosis of desialylated red blood cells is responsible for anaemia during *Trypanosoma vivax* infection. **Cellular Microbiology**, v.15, p. 1285-1303, 2013.

GUERRA N.R., MONTEIRO M.F.M., SANDES H.M.M., CRUZ N.L.N., RAMOS C.A.N., SANTANA V.L.A., SOUZA M.M.A. & ALVES L.C. Detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de Imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p.1423-1426, 2013.

GUERRA R.M.S., FEITOSA-JUNIOR A.B., SANTOS H.P., SILVA A.L.A., SANTOS C.G. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, p.833-835, 2008.

HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT, E.B.; PITULLE, C. Differentiation of Ehrlichia platys and E. equi infections in dogs by using 16S ribosomal DNA-based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.4577-4578, 2001.

HENRY, A.O.M; RON-ROMAN, J; REYNA-BELLO, A; Ma, C.L. First report and molecular identification of *Trypanosoma vivax* in cattle from Ecuador. In: **Conference: XIII International Congress of Parasitology (ICOPA XIII)**. At México, Volume: Abstract 1936, August 2014.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, p. 265, p. 621-636, 1990.

HERRERA H.M., RADEMARKER V., ABREU U.G.P., DANDREA P.S. & JANSEN A.M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.125, p.263-275, 2004.

HOARE C.A. The Trypanosomes of Mammals. **Oxford: Blackwell Scientific Publications**, 1972.

IBGE, tabelas informativas - Produção de leite no período de 2013/2014. Segundo as Grandes Regiões e as Unidades da Federação – 2014. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/tabelas_pdf/tab06.pdf> Acessado em 06/06/2016.

IHEDIOHA, J.I., ONUMA, C.J., OKORIE-KANU, C.O. AND IHEDIOHA T.E. Changes in the pathogenicity of relapsed diminazene aceturate (DA) - resistant *Trypanosoma brucei brucei* as the trypanosomes are transmitted from DA-treated hosts to another set of animals. **Comparative Clinical Pathology**, v.19, p. 481 – 486, 2010.

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

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. 2014/ 2016. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/tripanossomose-bovina-vem-ganhando-forca-e-preocupa-pecuaristas-em-minas-gerais-99579n.aspx>. Acessado em 09/06/2016.

JENNINGS, F.W. The anaemia of parasitic infections. **Proceedings of the 7th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology**, p. 41-67, 1975.

JONES, T.W., DÁVILA, A.M. *Trypanosoma vivax* out of África. **Trends in Parasitology**, v.17, p.99-101, 2001.

KARLE, H. The pathogenesis of the anaemia of chronic disorders and the role of fever in erythropoiesis. **Scandinavian Journal of Haematology**, v.13, p.81-86, 1974.

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

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

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

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.

LOSOS, G. J.; IKEDE, B. O. Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodiesiense* and *T. gambiesiense*. **Veterinary Parasitology**, v. 9, n. 1, p 1-71, 1972.

LUCAS, S. Pathology of tropical infections. **In: MCGEE, J.O.D.; ISAACSON, P.G.; WRIGHT, N.A. Oxford textbook of pathology**. New York: Oxford University Press, v.2, p.2187-2265, 1992.

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 JR M.S.C. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.801-807, 2006.

MADRUGA, C.R. Frequência de anticorpos para *Trypanosoma vivax* no cerrado sul do Estado do Mato Grosso. **Veterinary Bulletin, Farnham Royal**, v. 34, n. 563, p. 1-7, 1964.

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

MADRUGA, C. R. Epidemiologia do *Trypanosoma vivax* e aspectos da infecção em bovinos. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12**. Rio de Janeiro, 2002. Palestras... [São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária], 2002.

MASAKE, R.A.; NANTULYA, V.M.; PELLÉ, R. A species-specific antigen of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* detectable in the course of infection is encoded by a differentially expressed tandemly reiterated gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, p. 207-218, 1994.

MASIGA, D.; SMYTH, A.; HAYES, P.. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. **International Journal for Parasitology**, v. 22, p. 909-918, 1992.

MASSUNG, R.F.; SLATER, K.G. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.717-722, 2003.

MBAYA A.W., ALIYU M.M & IBRAHIM U.I. Clinico-pathology and mechanisms of trypanosomiasis in captive and free-living wild animals: **A review, Veterinary Research Communications**, v.33: p.793-809, 2009.

MBAYA A.W., ALIYU M.M & IBRAHIM U.I. Effect of DL-a-difluoromethylornithine on biochemical changes in baboons (*Papio Anubis*) experimentally infected with *Trypanosoma brucei gambiense*. **Nigerian Veterinary Journal**, v.30, n.1, p.35-44, 2009.

MBAYA A.W., ALIYU M.M., NWOSU C.O., TAIWO V.O & IBRAHIM U.I. Effects of melarsamine hydrochloride (Cymelarsan^R) and diaminazene aceturate (Berenil^R) on the pathology of experimental *Trypanosoma brucei* infection in red fronted gazelles (*Gazella rufifrons*), **Veterinary Parasitology**, v.163, p.140-143, 2009.

MBAYA A.W., ALIYU M.M., NWOSU C.O., TAIWO V.O. An assessment of the efficacy of DFMO in baboons (*Papio Anubis*) infected with *Trypanosoma brucei gambiense*. **Global Journal of Pure and applied Sciences**, v.15, n.1, p.69-78, 2009.

MBAYA A.W., ALIYU M.M., NWOSU C.O., & EGBE-NWIYI, T.N.C. The relationship between parasitaemia and anaemia in a concurrent *Trypanosoma brucei* and *Haemonchus contortus* infection in red fronted gazelles (*Gazella rufifrons*). **Veterenarski Arhiv**, v.79, p.451-460, 2009.

MBAYA A.W., IBRAHIM U.I & APAGU S.T. Trypanosomosis of the dromedary camel (*Camelus dromedaries*) and its vectors in the tsetse-free arid zone of northeast, Nigeria. **Nigerian Veterinary Journal**, v. 31, p.195-200, 2010.

MBAYA A.W., IBRAHIM U.I. In-vivo and in-vitro activities of medicinal plants on haemic and humoral trypanosomes: **A review**, **International Journal of Pharmacology**, v.7, p. 1-11, 2011.

MBAYA A.W., NWOSU C.O & ONYEYILI P.A. Toxicity and anti-trypanosomal effects of ethanolic extract of *Butyrospermum paradoxum* (Sapotacea) stem bark in rats infected with *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.536-530, 2007.

MBAYA A.W., NWOSU C.O. & KUMSHE H.A. Genital lesions in male red fronted gazelles (*Gazella rufifrons*) experimentally infected with *Trypanosoma brucei* and the effect of melarsamine hydrochloride (Cymelarsan^R) and diminazene aceturate (Berenil^R) in their treatment. **Theriogenology**, v.16, p.721-728, 2011.

MELLADO M., VALDEZ R., LARA L.M., GARCIA J.E. Risk factors affecting conception, abortion and kidding rates of goats under extensive conditions. **Small Ruminant Research**, v. 55, p.191-198, 2004.

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

MERKURIA S., GADISSA F. Survey of bovine trypanosomosis and its vector in Metekel and Awi zones of North West Ethiopia. **Acta Tropical Journal**, v.71, n.1, p.57-71, 2011.

MENESES R. M. **Tripanossomose bovina em Minas Gerais, soroprevalencia e fatores de risco**. Tese doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária UFMG, Belo Horizonte, 61p. 2016.

MILLER, D.M; SWAN G.E; LOBETTI R.G; JACOBSON L.S. The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.76, p.146-150, 2005.

MIRUK A, HAGOS A, YACOB HT, ASNAKE F, BASU AK. Prevalence of bovine trypanosomosis and trypanocidal drug sensitivity studies on *Trypanosoma congolense* in Wolyta and Dawero zones of southern Ethiopia. **Veterinary Parasitology**, v.152, p. 141-147, 2008.

MONTEIRO A.A; TAMANINI R; DA SILVA L.C.C; MATTOS M.R; MAGNANI D.F; D'OVIDIO L; NERO L.A; BARROS M.AF; PIRES E.M.F; PAQUEREAU B.P D.P; BELOTI V. Características da produção leiteira da região do agreste do estado de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 28, n. 4, p. 665-674, 2007.

MONZÓN, C.M; MANCEBO, O.A; JIMÉNEZ, J.N. *Trypanosoma vivax* en Búfalos (*Bubalus bubalis*) en Formosa, Argentina. **Revista Veterinaria Argentina**, v 26, n° 268, 2010.

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

MORLAIS, I.; GREBAUT, P.; BOBO, J. M.; DJOHA, S.; CUNY, G.; HERDER, S. Detection and identification of trypanosomes by polymerase chain reaction in wild tsetse flies in Cameroon. **Acta Tropica Journal**, v. 70, p. 109-117, 1998.

MORLAIS, I.; RAVEL, S.; GRÉBAUT, P. et al. New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. **Acta Tropica Journal**, v. 80, p. 207-213, 2001.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

MURRAY M.& TRAIL J.C.M. Genetic resistance to animal trypanosomiasis in Africa. **Preventive Veterinary Medicine Journal**, v.2, p.541-551. 1985.

NAESSENS, J.; KITANI, H.; YAGI, Y.; SEKIKAWA, K.; IRAQI, F. TNF- α mediates the development of anaemia in a murine *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection, but not the anaemia associated with a murine *T. congolense* infection. **Clinical Experimental Immunology**, v. 139, n. 3, p. 403-410, 2005.

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

NDAO, M.; KELLY, N.; NORMANDIN, D.; MACLEAN, J. D.; WHITEMAN, A.; KOKOSKIN, E.; AREVALO, I.; WARD, B. J. *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked

immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkeys-related injuries. **Comparative Medicine**, Memphis, v. 50, n. 6, p. 658-665, 2000.

NJIRU, Z.; OUMA, J.; BATETA, R. et al. Loop-mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma vivax* based on satellite repeat DNA. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 358-362, 2011.

NUNES, V.L.B. et al. Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* no Pantanal Sul-Mato-Grossense. Estudo de reservatórios. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, p. 41-44, 1993.

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.

OLUBAYO, R. O.; MUGERA, G. M. Patogénese of haemorrhages in *Trypanosoma vivax* in cattle. I. Disseminated intravascular coagulation. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v.33, n.3, p.211-217, 1985.

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

PAIVA F., LEMOS R.A.A., NAKASATO L., MORI A.E., BRUM K.B., BERNADO K.C. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. I- Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, p.135-141, 2000.

PEREGRINE, A. S. Chemotherapy and Delivery Systems: Haemoparasites. **Veterinary Parasitology**, v.54, p.223-248, 1994.

PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M. Pharmacology of Dimmenazene: A Review. **Acta Tropica Journal**, v.54, p.185-203, 1993.

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

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

PLATT, K. B.; ADAMS, L. G. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for detecting *Trypanosoma vivax* in South American cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 21, n. 1, p. 53-58, 1976.

QUISPE A.P., CHÁVEZ V.A., CASAS A.E., TRIGUEROS V.A. & SUÁREZ A.F. Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de la provincia de Coronel Portillo, Ucayali. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, v.14, p.161-165, 2003.

RIVERA, M. **Hemoparasitosis Bovinas. Universidad Central de Venezuela.** 1era Edición. Anaeco Ediciones, C.A. Caracas, Venezuela. pp 15-84. 1996.

RODRIGUES, A. C.; NEVES, L.; GARCIA, H. A.; VIOLA, L. B.; MARCILI, A.; DA SILVA, F. M.; SIGAUQUE, I.; BATISTA, J. S.; PAIVA, F.; TEIXEIRA, M. M. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 1317-1328, 2008.

RODRIGUES F.M.C., OLINDA G.R., SILVA F.M.T., VALE G.V., DA SILVA E.A., LIMA L.G., GARCIA A.H., TEIXEIRA G.M.M., BATISTA S.J. Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. **Veterinary Parasitology**, v.191, p.146-153, 2013.

REBENSKI, D.E.; WINGER, E.M.; ROGOVIC, B. et al. Improved methods for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 249-253, 1999.

ROSSI S.M; SIGALES, L y ZAPATA, D. Inmunoensayo de capa fina (icf) en el serodiagnóstico de la tripanosomiasis bovina causada por el *Trypanosoma vivax*. **Revista Faculdade Ciencias Veterinarias**, v.49, n°2, p. 81-89, 2008.

RUE, M.L. et al. Leucocyte and reticulocytes counts in acute infection of dogs with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.42, p.163-166, 2000.

SALGADO, B.S.; BATTAGLIA, C.T.; STUCHI, R.S. et al. What is your diagnosis? Lymphadenopathy in a cow with severe anemia. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, p. 103-104, 2011

SAMPAIO, P. H. **Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados pelo Trypanosoma vivax.** 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANNI, M.T; ONASANYA, G.O; ADEFENWA, A.M; YAKUBU, A; IKEOBI, C.O.N; ADEBAMBO, O.A; TALABI, A.O; OZOJE, M.O; WHETO, M; TAKEET, M.I; PETERS, S.O; DONATO, M; THOMAS, B.N; IMUMORIN, I.G. Molecular Diagnosis of Subclinical African *Trypanosoma vivax* Infection and Association with Physiological Indices and Serum Metabolites in Extensively Managed Goats in the Tropics. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 3, p. 39-45, 2013.

SCHOFIELD, C.J.; KABAYO, J.P. Tripanosomiasis vector control in Africa and Latin America. **Parasitology Vectors**, v. 1, p. 1-7, 2008.

SDT / MDA – Secretaria de Desenvolvimento Territorial / Ministério do Desenvolvimento Agrário. **Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável do Agreste Meridional de Pernambuco**, Brasília: SDT/MDA, 2011.

SEKONI V.O., REKWOT P.I & BAWA E.K. Effects of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infections on the reaction time and semen characteristics of Zebu (Bunaji) x Friesian crossbred bulls. **Theriogenology**, v.61, p.55-62, 2004.

SEIDL, A.; DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian lowlands. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 269-272. 1999.

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

SHEHU S.A., IBRAHIM N.D.G., ESIEVO K.A.N & MOHAMMED G. Role of erythrocyte surface sialic acid inducing anaemia in Savannah Brown bucks experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterenarski Arhiv**, v.26, p.521-530, 2006.

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, n.8, p.2550-2554, Nov, 2009.

SILVA R.A.M.S., HERRERA M.M., DOMINGOS L.B.S. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and horses: hematological and clinical aspects. **Ciência Rural**, v. 25, p.233-238, 1995.

SILVA R.A.M.S., MORALES G., EULERT E., MONTENEGRO A., YBAÑES R. Outbreaks of trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in cattle in Bolivia. **Veterinary Parasitology**, v.76, p.153-157, 1998.

SILVA R.A.M.S., SANCHEZ V., DÁVILA A.M.R. Métodos de Diagnósticos Parasitológicos das tripanossomoses Bovinas e Equinas. **Circular Técnico**, Embrapa, Corumbá, MS, Dezembro, 2003.

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

SILVA, R. A. M. S.; LIMA, E. S. S.; RAMIREZ, S. Quimioterapia das Tripanossomoses ocorrentes no Pantanal. Corumbá: EMBRAPA, 2004. 26 p. (**Documentos**, 65).

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 Pantanal**, Corumbá. 30p, 2004.

SILVA S.A., TOCHETTO C., ZANETTE R.A., PIEREZAN F., RISSI D.R., SANTURIO J.M., MONTEIRO S.G. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1357-1362, ago, 2008.

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

SILVA M.F.T., OLINDA G.R., RODRIGUES M.F.C., CÂMARA C.A., LOPES C.F., COELHO A.C.W., RIBEIRO F.B.M., FREITAS I.A.C., TEIXEIRA M.G.M., BATISTA S.J. Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. **Veterinary Research**, v.44, 2013.

SINYANGWE L., DELESPAUX V., BRANDT J., GEERTS S., MUBANGA J., MACHILA N., HOLMES P.H. & EISLER M.C. Trypanocidal drug resistance in eastern province of Zambia. **Veterinary Parasitology**, v, 119, p. 125-135, 2004.

SOLANO, P.; MICHEL, J.F.; LEFRANÇOIS, T. Polymerase chain reaction as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 95-103, 1999.

STEPHEN L.E. Trypanosomiasis: a veterinary perspective. 1st ed. **Pergamon Press, New York**. 533p. 1986.

STEVENS, J. R.; BRISSE, S. Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P. H.; MILES, M. A. (Ed.). **The Trypanosomiasis**. Cambridge: CABI Publishing, cap. 1, p. 1-24, 2004.

STILES, J. K. et al. Trypanosome apoptotic factor mediates apoptosis in human brain vascular endothelial cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.133, p.229-240, 2004.

SUÁREZ C., GARCÍA F., ROMÁN D., CORONADO A., PERRONE T., REYNA A. & PARRA N. Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. **Zootecnia Tropical**, v.27, p.363-372, 2009.

TEIXEIRA, M. C. A. **Estudo clínico, hematológico, bioquímico sérico, parasitológico, imunológico e patológico de bovinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* Steel, 1885 (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae)**. 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2010.

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

TIZARD, I.R., HOLMES, W.L. & NIELSEN, K. H. **Mechanisms of anaemia in trypanosomiasis**: Studies on the role of haemolytic fatty acids derived from, 1978.

TUNTASUVAN D., SARATAPHAN N., NISHIKAWA H. Cerebral tripanossomiasis in native cattle. **Veterinary Parasitology**, v.31, p.357-363, 1997.

UMAR, I.A., OGENYI, E., OKODASO, D., KIMENG, E., STANECHEVA, G.I., OMAGE, J.J., ISAH, S. & IBRAHIM, M.A. Amelioration of anaemia and organ damage by combined intraperitoneal administration of vitamin A and C to *Trypanosoma brucei* infected rats. **African Journal of Biotechnology**, v .6, p. 2083-2086, 2007.

UNSWORTH, K.; BIRKETT, J.D. The use of antrycide prosalt in protecting cattle against trypanosomiasis when in transit through tse-tse areas. **Veterinary Record**, v. 64, p.351-353, 1952.

VENTURA, R.M., TAKATA S.AC., SILVA A.M.S.R., NUNES L.V., TAKEDA F.G., TEIXEIRA M.M.G. Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in 417 trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. **Journal of Parasitology**, v.86, p.1289-1298, 2000.

VENTURA, R.; PAIVA, F.; SILVA, R. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 37-48, 2001.

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

WELLS, E. A. Animal trypanosomiasis in South America. **Preventive Veterinary Medicine Journal**, v. 2, p. 31-41, 1984.

WELLS, E. A.; Betancourt, A.; Ramirez, L. E. *Trypanosoma vivax* in Colombia. Epidemiology and economic impact. **World Animal Review**, p. 17-23, 1982.

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

WHITELAW D.D., BELL I.R., HOLMES P.H. Immunological clearance of Se-labeled *Trypanosoma brucei* in goats. **Acta Tropical Journal**, v.46, p.101-106, 1989.

WILLIAMS D.J.L; TAYLOR K.A; NEWSON J.; GICHUKI B. The role of anti-variable surface glycoproteins antibody response in bovine trypanotolerance. **Parasite Immunology**, v. 18, p. 209-218, 1996.

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

WOODRUFF A.W., TOPLEY E., KNIGHT R. & DOWNIE C.G.B. The anaemias of Kalaazar. **British Journal of Haematology**, v.22, p.319-329, 1972.

WRIGHT. P.F.; NILSSON, E.; VAN, R. et al. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infections disease diagnosis. **Revue Scientifique et Technique. International office of Epizootics**, v. 12, p. 435-450, 1993.

ZARLENGA DS, HIGGINS J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary parasitology**, v. 101, p. 215-230, 2001.

ZOCCAL R; HOTT C. M; CARVALHO R. G; REIS R; LIMA O. C. Produção de leite no mundo, no Brazil e no Nordeste. In: CARVALHO, R.G; CARNEIRO, V. A; YAMAGUCHI, T.C.L; MARTINS C.P; HOTT, C. M; REIS FILHO, C.J. R; OLIVEIRA, A. M. Competitividade da cadeia produtiva do leite em Pernambuco. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009, 376 p.

4. CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO (Artigo adaptado para publicação nas Normas da revista Semina: Ciências Agrárias, submetido e em processo de avaliação.)

**CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS AND DAIRY COWS
DIAGNOSIS OF NATURALLY INFECTED BY *Trypanosoma vivax* IN PERNAMBUCO
AND ALAGOAS STATES, BRASIL.**

**ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO DE BOVINOS
LEITEIROS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Trypanosoma vivax* NOS ESTADOS
DE PERNAMBUCO E ALAGOAS, BRASIL.**

ABSTRACT

Trypanosoma vivax is the most pathogenic ruminant's hemoparasite, causing huge economic losses to the producer when prevalent in the herd. This study aims to characterize the tripanossomose in cattle through clinical findings, epidemiological risk factors and diagnosis of this disease in outbreaks occurred in the pernambucano and alagoano wild. On the properties were performed analysis of historical and clinical examinations, blood collection and clinical monitoring of 109 sick animals for a period of one year. The clinical findings were fever, apathy, anorexia, diarrhea, progressive weight loss, lymphadenopathy, pale mucous, incoordination, aggressiveness, abortion, decrease in milk production and high mortality. Of the 109 samples analyzed in laboratory tests, in two occasions with an interval of eight months, 97.2% (106/109) were positive by ELISA, 90% (98/109) were positive for IFAT, 15% (16/109) positive in the PCR and 10.1% (11/109) were observed the presence of *Trypanosoma* spp in the blood smear. In 13 samples, blood counts were made which revealed that 69.23% (9/13) showed normocytic normochromic anemia and 53.84% (7/13) had leukocytosis, in 46.15% (6/13) neutrophilia and shift left regenerative. In 72 samples also examined whether it hematocrit, plasma protein and fibrinogen. Hematocrit, had average 22% (10% to 37%) to plasma protein had a mean value of 7.55 g / dl (5.4 g / dl to 10.0 g / dl) and plasma fibrinogen had a mean value 700mg / dl (200mg / dl to 1600mg / dl). The sequencing of DNA samples revealed 100% similarity with *T. vivax*. The main factors involved in the spread of the disease were: the ingress of animals without prior tests and quarantine infected with *T. vivax* in the properties, application of oxytocin with sharing needles contaminated by blood at the time of lactation and the restriction of the disease in the lactation herd. The transmission of *T. vivax* occurred with the sharing of needles among animals lactation during application of oxytocin after the entry of carrier animals in the herd. Serological tests demonstrated a higher sensitivity and specificity, entretando, PCR and blood smear revealed a low sensitivity because the animals were already being treated with trypanocidal drugs. It is concluded that trypanosomiasis is a disease to be considered in the cattle regions studied as the cause of outbreaks. Hygienic and security actions must be taken during the administration of oxytocin in lactating cows being this practice, when carried incorrectly and without hygienic criterios and sharing needles, the main risk factor in the transmission of trypanosomiasis in leiteiros herds among regions where the disease is prevalent, increasing the challenge of reinfection of animals.

Keyword: diagnosis, disease, ruminant, *Trypanosoma vivax*.

RESUMO

O *Trypanosoma vivax* é o hemoparasito mais patogênico para ruminantes, causando grandes perdas econômicas para o produtor quando prevalente no rebanho. Este trabalho se propõe a caracterizar a tripanossomose em bovinos através dos achados clínicos, fatores epidemiológicos de risco e diagnóstico dessa doença em surtos ocorridos no agreste pernambucano e alagoano. Nas propriedades foram realizados levantamentos dos históricos e exames clínicos, coletas de sangue e acompanhamento clínico de 109 animais doentes por um período de um ano. Os achados clínicos foram: febre, apatia, anorexia, diarreia, emagrecimento progressivo, linfadenomegalia, mucosas pálidas, incoordenação motora, agressividade, aborto, queda na produção de leite e alta mortalidade. Das 109 amostras colhidas para exames laboratoriais, em dois momentos com intervalo de oito meses, 97,2% (106/109) foram positivas no ELISA, 90% (98/109) foram positivas para RIFI, 15% (16/109) positivas para PCR e 10,1% (11/109) foram evidenciadas presença do *Trypanosoma* spp. no esfregaço sanguíneo. Em 13 amostras, foram realizados hemogramas o que revelou que 69,23% (9/13) apresentaram anemia normocítica normocrômica e 53,84% (7/13) apresentaram leucocitose, em 46,15% (6/13) neutrofilia e desvio a esquerda regenerativo. Em 72 amostras analisou-se também o hematócrito, proteína plasmática e o fibrinogênio. O hematócrito, teve valor médio de 22% (10% a 37%), a proteína plasmática teve valor médio de 7,55 g/dl (5,4g/dl a 10,0g/dl) e o fibrinogênio plasmático teve valor médio de 700mg/dl (200mg/dl a 1600mg/dl). O sequenciamento das amostras de DNA revelou 100% de similaridade com *T. vivax*. Os principais fatores envolvidos na propagação da doença foram: a entrada de animais portadores do *T. vivax* nas propriedades sem exames prévios e quarentena, a aplicação de ocitocina com compartilhamento de agulhas contaminadas por sangue no momento da ordenha e a restrição da doença ao rebanho em lactação. A transmissão do *T. vivax* ocorreu com o compartilhamento de agulhas entre os animais da lactação, durante aplicação de ocitocina, após a entrada de animais portadores no rebanho. Os testes sorológicos demonstraram uma maior sensibilidade e especificidade, entretanto, o PCR e o esfregaço sanguíneo revelou uma baixa sensibilidade em virtude dos animais já estarem sendo medicados com drogas tripanocidas. Conclui-se que a tripanossomose é uma doença a ser considerada na bovinocultura das regiões estudadas como causadora dos surtos. Medidas higiênicas e de segurança devem ser adotadas durante a administração de ocitocina nas vacas em lactação, sendo esta prática, quando realizada de forma errada e sem critérios higiênicos e com compartilhamento de agulhas, o principal fator de risco na transmissão da tripanossomose em rebanhos leiteiros em regiões onde a doença é prevalente, aumentando o desafio de reinfecções entre os animais.

Palavra-chave: diagnóstico, doença, ruminante, hemoparasito.

INTRODUÇÃO

Tripanossomose são doenças causadas por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma* spp, sendo o *Trypanosoma (Duttonella) vivax* considerado o hemoparasito mais patogênico e importante para

77 ruminantes, estando amplamente difundido no continente Africano, e nas Américas Central e do Sul
78 (VENTURA et al., 2000).

79 Nas Américas, a principal via de transmissão é a mecânica pelos vetores tabanídeos, *Stomoxys*
80 *calcitrans* e *Haematobia irritans*, e por via iatrogênica (OLIVEIRA et al., 2009; CADIOLI et al., 2012). A
81 infecção natural deste hemoparasito já é bem conhecida e relatada em vários países: Venezuela, Paraguai,
82 Colômbia, Suriname e Guiana, Bolívia, Peru e Costa Rica (QUISPE et al., 2003; SUAREZ et al., 2009).

83 No Brasil, os primeiros surtos ocorreram no estado do Pará em ruminantes (BOULHOSA 1946,
84 SHAW et al., 1972) e a partir de então vários outros foram relatados no país como no Mato Grosso (SILVA et
85 al., 1996), Amapá e Rio de Janeiro (MADRUGA et al., 2006), Tocantins (LINHARES et al., 2006), Paraíba
86 (BATISTA et al., 2007), Santa Catarina (DA SILVA et al. 2007), Maranhão (GUERRA et al., 2008), Minas
87 Gerais (CARVALHO et al., 2008), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009), e em São Paulo (CADIOLI et
88 al., 2012).

89 No estado de Pernambuco, foi realizado o primeiro registro na zona da mata, (PIMENTEL, et al.,
90 2012), em um rebanho de gado de leite e o primeiro inquérito sorológico para detecção de anticorpos contra
91 *T. vivax* confirmou em todas as mesorregiões estudadas (Litoral, Zona da Mata, Agreste e Sertão) frequências
92 variando de 11,90% a 15,99%, caracterizando o estado como área de instabilidade enzoótica (GUERRA et al.,
93 2013).

94 As condições epidemiológicas encontradas da tripanossomose em diversas áreas do Brasil mostram
95 que esse parasito tem sua ocorrência de forma diferenciada com o que ocorreu no pantanal mato-grossense
96 (região endêmica), gerando graves impactos negativos de natureza econômica em rebanhos bovinos,
97 principalmente em áreas onde há instabilidade enzoótica para a enfermidade. (MADRUGA et al., 2006;
98 BATISTA et al., 2012; CADIOLI et al 2012; GUERRA et al., 2013).

99 A taxa de mortalidade em animais infectados pelo parasito geralmente é alta, podendo chegar a 80%
100 (CORTEZ et al., 2006). Os principais sinais clínicos incluem queda na produção de leite, apatia, anorexia,
101 emagrecimento progressivo, linfadenopatia, palidez das mucosas, diarreia, fraqueza e febre, assim como sérios
102 danos reprodutivos, como abortos, distocias e infertilidade. Alterações nervosas também são observadas, como
103 agressividade, incoordenação e ataxia. (LINHARES, et al., 2006; BATISTA, et al., 2007; CUGLOVICI, et al.,
104 2010; BATISTA, et al., 2012).

105 Diante deste contexto, com o proposito de se conhecer melhor as características epidemiológicas,
106 assim como o quadro clínico e laboratorial da tripanossomose em animais acometidos em propriedades
107 leiteiras no agreste, dos estados de Pernambuco e Alagoas, se fez necessário a realização deste trabalho.

108 MATERIAL E MÉTODOS

109 *Caracterização dos surtos e sinais clínicos*

110

111 Os surtos aqui descritos ocorreram em três propriedades leiteiras localizadas na região nordeste do
112 Brasil, duas destas no estado de Pernambuco e a última no estado de Alagoas. O **primeiro surto** ocorreu no
113 início de novembro de 2013 em uma fazenda no município de Bom Conselho (latitude 09° 10' 11" S e longitude

114 36° 40' 47" W), altitude 654m, temperatura média 21,6 °C. A pluviosidade média anual é 995 mm, agreste do
 115 estado de Pernambuco com clima semiárido (MASCARENHAS, et al., 2005). O rebanho leiteiro era composto
 116 por 120 animais mestiços de holandês, destes, 60 animais estavam em lactação, eram ordenhados
 117 mecanicamente. O sistema de criação era semi-intensivo, e chegou a produzir em média 1100 L/leite/dia, antes
 118 da doença e baixou para 250 litros, quando os animais começaram a adoecer. Na primeira visita realizada na
 119 propriedade as informações passadas pelo proprietário quanto a sintomatologia apresentada pelos animais
 120 foram, apatia, anorexia, fraqueza, emagrecimento progressivo, mucosas pálidas, linfonodos aumentados,
 121 diarreia, febre, aborto, um animal apresentou agressividade e incoordenação, vindo a óbito. No total 30 animais
 122 morreram com essa sintomatologia, e a doença só acometia as vacas em lactação. O **segundo surto** ocorreu
 123 no final de janeiro de 2014 em uma fazenda no município de Pedra, agreste meridional (latitude 08° 29' 49"
 124 e longitude 36° 56' 27"), altitude 617 metros, temperatura média 25°C, com índice pluviométrico médio anual
 125 de 624,88mm (MASCARENHAS, et al., 2005). A fazenda tem uma área total de 100 hectares, composta de
 126 100 animais mestiços de Holandês, sendo destes, 62 animais em lactação ordenhados mecanicamente, todos
 127 criados em sistema de produção semi-intensivo, com produção de 600 litros/leite/dia antes da doença e 230
 128 litros após os animais começarem a adoecer, alimentados com silagem de milho, farelo de milho, mandioca e
 129 pasto nativo. Dois animais doentes foram internados na Clínica de Bovinos, UFRPE, Garanhuns/PE, com o
 130 histórico de apatia, perda de peso progressiva, diarreia, mucosas pálidas, fraqueza, anorexia, incoordenação e
 131 queda na produção de leite. Alguns animais apresentaram agressividade e ataxia, oito animais morreram, e
 132 apenas os animais em lactação estavam adoecendo. O **terceiro surto** ocorreu no final de setembro de 2014,
 133 em uma fazenda no município de Arapiraca, localizada na região central do estado de Alagoas, mesorregião
 134 agreste, (9°45'09" de latitude sul e 36°39'40" de longitude oeste), altitude 264m, caracterizada por
 135 temperaturas elevadas, com média anual de 25°C, e totais anuais de precipitação segundo o intervalo de 750 a
 136 1000 mm, (MASCARENHAS, et al., 2005). A fazenda possui uma área total de 200 hectares, um rebanho
 137 efetivo de 250 animais mestiços, sendo destes 102 animais em lactação, ordenhados mecanicamente, produzia
 138 média de 900l/leite/dia com queda para 420 litros após os animais adoecerem, criados em sistema semi-
 139 intensivo. Durante a primeira visita, o veterinário que presta assistência à fazenda, assim como os tratadores,
 140 informou que há quatro meses vinham perdendo animais na propriedade com os sinais de diminuição na
 141 produção de leite, apatia, anorexia, emagrecimento, febre, sialorréia, mucosas pálidas, um animal apresentou
 142 sintomatologia nervosa, dois animais abortaram e ao total, 15 animais vieram a óbito. A doença só acometia
 143 as vacas em lactação.

144 Em todas as propriedades visitadas foi aplicado um questionário epidemiológico ao veterinário,
 145 proprietário ou demais tratadores responsáveis pela propriedade, para obter informações quanto as medidas
 146 sanitárias adotadas durante o surto, quais medicamentos estavam sendo usados e a dose, as condições de saúde
 147 que encontrava o rebanho, assim como, se houve a introdução recente de animais dentro da propriedade ou a
 148 movimentação de animais em feira ou exposições. As instalações e as práticas de manejo foram inspecionadas
 149 para se obter informações que contribuíssem para caracterizar o surto e os fatores que diretamente favoreceram
 150 o seu desenvolvimento. Todos os animais doentes foram examinados conforme Dirksen et. al., (1993) e

acompanhados em intervalos quadrimestrais observando-se a evolução das alterações clínicas em um estudo prospectivo.

Coleta de Sangue

Amostras de sangue foram coletadas somente dos animais doentes ou pertencentes ao grupo de lactação das três propriedades, um total de 109 amostras. As amostras de sangue foram colhidas através da venopunção da veia jugular externa, utilizando tubos siliconizados tipo vacutainer® com anticoagulante EDTA e sem, para obtenção de soro, prontamente refrigeradas em isopores com gelo e conduzidas ao laboratório. As amostras com anticoagulante foram usadas para análises parasitológicas e hematológicas. Amostras sem anticoagulante foram submetidas a centrifugação por 10 minutos a 1500rpm, o soro foi separado do sangue e condicionado em tubos contendo alíquotas de 1,5ml, armazenados em freezer a -80°C, até serem utilizadas para os testes sorológicos. Um terço das amostras foram conservadas em etanol, e parte das amostras com anticoagulante foram congeladas a -80°C sem etanol, onde foram usadas para extração do DNA para o teste molecular.

Deteção do Parasita e análise hematológica

Das 109 amostras coletadas, em 13, foram realizadas hemograma que pertenciam a animais clinicamente doentes e em 72 amostras analisou-se apenas o hematócrito, proteína plasmática e o fibrinogênio além do exame parasitológico. A análise hematológica foi realizada conforme descrito por Jain (1993). Esfregaços sanguíneos corados com Panótipo rápido foram confeccionados onde realizou-se a pesquisa do *T. vivax* pela observação direta em microscopia óptica conforme, Silva et. al., (2002).

Diagnóstico sorológico

1. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

As lâminas de RIFI foram preparadas e sensibilizadas a partir de amostras de sangue de caprinos experimentalmente inoculados com o *T. vivax*, cepa ‘‘ Lins’’, (CADIOLI et al., 2012) obtendo-se o antígeno do sangue total conforme González et al (2005) e posteriormente, distribuído nas cavidades designadas nas lamina. As amostras de soro foram diluídas na proporção 1:80 em solução salina de fosfato tamponado PBS 1%, pH 7,2 (1,3 M NaCl; 27 mM KCl; 56 mM Na₂HPO₄; 10mM KH₂PO₄; 9,2 mM NaH₂PO₄) seguindo a metodologia preconizada por Aquino et al, (1999).

2. *Ensaio Imunoenzimático (ELISA)*

A purificação antigênica foi realizada conforme González et al. (2005) e posteriormente sonicadas em aparelho próprio (750w Ultrasonic Processor, Coleparmer – Canada) conforme descrito por Fidelis Junior (2014) e o conteúdo proteico do antígeno solúvel foi determinado utilizando o método do ácido bicicônico utilizando BCA kit de reagentes (BCA Reagents Kit- Pierce Chemical Company) e calculado por regressão linear conforme descrito em Sampaio (2013). O teste de Elisa foi realizado seguindo as recomendações de Aquino et al, (1999).

Diagnóstico molecular

1. *Reação em cadeia da Polimerase (PCR)*

As amostras de sangue colhidas foram submetidas ao teste usando um ensaio específico para o *T. vivax*. A extração do DNA das amostras com anticoagulante EDTA a 10% que estavam congeladas foi realizada utilizando um Kit QIAamp DNA mini and blood mini handkoob (Qiagen®) e as amostras conservadas em etanol foram submetidas a extração utilizando um buffer de lise e clorofórmio isoamílico (25:24:1). O DNA extraído das amostras foi quantificado utilizando um espectrofotômetro (Nanodrop®2000; Thermo SCIENTIFIC). A amplificação do DNA teve como alvo a sequência de genes codificadores de cisteíno-proteases (cathepsina L; CatL-Like) assim como as condições para a reação como descrito previamente por Cortez et al, (2009). A interpretação dos resultados, após a eletroforese em gel de agarose a 2% corados com o intercalante Brometo de Etídeo (Invitrogen®) em tampão de corrida TEB 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA) foi baseada na característica do amplicon, utilizando um marcador de peso molecular de 50bp (50pb DNA Ladder- Invitrogen®) e lidos em um leitor de gel radioiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-Eye II- Stratagene®).

2. *Sequenciamento do DNA e análise da sequência.*

Duas amostras de amplicons, produto da PCR, foram purificadas utilizando-se QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen®), conforme orientação do fabricante e encaminhadas para o centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) FCAV-UNESP - Campus Jaboticabal/SP para serem sequenciadas utilizando o sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA) conforme recomendações sugeridas pelo fabricante. As sequências obtidas, após o sequenciamento foram analisadas e comparadas com aquelas já inseridas no GenBank, onde foram verificadas similaridades entre elas através do programa BLAST (BENSON et al., 2002).

224 **Análise de dados:**

225 A análise estatística dos dados foi realizada de forma descritiva, determinando as distribuições de frequência
226 empregando-se a média e o desvio padrão das variáveis relativas analisadas (Curri, 1997).

227

228 **RESULTADOS**

229

230 *Caracterizações dos surtos e achados clínicos*

231

232 **Propriedade do primeiro surto.** Os primeiros casos ocorreram em novembro de 2013, cinco animais
233 foram trazidos a clínica de bovinos doentes, apresentando condição corporal grau II, anorexia, fraqueza,
234 diarreia e linfonodos aumentados, um animal já deu entrada morto. A pesquisa de hemoparasitas através do
235 esfregaço sanguíneo, não revelou a presença do *Trypanossoma* spp, dois animais vieram a morrer poucos dias
236 depois de internados. Na necropsia realizada dos três animais que morreram, o diagnóstico anatomopatológico,
237 mereceu destaque, foi de hepatopatia inespecífica, sendo que um destes apresentava também trombose de veia
238 mamária e pneumonia tromboembólica abscedativa. Na primeira visita realizada a propriedade constatou-se
239 que a doença estava acometendo apenas as vacas em lactação, estas foram examinadas e os achados clínicos
240 mais comuns foram apatia, anorexia, mucosas pálidas, febre, emagrecimento, diarreia, escore corporal grau II
241 e linfadenomegalia. No primeiro surto da doença, 24 animais morreram, destes, cinco animais apresentaram,
242 além dos sinais encontrados, sintomatologia nervosa, como incoordenação e agressividade, um animal abortou.
243 Através do inquerido epidemiológico, a partir de informações do proprietário e das observações realizadas na
244 inspeção a propriedade, revelou que cerca de 30 dias houve introdução de alguns animais comprados da mesma
245 região, no rebanho em lactação. A condição climática no início do surto era de seca, os animais estavam sendo
246 semiconfinados e alimentados com silagem de milho e concentrado comercial, as vacas eram ordenhas
247 mecanicamente, entretanto fazia-se uso de ocitocina com compartilhamento da mesma agulha e seringa entre
248 os animais, em condições higiênicas sanitárias da ordenha inadequadas. Na segunda e terceira visitas a
249 propriedade, realizada em dezembro de 2013 e em março de 2014, respectivamente, evidenciou-se que alguns
250 animais mantiveram a condição corporal grau II, a diarreia, e baixa produção de leite, o que foi comprovado
251 durante o exame clínico realizado, porém aparasitemicos. Os animais que apresentaram febre foram medicados
252 com Diaceturato (3,5mg/kg), segundo informações do proprietário da fazenda, e alguns animais foram
253 vendidos para fazendas vizinhas, entretanto, as condições de manejo de ordenha e uso de ocitocina com
254 compartilhamento de agulhas ainda se mantinha. Na 4ª visita a propriedade, em setembro de 2014, constatamos
255 que os animais com o escore corporal grau II visualizados na visita anterior, foram a óbito, e que os animais
256 recentemente introduzidos no rebanho em lactação, estavam adoecendo. Era frequente o uso do Diaceturato
257 (3,5mg/kg), quando os animais apresentavam febre, e nesse intervalo, 10 animais morreram, as condições
258 higiênicas sanitárias inadequadas da ordenha, assim como o uso de ocitocina compartilhando a mesma agulha
259 entre os animais se mantinha.

260 **Propriedade do segundo surto.** Dois animais doentes foram internados na Clínica de Bovinos com
261 sinais clínicos de perda na produção de leite, apatia, escore corporal grau II, anorexia, diarreia, sendo um deles

positivo para *Tripanossoma* spp. Na 1ª visita a propriedade, a partir do diagnóstico clínico, constatou-se animais doentes que apresentavam, os mesmos sinais acima relatados, incluindo alguns nervosos como agressividade, ataxia e sialoréia. Dois animais abortaram, e oito animais morreram da doença. A condição climática no início do surto era de seca, baixa oferta de alimento, os animais estavam sendo alimentados com palma, ração comercial e silagem de milho, em regime semi-intensivo. A ordenha era mecanizada e utilizava-se ocitocina com compartilhamento da mesma agulha e seringa entre os animais. Apenas as vacas em lactação começaram a adoecer após sete dias da introdução na ordenha de oito animais que foram comprados do estado do Maranhão. Na segunda visita a propriedade, realizada em setembro de 2014, foi informado pelo tratador que algumas vacas que adoeceram no início do surto foram vendidas e outras não ganhavam peso e apresentavam diarreia, porém não houve mais mortes após a medicação com diaceturato de diminazene. Em um animal houve retorno da parasitemia, confirmada pelo esfregaço sanguíneo, porém apresentava-se assintomático. Mudanças no manejo da ordenha foram adotadas, substituindo parte da ocitocina utilizada com a adoção de bezerro ao pé, entretanto nas vacas mestiças continuava o uso da ocitocina.

Na propriedade do terceiro surto, no exame clínico de 11 animais, os principais sinais encontrados foram queda na produção de leite, apatia, anorexia, sialorréia, mucosas pálidas, linfadenomalia, emagrecimento, e destes cinco animais apresentaram sinais nervosos como agressividade e incoordenação. Os animais estavam sendo tratados pelo proprietário com diaceturato de diminazene, Oxitetraciclina, cálcio, ferro, porém com resultados insatisfatórios. Através do inquérito epidemiológico a partir de informações cedidas pelo veterinário responsável e tratadores, associadas às observações realizadas na inspeção à propriedade constatou-se que apenas os animais em lactação estavam adoecendo, eram ordenhados mecanicamente e utilizava ocitocina no momento da ordenha com compartilhamento de agulha e seringa.

Deteção do parasita por diagnóstico parasitológico e análise hematológica

Esfregaço Sanguíneo: propriedade do primeiro surto, amostras de sangue foram coletadas de 26 animais clinicamente doentes, destas, 26% (07/26) animais foram positivos para o *Tripanossoma* spp. em observação direta em esfregaços sanguíneos e apresentavam alta parasitemia. Os outros animais apresentaram resultados negativos, durante um período entre 20 dias e oito meses após o início do surto. **A propriedade do segundo surto**, dos dois animais internados na CBG, um foi positivo para o *Tripanossoma* spp. em esfregaço sanguíneo em alta parasitemia. Oito meses após o início do surto, 11 animais foram avaliados e 9,09% (1/11) animal foi positivo no esfregaço sanguíneo, entretanto sem demonstrar sintomatologia. **Propriedade do terceiro surto**, dos 11 animais avaliados clinicamente, 18,18% (2/11) foram positivos para o *T. vivax* no esfregaço sanguíneo em alta parasitemia.

Em todas as propriedades estudadas, a ocorrência de *Anaplasma marginale* foi observada no esfregaço sanguíneo em baixa parasitemia. Do total de amostras analisadas, 13,76% (15/109) tinham infecção concomitante com *Anaplasma marginale*. Na avaliação do hematócrito, proteína plasmática e fibrinogênio, das 72 amostras correspondentes às três propriedades, observou-se que o hematócrito, teve valor médio de 22% (10% a 37%). A proteína plasmática teve valor médio de 7,55 g/dl (5,4g/dl a 10,0g/dl), sendo que 22,23%

300 (16/72) apresentaram hipoproteïnemia. Em relação ao fibrinogênio plasmático o valor médio obtido foi de 700mg/dl (200mg/dl a 1600mg/dl), sendo que 50% (36/72)
 301 apresentaram hiperfibrinogenia. Com relação aos 13 animais clinicamente doentes (Tabela 1.), 69,23% (9/13) apresentaram anemia normocítica normocrômica e
 302 53,84% (7/13) apresentaram leucocitose, em 46,15% (6/13) por neutrofilia e desvio a esquerda regenerativo.
 303

Tabela 1. Hemogramas de bovinos (n =13) naturalmente acometidos por *Trypanosoma vivax*.

Valores Hematológicos	Referência *	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3	Vaca 4	Vaca 5	Vaca 6	Vaca 7	Vaca 8	Vaca 9	Vaca 10	Vaca 11	Vaca 12	Vaca 13
Hematócrito (%)	24-46	23	15	28	15	24	29	20	19	22	29	29	22	22
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	5,0-10,0	8	4,77	9,33	5,18	9	10,07	7,13	6,49	7,39	9,88	10,03	4,06	3,85
Hemoglobina (g/dL)	8,0-15,0	4,55	2,5	5,88	2,68	4,62	7,16	3,89	3,74	5,16	5,98	6,87	8,59	7,53
VCM (fL)	40,0-60,0	50,54	60	47,61	55,97	51,94	40,5	51,41	50,8	42,63	48,49	42,21	54,18	57,14
CHCM (%)	30,0-36,0	34,78	31,8	33,32	34,53	37,5	34,72	35,65	34,15	33,54	34,1	34,58	39,04	34,22
PPT (g/dL)	7,0-8,5	7	6,3	6,4	6,8	8,8	5,1	8,2	6,9	5,1	9,4	5,6	8,7	7
Fp (mg/dL)	300-700	800	400	500	600	800	700	100	600	500	1500	600	600	600
Leucócitos (/μL)	4000-12000	13650	10100	7500	12050	6800	10800	11950	13250	21250	29800	16450	19450	11850
Monócitos (/μL)	25-840	2184	0	150	723	204	2016	1075	265	2213	0	164	389	0
Linfócitos (/μL)	2500-7500	7235	5858	3525	6748	4848	5124	8724	6493	7650	13112	9377	10697	1777
Eosinófilo (/μL)	0-2400	0	0	0	121	0	0	120	0	425	0	0	0	0
Neutrófilos (/μL)	600-4000	2184	4141	3750	4338	1768	5076	2031	4903	10838	14602	4606	5252	9599
Bastonetes (/μL)	0-200	2048	101	75	121	0	324	0	1590	2125	2086	2303	3112	474

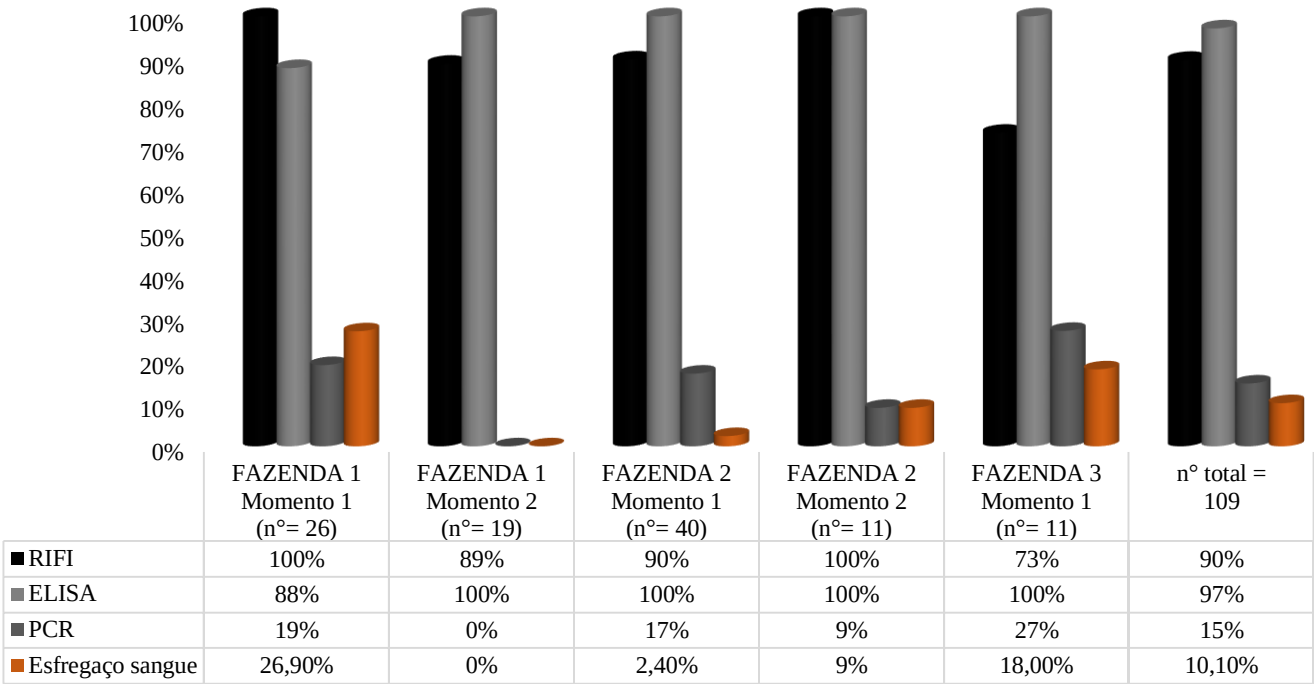
*Referência valores (Jain, 1993).

305
306
307
308
309
310
311

Diagnóstico Parasitológico, Sorológico e Molecular

Das 109 amostras colhidas para exames laboratoriais, em dois momentos com intervalo de oito meses, 97,2% (106/109) foram positivas no ELISA, 90% (98/109) foram positivas para RIFI, 15% (16/109) positivas para PCR e 10,1% (11/109) foram evidenciadas presença do *Tripanosoma* sp. no esfregaço sanguíneo (Figura.1).

Figura 1. Diagnóstico parasitológico, sorológico e molecular da tripanossomose nas três propriedades leiteiras.



Fazenda 1. Bom Conselho /PE. Momento 1 início do surto e momenento 2 após oito meses.
Fazenda 2. Pedra/ PE. Momento 1 início do surto e momenento 2 após oito meses.
Fazenda 3. Arapiraca / AL. Momento 1 início do surto.

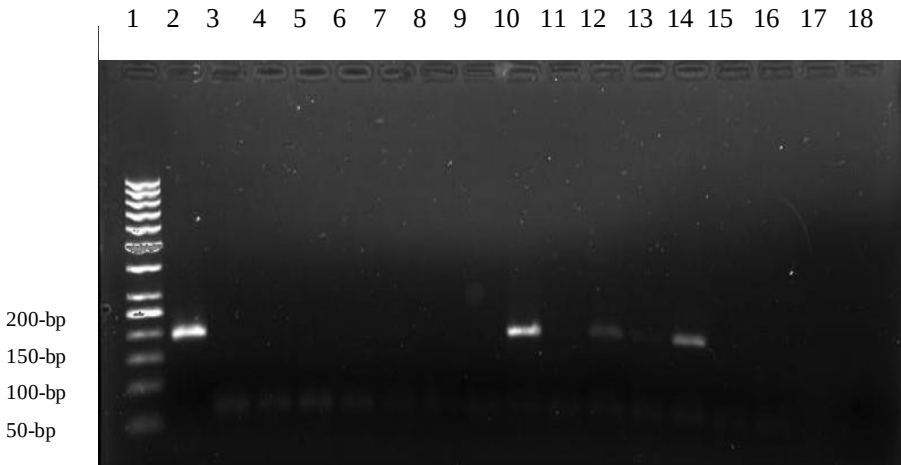


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 2%. Os amplimeros mostrados na foto correspondem a; (1) marcador de peso molecular em escala de 50 pares de bases (Invitrogen®); (2) controle positivo; (3) controle Negativo; (4-9,11,15-18) amostras negativas; (10, 12-14) amostras positivas.

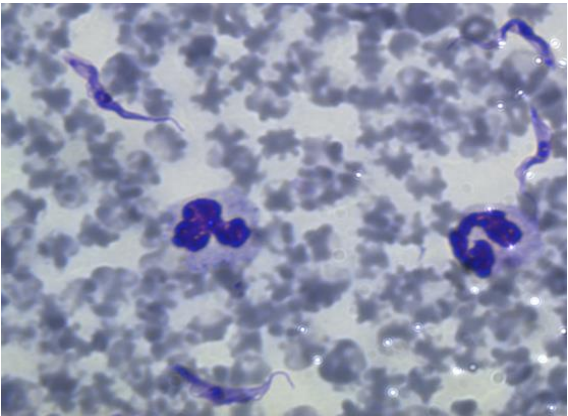


Figura. 3. *T. vivax*, oito meses após surto na propriedade 2.

Sequenciamento e análise da sequência

O sequenciamento das regiões intergênica do gene cathepsin L-like das duas amostras analisadas aqui neste estudo obteve-se um produto de 177 nucleotídeos (nt), que quando submetida a pesquisa de homologia em banco de dados de sequências nucleotídicas não redundantes (nr) do NCBI usando programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), demonstraram 100% de identidade com amostra de *T. vivax*, com o mesmo nº de acesso no GenBank: [EU753801.1](#).

DISCUSSÃO:

Os achados clínicos mais observados como apatia, anorexia, emagrecimento, diarreia, linfadenopatia, mucosas pálidas e febre, condiz com os observados na literatura (CARVALHO, *et al* 2008; CADIOLI *et al*, 2012). A sintomatologia nervosa e abortos também foram descritas (BATISTA *et al*, 2007; CUGLOVICI *et al.*, 2010).

As condições clínicas, com certa gravidade, apresentadas pelos animais em decorrência da infecção natural pelo *T. vivax* justifica-se pelo fato que a susceptibilidade dos animais a esse patógeno está associada a vários fatores como: idade, estresse nutricional ou má alimentação, competição por alimentos, fatores climáticos, infecções intercorrentes, prenhez, lactação, ressaltando a importância da nutrição como fator mais importante (MADRUGA *et al*, 2004). O que se constatou nesse estudo, foi a influência da seca e a escassez de alimentos no período dos surtos associado a condição dos animais acometidos estarem em lactação o que favoreceu a uma baixa resposta imunológica frente a infecção pelo *T. vivax*, contribuindo para intensidade dos sintomas.

A ocorrência dos surtos nas três propriedades analisadas foi comparativamente similar: apenas os rebanhos em lactação estavam adoecendo, havia entrada de animais recentes nas propriedades sem uso de quarentena, o período climático seco com pouca oferta de alimentos e o uso de ocitocina com compartilhamento de agulhas de forma constante em todas as ordenhas contribuiu de forma decisiva para disseminação da *T. vivax* após entrada de animais portadores nos rebanhos em lactação provenientes de regiões endêmicas. A via iatrogênica através do uso compartilhado de agulhas foi incriminada por Cadioli *et al.* (2012) como possível via de transmissão de *T. vivax*.

Na literatura, vários autores associam a infecção do *T. vivax* com o período chuvoso e o aumento dos vetores tabanídeos nessa época (BATISTA *et al.*, 2007, BATISTA *et al.*, 2009; CUGLOVICI *et al*, 2010), o que nas regiões dos surtos aqui descritos os índices pluviométricos estavam muito abaixo das médias observadas. Em contrapartida, a correlação positiva entre a presença de *Stomox calcitrans* e temperaturas acima de 20° C observadas por Rodriguez-Batista

(2005) confere com as temperaturas médias observadas nas regiões surtos deste presente estudo. Entretanto, nas visitas realizadas nas propriedades, não foram observados a presença de *Stomoxys calcitrans*, *Hematobia irritans* e Tabanídeos incriminados como os possíveis vetores do *T. vivax*, e a restrição da doença às vacas em lactação associada às condições de seca e altas temperaturas no período em que os surtos ocorreram o que não favorece a sobrevivência desses vetores (CUGLOVICI et al, 2010; CADIOLI et al, 2012), são fatores que incriminam com principal meio de transmissão o compartilhamento de agulhas de ocitocina, o que se comprovou nesse estudo.

Outro fator a ser considerado foi o comércio de animais que foram tratados com diaceturato de diminazene, diagnosticados nas propriedades do presente estudo, o que torna essa doença de difícil controle, uma vez que a possibilidade de resistência medicamentosa e o desenvolvimento de animais portadores assintomáticos são os responsáveis pela manutenção do parasita no rebanho, tendo em vista que, flutuações na parasitemia ou até intervalos aparasitemicos podem ocorrer e estão relacionados com a resposta imunológica do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2010).

A anemia foi o principal achado encontrado no hemograma de animais doentes, assim como observados por (BATISTA et al., 2007; CADIOLI, et al., 2012, FIDELES JUNIOR, 2014). Em infecções causadas pelo *T. vivax* a anemia está atribuída a fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro. Entretanto, mecanismos imunomediados por deposição de complexos imunes na superfície das hemácias e produção de transialidases e neuraminidases pelo *T. vivax* que clivam o ácido siálico da superfície das hemácias, resultando assim em aumento da fagocitocitose e hemólise extravascular são os principais fatores responsáveis pela anemia hemolítica (CONNOR, et al., 2004; GUEGAN, et al., 2013).

Com relação aos resultados do hematócrito foram também relatados por Batista et al (2008), no estado da Paraíba, que no hemograma de 36 animais, 17 apresentaram o hematócrito que variou de 15-22%. Linhares et al. (2006) em animais positivos no esfregaço sanguíneo, o hematócrito variou de 15-20%, já Cuglovici et al., (2010) observaram uma variação de 11 a 38%, com uma grande proporção de animais positivos apresentando valores inferiores a 24%. Entretanto, esses achados contradizem com os relatados por Moura et al., (2009) os quais não encontraram alterações nos valores hematológicos em bovinos naturalmente infectados por *T. vivax*.

Os achados para a proteína plasmática deste estudo, não condizem com os achados relatados por Sekoni et al. (1990), que observaram um discreto decréscimo nos valores das proteínas plasmáticas totais de touros infectados experimentalmente com *T. vivax*, obtendo valores mínimos na segunda semana pós-infecção. Diminuição das proteínas totais séricas também foram constatadas por Schenk et al. (2001), em infecção experimental em bezerros, especialmente nos primeiros dias pós infecção e um aumento das globulinas após a segunda semana pós infecção, atribuindo-se provavelmente a estimulação antigênica desencadeada pelo

próprio parasita. Assim como Silva et al. (2009) e Fidelis júnior (2014), que verificaram hipoalbuminemia e hiperglobulinemia em bovinos infectados naturalmente pelo parasita.

Quanto ao fibrinogênio plasmático em que 50% dos animais apresentaram hiperfibrinogenemia, se assemelham ao encontrado por Cardioli, et al. (2012). Porém, em infecção experimental em bovinos, Paiva et al. (2000) não encontrou alterações nos níveis médios de fibrinogênio até 42º dia, entretanto a partir desta, ocorreu uma redução, possivelmente relacionado ao fato da capacidade do agente de promover coagulação intravascular.

Em relação a avaliação do leucograma, dos animais clinicamente doentes, em que apresentaram leucocitose com linfocitose por neutrofilia e desvio a esquerda regenerativo, se assemelham aos resultados encontrados por Moura et al. (2009), que constatou, além destes, uma linfocitose e eosinofilia. Entretanto, Cadioli et al., (2012) relataram inicialmente uma leucopenia e posteriormente leucocitose. Estas respostas leucocitárias não consistentes nas infecções por *T.vivax*, dependem provavelmente do período em que a infecção se encontra, podendo estar normal, aumentada ou diminuída (HERRERA et al, 2004).

Apesar do esfregaço sanguíneo ser uma técnica de baixa sensibilidade, neste estudo demonstrou ser uma importante ferramenta de diagnóstico quando realizada na fase parasitemica, com intuito de monitorar a parasitemia do rebanho, uma vez que durante a infecção ocorrem flutuações da mesma, tornando difícil o encontro de parasitos em esfregaços sanguíneos (MADRUGA et al, 2006). Todavia, os animais doentes das propriedades, em que ocorreram os surtos, estavam sendo previamente medicados com diaceturato de diminazene na dose de 3,5mg/kg, mesmo assim foi possível diagnosticar animais positivos no início do surto, e oito meses após, com essa técnica, o que se pode inferir uma possibilidade de resistência ao medicamento, fato este também relatado por Cadioli et al (2012).

Em decorrência da baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos tradicionais e a dificuldade de diagnóstico em animais com baixa parasitemia (REBESKI et al.,1999) a detecção de anticorpos antitripanosoma, como constatado nos animais em estudo, no soro forneceu informações exatas da situação da tripanossomose nos rebanhos, além disso, verificou-se a persistência dos anticorpos por vários meses, mesmo após o tratamento curativo dos animais (MATTIOLI et al., 2001; DELAFOSSE et al., 2006).

No presente estudo o ELISA foi capaz de detectar mais amostras positivas em relação ao RIFI, o mesmo foi encontrado por Sampaio, (2013). Todavia, ambos os testes sorológicos apresentaram alta sensibilidade e especificidade (MADRUGA et al., 2006; CUGLOVICI, et al., 2010), com percentuais baixos de reação cruzada em relação ao *T. evansi*, *B. bovis* e *A. marginale*. Desta forma, recomendando-se a utilização destes em estudos epidemiológicos (PLATT E ADAMS,1976; MADRUGA, et al. 2006).

O PCR apresentou uma maior sensibilidade do que os testes parasitológicos no presente estudo. Entretanto, durante a fase aguda da infecção os métodos moleculares apresentam a mesma

sensibilidade do que os métodos parasitológicos (DESQUENES, et al 1997). Cuglovici et al (2010) comparando o PCR ao teste parasitológico de Woo, observou maior sensibilidade do PCR. Embora animais positivos no teste de Woo e Negativos em PCR também foram observados. Diante disto, percebe-se que o PCR pode apresentar falso resultado negativo, mesmo aumentando a quantidade de DNA na reação. Conclusões como esta também foram descritas por Gonzáles et al., (2003) e Gonzáles et al. (2007). Desquenes e Dávila (2002) afirmaram que uma concentração sanguínea de tripanossoma abaixo de um parasita por litro de sangue (0,000001 tripanossoma/ μ l sangue) são responsáveis pelo resultado falso negativo do PCR. Por conseguinte, existem ainda os fatores de inibição da PCR que podem estar presentes nas amostras, como hemoglobina, EDTA ou mesmo DNAases, causando a destruição do DNA e da sequência específica investigada, segundo Cuglovici et al., (2010).

O sequenciamento das amostras do presente estudo caracterizou 100% de identidade para o *T. vivax* sendo responsável pelos surtos, comparado as amostras inseridas no Genbank, tendo número de acesso: EU753801.1. As populações brasileiras de *Tripanossoma* spp são geneticamente homogêneas, embora possam desencadear diferentes achados clínicos, o que caracteriza que isolados de *T. vivax* semelhantes podem variar quanto a patogenicidade e a letalidade (CORTEZ et al, 2006).

CONCLUSÃO:

As condições que desencadearam a enfermidade nas três propriedades deste estudo possuem pontos comuns, que representaram alto risco, como a entrada de animais comprados de outras localidades antes dos surtos, a restrição da doença ao rebanho de lactação e principalmente o compartilhamento de agulhas e seringas sujas de sangue entre os animais.

A transmissão, ocorreu durante o compartilhamento de agulhas contaminadas por sangue entre as vacas da lactação, durante a aplicação de ocitocina, após a entrada de animais portadores assintomáticos na ordenha. Os testes sorológicos se mostraram eficientes, entretanto, o PCR revelou uma baixa sensibilidade em virtude dos animais já estarem sendo medicados com drogas tripanocidas ou em baixa parasitemia assim como o esfregaço sanguíneo. A tripanossomose é uma doença que deve ser considerada na bovinocultura nas regiões estudadas como causadora dos surtos e de provocar elevadas perdas econômicas ao rebanho, desencadeando alta mortalidade de animais e perdas expressivas na produção de leite devido ao manejo inadequado do rebanho. Medidas higiênicas e de segurança devem ser adotadas durante a administração de ocitocina nas vacas em lactação, sendo esta prática, quando realizada de forma errada e sem critérios higiênicos e com compartilhamento de agulhas, o principal fator de risco na transmissão da tripanossomose em rebanhos leiteiros em regiões onde a doença é prevalente, aumentando o desafio de reinfecções entre os animais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; TEBALDI, J. H.; ALESSI, A. C.; MACHADO R. Z.; NASCIMENTO, A. A. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 669-676, 2010.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AQUINO, L. P. C. T.; MACHADO, R. Z.; ALESSI, A. C. MARQUES, L. C.; CASTRO, M. B.; MALHEIROS, E. B. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 255-260, 1999.
- BATISTA J. S., BEZERRA F.S.B., LIRA R.A., CARVALHO J.R.G., ROSADO NETO A.M., PETRI A.A & TEIXEIRA M.M.G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa. Veterinária Brasileira**, 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., PAIVA E.S., BRITO P.D., MEDEIROS J.M.F., RODRIGUES A.C., 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, p.131-135, 2009.
- BATISTA J.S., RIETE-CORREA F., TEIXEIRA M.M.G., MADRUGA C.R., SIMÕES S.V.D & MAIA 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, p.174-181, 2007.
- BATISTA J.S., RODRIGUES C.M., OLINDA R.G., SILVA T.M VALE R.G., CÂMARA A.C., REBOUÇAS R.E., BEZERRA F.S., GARCIA H.A., TEIXEIRA M.M. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 73-80, 2012.
- BOULHOSA J. **Informação Científica, Boletim Técnico Ministério da Agricultura**, p.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. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, p.118-124, 2012.
- CARVALHO, A.U.; ABRÃO, D.C.; FACURY FILHO, E.J.; PAES, P.R.O.; RIBEIRO, M.F.B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro. Medicina. Veterinária e Zootecnia**, v. 60, 2008.
- CONNOR, R.J.; VAN DEN BOOSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Eds.). Infectious diseases of livestock. 2nd ed. South Africa: **Oxford University Press**. v.1, p.251-296, 2004.
- CORTEZ A.P., RODRIGUES A.C., GARCIA H.A., NEVES L., BATISTA J.S., BENGALY Z., PAIVA F., TEIXEIRA M.M.G. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and

- 510 South America – characterization, relationships and diagnostic implications. **Molecular and**
511 **Cellular Probes**, v.23, n. 1, p. 44-51, 2009.
- 512 CORTEZ A.P., VENTURA R.M., RODRIGUES A.C., BATISTA J.S., PAIVA F., AÑES N.,
513 MACHADO R.Z., GIBSON W.C & TYEIXEIRA M.M.G. The taxonomic and phylogenetic
514 relationships of *Trypanosoma vivax* from South América and África. **Veterinary Parasitology**,
515 v.133, p.159-169, 2006.
- 516 CORTEZ, A. P.; RODRIGUES, A. C.; GARCIA, A. H.; NEVES, L.; BATISTA, J. S.;
517 BENGALY, Z.; PAIVA, F.; TEIXEIRA, M. M. G. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax*
518 from Africa and south America – characterization, relationships and diagnostic implications.
519 **Molecular and Cellular Probes**, v. 23, p. 44-51, 2009.
- 520 CUGLOVICI D.A., BARTHOLOMEU D.C., REIS-CUNHA J.L., CARVALHO A.U., RIBEIRO
521 M.F. Epidemiologic aspectos of na outbreak of tripanosoma vivax in a dairy cattle herd in Minas
522 Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.3-4, p.320-326, 2010.
- 523
524 DA SILVA, A.S.; OLIVAEIRA, B.C.; ZANETTE, A. R.; SOARES, C.D.M.; CORADINI, G.;
525 POLENS, C.H.; SANTURIO, J.M & MONTEIRO, S.G. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em
526 bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira, Santa Catarina. **Acta Scientiae**
527 **Veterinariae**, v.35, p.373-376, 2007.
- 528 DELAFOSSE, A.; THE´BAUD, E.; DESQUESNES, M.; MICHAUX, Y. Epidemiology of
529 *Trypanosoma vivax* infection in cattle in the tse-tse free area of Lake Chad. **Preventive.**
530 **Veterinary medicine**, v. 74, p. 108–119, 2006.
- 531 DESQUESNES, M.; DÁVILA, A.M.R. Applications of PCR-based tools for detection and
532 identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, v.
533 109, p. 213–231, 2002.
- 534 DIRKSEN, G., GRÜNDER H-D., STÖBER M.. **Rosenberger: Exame clínico dos bovinos**. 3ª
535 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1993. 419p.
- 536 FIDELIS JUNIOR, O. L. Patogenicidade do isolado “Lins” de *Tripanossoma vivax* em bovinos
537 natural e experimentalmente infectados. 2014. 82 f. **Dissertação** (mestrado em Medicina
538 Veterinária) - Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio
539 de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2014.
- 540 GONZALES J.L, CHAGON E, MIRANDA M, LOSA A, SILES L.M. Bovine trypanosomosis
541 in the Bolivian Pantanal. **Veterinary Parasitology**, V 146: 9-16, 2007.
- 542
543 GONZALES, J.L., JONES, T.W., PICOZZY, K., CUELLAR, R.H. Evaluation of a polymerase
544 chain reaction assay for the diagnosis of bovine tripanosomiasis and epidemiological surveillance
545 in Bolivia. **Kinetoplastid Biology Disease**, v. 2, n. 8, 2003.
- 546 GONZÁLES, L. F.; GARCÍA, J. A.; NÚÑEZ, C.; PERRONE, T. M.; GONZÁLEZ-BARADAT,
547 B.; GONZATTI, M. I.; REYNA-BELLO, A. *Trypanosoma vivax*: a novel method for
548 purification from experimentally infected sheep blood. **Experimental Parasitology**, San Diego,
549 v. 111, n. 2, p. 126-129, 2005.
- 550 GUEGAN, F., N. PLAZOLLES, T. BALTZ & V. COUSTOU. Erythrophagocytosis of
551 desialylated red blood cells is responsible for anaemia during *Trypanosoma vivax* infection.
552 **Cellular Microbiology**, 15, 1285-303. 2013.
- 553 GUERRA N.R., MONTEIRO M.F.M., SANDES H.M.M., CRUZ N.L.N., RAMOS C.A.N.,
554 SANTANA V.L.A., SOUZA M.M.A. & ALVES L.C. Detecção de anticorpos IgG anti-

- 555 *Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de Imunofluorescência indireta. **Pesquisa**
556 **Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1423-1426, 2013.
- 557 GUERRA R.M.S., FEITOSA-JUNIOR A.B., SANTOS H.P., SILVA A.L.A., SANTOS C.G.
558 Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**,
559 v.38, p.833-835, 2008.
- 560 HERRERA, H.M.; DÁVILA, A.M.R.; NOREK, A.; ABREU, U.G.; SOUZA, S.S.; D'ANDREA,
561 P.S.; JANSEN, A.M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary**
562 **Parasitology**, v.125, p.263-275, 2004.
- 563 JAIN, N. C. 1993. **Essentials of Veterinary Hematology**. Lea & Febiger. Philadelphia.
- 564 LINHARES G.F.C., DIAS FILHO F.D., FERNANDES P.R. & DUARTE S.C. Tripanossomíase
565 em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins: relato de caso. **Ciência Animal.**
566 **Brasileira**, v.7, p.455-460, 2006.
- 567
568 MADRUGA C.R., ARAÚJO F.R., CARVALCANTE-GOES G., MARTINS C., PFEIFER I.B.,
569 RIBEIRO L.R., KESSLER R.H., SOARES C.O., MIGUITA M., MELO E.P.S., ALMEIDA
570 R.F.C., LIMA JR M.S.C. The desenvolvimento of na enzymelinked immunosorbent assay for
571 *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memórias Instituto**
572 **Oswaldo Cruz**, v.101, p. 801-807, 2006.
- 573 MADRUGA, C. R. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanosoma (Duttonella) vivax* no Brasil.
574 **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 46-47, 2004.
- 575
576 MASCARENHAS, C.J.; BELTRÃO, A. B.; SOUZA JUNIOR, L.C.; GALVÃO, G.M.J;
577 PEREIRA, N.S.T; MIRANDA, F.L.J. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água
578 subterrânea. Diagnóstico dos municípios. Serviço Geológico do Brasil e Programa de
579 Desenvolvimento Energético dos Estados e Municípios, Recife, 2005.
- 580
581 MATTIOLI, R.C.; FAYE, J.A.; JAITNER, J. Estimation of trypanosomal status by the buffy coat
582 technique and an antibody ELISA for assessment of the impact of trypanosomosis on health and
583 productivity of N'Dama cattle in The Gambia. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 25-35, 2001.
- 584 MOURA, D. M. de; PANETO, J. C. do C.; BITTAR, E. R.; BITTAR, J. F. F. Perfil bioquímico
585 de bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**, p.
586 642-647, Suplemento 1, anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. 2009.
- 587 OLIVEIRA, J. B.; HERNANDEZ-GAMBOA, J.; JIMENEZ-ALFARO, C.; ZELEDON,R.;
588 BLANDON, M.; URBINA, A. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from
589 Costa Rica. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 136-139, 2009.
- 590 PAIVA F., LEMOS R.A.A., NAKASATO L., MORI A.E., BRUM K.B., BERNADO K.C.
591 Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. I-
592 Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista**
593 **Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, p.135-141, 2000.
- 594
595 PIMENTEL A D.S., RAMOSA C.A.N., RAMOSA R.A.N., ARAÚJO F.R., BORBAC M.L.,
596 FAUSTINO M.A.G., ALVES L.C. First report and molecular characterization of *Trypanosoma*
597 *vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v.185, p.286-289,
598 2012.
- 599 RODRÍGUEZ-BATISTA Z., LEITE R.C., OLIVEIRA P.R., LOPES C.M.L. & BORGES L.M.F.
600 Populational dynamics of *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae) in three biocenosis, Minas
601 Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 130: p. 343-346. 2005.

- 602 SCHENK, M. A. M.; MENDONÇA, C. L.; MADRUGA, C. R.; KOHAYAGAWA, A.;
 603 ARAÚJO, F. R. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos nelore infectados experimentalmente
 604 com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 157-163, 2001.
- 605 SEKONI, V. O.; SAROR, D. I.; NJOKU, C. O.; KUMI-DIAKA, J.; OPALUWA, G. I.
 606 Comparative hematological changes following *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense*
 607 infection in Zebu bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 35, n. 1-2, p. 11-20, 1990.
- 608 SHAW, J.J, LAINSON R. *Trypanosoma vivax* in Brasil. **Annual Tropical Medicine**
 609 **Parasitology**, v.66, p. 25-32, 1972.
 610
- 611 SILVA A.S., COSTA M.M., POLENZ F.M., POLENZ H.C., TEIXEIRA G.M.M., LOPES
 612 A.T.S., MONTEIRO G.S. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio
 613 Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.39, p.2550-2554, 2009.
 614
- 615 SUÁREZ C., GARCÍA F., ROMÁN D., CORONADO A., PERRONE T., REYNA A. & PARRA
 616 N. Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de
 617 Venezuela. **Zootecnia Tropical**, v.27, p.363-372, 2009.
 618
- 619 WOO P.T.K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis.
 620 **Acta Tropical Veterinary**, v.27, p.384-386, 1970.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É necessário o conhecimento clínico epidemiológico da tripanossomose assim como os fatores de risco e vetores nas regiões onde o parasito já foi diagnosticado, inclusive para avaliar o impacto econômico desta doença sobre a produção pecuária. Os produtores devem ser orientados sobre as boas práticas de manejo dos animais e o sistema de defesa animal oficial deve redobrar o rigor na vigilância sanitária, buscando impedir a introdução de agentes patogênicos emergentes.

Em vista disso, o estudo realizado sobre a tripanossomose em bovinos permite concluir que essa doença assume uma importância sanitária para o rebanho leiteiro do agreste do estado de Pernambuco e Alagoas, em vista dos casos ocorridos diagnosticados pela Clínica de Bovinos de Garanhuns, caracterizando os estados como área de instabilidade enzootica para a tripanossomose, com potencial para se tornar endêmica, uma vez que, a baixa adoção de medidas seguras em relação a manejo nas propriedades rurais, principalmente com relação à aplicação de medicamentos e à aquisição de animais com situação sanitária desconhecida podem colaborar como fatores de disseminação da tripanossomose nos estados

6. APÊNDICE

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E FATORES EPIDEMIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NOS SURTOS NAS PROPRIEDADES DO AGRESTE MERIDIONAL DO ESTADO DE PERNAMBUCO E ALAGOAS.



Figura 4. Animal apresentando diarreia, escore corporal grau II na propriedade do primeiro surto.



Figura 5. Rebanho acometido pelo *T. vivax* da propriedade do segundo surto.



Figura 6. Rebanho da propriedade do terceiro surto acometido por *T. vivax*.



Figura 7. Bovinos mortos na propriedade do primeiro surto.



Figura 8. Mucosa ocular pálida de bovino da propriedade do primeiro surto.



Figura 9. Agulhas e seringas contaminadas por sangue utilizadas nos animais em lactação na propriedade do segundo surto.

7. ANEXO: Instruções aos autores (Semina: Ciências Agrárias)

Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.

Os artigos poderão ser submetidos em português ou inglês, mas somente serão publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, após o aceite, deverão ser obrigatoriamente **traduzidos para o inglês**.

Os artigos enviados para a revista até dezembro/2013 que estão em tramitação poderão ser publicados em português, entretanto, se traduzidos para o inglês terão prioridade na publicação.

Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar) do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores:

American Journal Experts

Editage

Elsevier

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

<http://www.stta.com.br/>

O autor principal deverá anexar no sistema o **documento comprobatório** dessa correção na página de submissão em “**Docs. Sup.**”

OBSERVAÇÕES:

1) Os manuscritos originais submetidos à avaliação são inicialmente apreciados pelo Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias. Nessa análise, são avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como: escopo; adequação às normas da revista; qualidade da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; contribuição dos resultados; discussão dos dados observados; apresentação das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Se o número de trabalhos com manuscrito ultrapassar a capacidade de análise e de publicação da Semina: Ciências Agrárias, é feita uma comparação entre as submissões, e são encaminhados para assessoria Ad hoc, os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição para o avanço do conhecimento científico. Os trabalhos não aprovados nesses critérios são arquivados e os demais são submetidos a análise de pelo menos dois assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo, sem a identificação do(s) autor(es). Os autores cujos artigos forem arquivados, não terão direito à devolução da taxa de submissão.

2) Quando for o caso, deve ser informado que o projeto de pesquisa que originou o artigo foi executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética sob a aprovação da comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais (nome da Comissão, Instituição e nº do Processo).

NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

- a) O arquivo do artigo anexado do trabalho contenha os nomes dos autores e respectiva afiliação;
- b) Não tenha sido realizado o **cadastro completo** de todos os autores nos metadados de submissão; **Exemplo:** Nome completo; Instituição/Afiliação; País; Resumo da Biografia/Titulação/função
- c) Não tenha sido incluído no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR, um texto que aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já existentes), em até 10 linhas;
- d) Não estejam acompanhados de documento comprobatório da taxa de submissão, em documento suplementar **“Docs. _____ Supl.”** no ato da submissão;
- e) Não estejam acompanhados dos seguintes documentos suplementares: gráficos, figuras, fotos e outros, EM VERSÃO ORIGINAL. (Formato JPEG; TIFF; EXCEL)
- f) Não constem no artigo original: título, resumo e palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.

RESTRIÇÃO POR ÁREA:

PARA A ÁREA DE VETERINÁRIA

Categorias dos Trabalhos

- a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a categoria do trabalho.

Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem ser incluídas no final do trabalho, imediatamente após as referências bibliográficas, com suas respectivas chamadas no texto. Além disso, as figuras devem apresentar boa qualidade e deverão ser anexadas nos seus formatos originais (JPEG, TIF, etc) em “Docs Supl.” na página de submissão. Não serão aceitas figuras e tabelas fora das seguintes especificações: Figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões.

Observação: Para as tabelas e figuras em qualquer que seja a ilustração, o título deve figurar na parte superior da mesma, seguida de seu número de ordem de ocorrência em algarismo arábico, ponto e o respectivo título.

Indicar a fonte consultada abaixo da tabela ou figura (elemento obrigatório). Utilizar fonte menor (Times New Roman 10).

Citar a autoria da fonte somente quando as tabelas ou figuras não forem do autor.

Ex: **Fonte:** IBGE (2014), ou **Source:** IBGE (2014).

Preparação dos manuscritos

Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final da discussão ou Resultados; Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser destacados em negrito, sem numeração, quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas devem receber números arábicos. (Ex. **Material e Métodos...** *Áreas de estudo...1. Área rural...2. Área urbana*).

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, Nota Prévia ou Formato Reduzido.

A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

- 1. Título do trabalho**, acompanhado de sua tradução para o inglês.
- 2. Resumo e Palavras-chave:** Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).
- 3. Introdução:** Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.
- 4. Material e Métodos:** Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.
- 5. Resultados e Discussão:** Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vistas discutidos.
- 6. Conclusões:** Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.
- 7. Agradecimentos:** As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos:

- a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.
- b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.
- c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha^{-1} . Não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha .
- d) Utilizar um espaço simples entre as unidades, g L^{-1} , e não g.L^{-1} ou gL^{-1} .
- e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

8. Citações dos autores no texto

Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

- a) Os resultados de Dubey (2001) confirmaram que
- b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....
- c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....
- d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).
- e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

Citações com dois autores

Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem citados dentro dos parênteses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e)

Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2000).

Citações com mais de dois autores

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência.

Ex: (RUSSO et al., 2000) ou Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Para citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados no mesmo ano, utilizar o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem spacejamento.

Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor, publicados em anos diferentes, separar as datas por vírgula.

Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores, mencionados simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula.

Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

9. Referências: As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. **Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes.** A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

Observação: Consultar os últimos fascículos publicados para mais detalhes de como fazer as referências do artigo.