

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANDRÉIA AMARAL PINHO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE DESINFETANTES E
CONSERVANTES SOBRE A VIABILIDADE DE *Trypanosoma
vivax* (Ziemann, 1905) E VALIDAÇÃO DA REAÇÃO DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – RIFI COMO
MÉTODO DE DIAGNÓSTICO**

Belo Horizonte

2018

ANDRÉIA AMARAL PINHO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE DESINFETANTES E
CONSERVANTES SOBRE A VIABILIDADE DE *Trypanosoma
vivax* (Ziemann, 1905) E VALIDAÇÃO DA REAÇÃO DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – RIFI COMO
MÉTODO DE DIAGNÓSTICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

**Orientadora: Profa. Júlia Angélica Gonçalves da
Silveira**

Belo Horizonte

2018

AGRACEDIMENTOS

Agradeço a Deus por me trazido até aqui.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG pela oportunidade de participar deste seletivo grupo de alunos.

À Prof^a. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, minha orientadora, pela compreensão diante de minhas limitações e por todos os ensinamentos transmitidos.

À FAPEMIG e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG pelo auxílio financeiro.

A toda a equipe da Clínica de Ruminantes da Escola de Veterinária da UFMG, em especial aos professores Elias Jorge F. Filho, Antônio Ultimo de Carvalho e Rodrigo Melo Meneses e aos residentes, pelo apoio incondicional na realização deste trabalho.

Aos colaboradores da UNESP, Campus Jaboticabal, Prof^a. Rosângela Zacarias Machado e Prof. Marcos Rogério André, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage e à Prof^a. Elaine Maria Seles Dorneles pelo auxílio no delineamento experimental.

Aos estatísticos, Prof. Ivan Barbosa Sampaio e Diego Pujoni, pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos colegas do laboratório Protovet, em especial à Andreina; companheira nos momentos mais difíceis, sempre pronta a ajudar. Não tenho palavras para expressar o quanto sua ajuda, suas palavras de incentivo e sua amizade foram fundamentais.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária, em especial à minha coorientadora Luciana Faria de Oliveira, pelo apoio técnico no desenvolvimento do trabalho, e ao meu Coordenador Regional Deobaldino M. de Pinho, pela compreensão e pelos sábios conselhos. Aos demais colegas de trabalho; agradeço a compreensão de minha ausência nos últimos dois anos.

Aos meus pais, Raimundo e Silvana, por terem me fornecido os princípios que me fizeram o que sou hoje. Serei eternamente grata.

À minhas irmãs Luciana, Valéria e Fernanda; e também às irmãs de coração, Cristina e Sabrina, pelo apoio e compreensão de minha ausência neste período.

Ao João Henrique por ter estado ao meu lado durante esta caminhada; por ter sido meu despertador, nos momentos em que era difícil acordar e por ter me cedido o ombro quando eu precisava desabafar.

RESUMO

Trypanosoma vivax é um protozoário que causa graves prejuízos econômicos em bovinos. Originário da África, onde é transmitido pela mosca tsé-tsé, seu vetor biológico, o parasito adaptou-se à transmissão mecânica e espalhou-se por locais onde seu vetor não está presente, chegando até as Américas. No Brasil, relatos de graves surtos de *T. vivax* têm ocorrido em várias regiões, estando, em alguns casos, relacionados à transmissão iatrogênica, sobretudo em rebanhos leiteiros que fazem uso rotineiro de ocitocina intravenosa. Entre os métodos de diagnóstico diretos, a técnica de Woo se destaca; entretanto, sua realização requer o rápido processamento do sangue. Entre os métodos indiretos, merecem destaque no país o ELISA e a RIFI. Devido à importância econômica da tripanossomose bovina causada por *T. vivax*, este estudo objetivou avaliar a ação de conservantes com a finalidade de prolongar o tempo de realização da técnica de Woo; a ação de desinfetantes na viabilidade de *T. vivax* em seringas e agulhas; a viabilidade do parasito em soluções de ocitocina e validar a RIFI como método de diagnóstico. Os conservantes analisados foram Prolina, Prolina+Glicose, Glicose e PSG. A associação de Prolina+Glicose foi o conservante mais eficiente, entretanto, seu elevado custo, em relação ao benefício, não incentiva sua utilização. A adição de solução de ocitocina a amostras de sangue contaminado por *T. vivax* nas proporções 1:1 e 1:200, exerceu ação negativa na viabilidade do parasito, entretanto, permitiu sua sobrevivência por até 30 minutos (1:1), sendo, portanto, um veículo apto a transmitir o parasito. Foi avaliada a ação de hipoclorito de sódio (0,5%), álcool (54°GL) e cloreto de alquil dimetil benzil amônio (0,15%) na desinfecção de agulhas e seringas contaminadas, através de dois processos: aspirando-se/desprezando-se o desinfetante ou apenas imergindo-se a seringa/agulha na solução desinfetante por 30 minutos. Pelo primeiro processo todos os desinfetantes avaliados foram eficientes na eliminação de *T. vivax*. Pelo processo de imersão, entretanto, nenhum dos desinfetantes foi capaz de eliminar completamente o parasito, apesar de reduzirem sua viabilidade. No processo de validação, a técnica de RIFI foi otimizada, para definição do protocolo mais adequado. Sua repetibilidade e reprodutibilidade foram avaliadas e consideradas elevadas; a sensibilidade analítica foi baixa em relação ao ELISA, entretanto a especificidade analítica foi total, não havendo reações cruzada com outros hematozoários avaliados. Quanto às características diagnósticas, a técnica obteve 82,9% de sensibilidade e 100% especificidade; sendo adequada à realização de estudos epidemiológicos de *T. vivax*.

Palavras-chave: Tripanossomose. Ocitocina. Bovino. Diagnóstico. Transmissão.

ABSTRACT

Trypanosoma vivax is a protozoan that causes severe economic damage in cattle. Originating in Africa, where it is transmitted by the tsetse fly, its biological vector, the parasite has adapted to the mechanical transmission and has spread to places where its vector is not present, reaching the Americas. In Brazil, reports of severe outbreaks of *T. vivax* have occurred in several regions, and in some cases are related to iatrogenic transmission, especially in dairy herds that routinely use intravenous oxytocin. Among the direct diagnostic methods, the Woo technique stands out; however, its accomplishment requires rapid processing of blood. Among the indirect methods, the ELISA and the IFAT are worth highlighting. Due to the economic importance of bovine trypanosomiasis caused by *T. vivax*, this study aimed to evaluate the action of preservatives as a way to prolong the time of the Woo method; the action of disinfectants on the viability of *T. vivax* in syringes and needles; the viability of the parasite in oxytocin solutions and to validate IFAT as a diagnostic method. The preservatives analyzed were Proline, Proline+Glucose, Glucose and PSG. The combination of Proline+Glucose was the most efficient preservative, however, its high cost in relation to the benefit verified, does not encourage its use. The addition of oxytocin solution to samples of *T. vivax*-contaminated blood in 1:1 and 1:200 ratios exerted a negative effect on the viability of the parasite. However, it allowed survival for up to 30 minutes (1:1) therefore, a vehicle capable of transmitting the parasite. The action of sodium hypochlorite (0.5%), alcohol (54°GL) and alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (0.15%) was evaluated in the disinfection of contaminated needles and syringes, through two processes: aspirating/despising the disinfectant or just immersing the syringe/needle in the disinfectant solution for 30 minutes. By the first process all the disinfectants evaluated were efficient in the elimination of *T. vivax*. Through the immersion process, however, none of the disinfectants was able to completely eliminate the parasite, even though they reduced its viability. In the validation process, the IFAT technique was optimized, to define the most adequate protocol. Its repeatability and reproducibility were evaluated and considered high; the analytical sensitivity was low in relation to the ELISA, however the analytical specificity was total, and there were no cross reactions with other hematozoan evaluated. Regarding the diagnostic characteristics, the technique obtained 82.9% sensitivity and 100% specificity; being adequate for the accomplishment of epidemiological studies of *T. vivax* infection.

Keywords: Trypanosomiasis. Oxytocin. Bovine. Diagnosis. Transmission.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema do experimento para avaliação da adição de conservantes a amostras de sangue fresco com a finalidade de prolongar a viabilidade de *T. vivax* 30
- Figura 2:** Esquema do experimento para avaliação da viabilidade de *T. vivax* em seringas e agulhas submetidas à desinfecção pela técnica de “aspirar e desprezar” o desinfetante..... 31
- Figura 3:** Esquema do experimento para avaliação da viabilidade de *T. vivax* em seringas e agulhas submetidas à desinfecção pela técnica de imersão por 30 minutos na solução desinfetante..... 32
- Figura 4:** Esquema do experimento para avaliação da viabilidade de *T. vivax* em soluções de diferentes concentrações de ocitocina..... 33
- Figura 5: A:** Valores médios de T50 (IC95%) para cada um dos cinco tratamentos (Controle (C), Glicose (G), Prolina (P), Prolina+Glicose (PG) e PSG) para as três diferentes parasitemias avaliadas. **B:** Curvas sigmóides da queda da viabilidade com o tempo e IC 95% do T50 para cada um dos cinco tratamentos..... 42
- Figura 6:** Curvas sigmóides da queda da viabilidade com o tempo e IC 95% do T50 para o grupo Controle..... 43
- Figura 7:** Média do número de tripanossomos vivos em 50 campos contados e seu respectivo intervalo de 95% de confiança para cada um dos quatro tratamentos para as duas técnicas avaliadas (nas colunas)..... 45
- Figura 8:** Média do número de indivíduos vivos em 25 campos contados e seu respectivo intervalo de 95% de confiança para cada um dos três tratamentos para os quatro períodos de tempos avaliados (nas colunas)..... 48
- Figura 9:** Curvas sigmóides da queda da positividade das amostras analisadas pelas técnicas de ELISA (linha preta) e RIFI (linha cinza) em função da diluição..... 52

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Primeiros registros de ocorrência de *Trypanosoma vivax* em estados brasileiros considerados não-endêmicos no período de 2002-2015..... 16
- Quadro 2** - Volume de solução conservante e/ou salina fisiológica acrescentado às amostras diluídas, contendo diferentes concentrações de *T. vivax*..... 29
- Quadro 3** – Volumes de soluções acrescentados às amostras contendo diferentes concentrações de *T. vivax* 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios de T50 (IC95%) para cada um dos cinco tratamentos e para as três diferentes parasitemias avaliadas..... 41

Tabela 2 – Índices Kappa calculados e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%), para resultados obtidos na RIFI de replicatas de amostras de referência de *T. vivax* (positivas e negativas)..... 51

Tabela 3 - Resultado da RIFI de *T. vivax* de amostras de referência positivas e negativas.... 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
DEAE-celulose	-	Dietilaminoetil celulose
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	-	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FN	-	Falso negativo
FP	-	Falso positivo
G	-	Força centrífuga relativa
G	-	Gauge
ICB	-	Instituto de Ciências Biológicas
IFN-γ	-	Interferon-gama
IgG	-	Imunoglobulina G
IgM	-	Imunoglobulina M
KCl	-	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	-	Fosfato monopotássico
LAMP	-	Amplificação Isotérmica Mediada por <i>Loop</i>
Log	-	Logaritmo
MG	-	Minas Gerais
μl	-	Microlitro
Min	-	Minuto
ml	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
Mm	-	Milímetro
Na₂HPO₄	-	Fosfato dissódico
NaCl	-	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	-	Fosfato monossódico
NK	-	<i>Natural killer</i>
NKT	-	<i>T-Natural killer</i>
°C	-	Graus Celsius
°GL	-	Graus Gay Lussac

OIE	-	Organização Internacional de Saúde Animal
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	-	Potencial de hidrogênio
ppm	-	Partes por milhão
PBS	-	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PSG	-	<i>Phosphate saline glucose</i>
RIFI	-	Reação de Imunofluorescência Indireta
T50	-	Tempo 50
TNF	-	Fator de Necrose Tumoral
UFMG	-	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	-	Unidades Internacionais
UNESP	-	Universidade do Estado de São Paulo
VG	-	Volume Globular
VP	-	Verdadeiro Positivo
VN	-	Verdadeiro Negativo
VSG	-	Glicoproteínas Variantes de Superfície

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 <i>Trypanosoma vivax</i>	14
2.1.1 Caracterização taxonômica	14
2.1.2 Ciclo e transmissão.....	14
2.1.3 Distribuição geográfica	15
2.1.4 Características clínicas e patológicas	17
2.1.5 Aspectos imunológicos	18
2.1.6 Prevenção e controle	19
2.2 Diagnóstico de <i>T. vivax</i>	21
2.3 Validação de testes de diagnóstico.....	24
3 JUSTIFICATIVA	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo geral.....	27
4.2 Objetivos específicos	27
4.2.1 Testes de viabilidade de <i>T. vivax</i>	27
4.2.2 Validação da RIFI para diagnóstico de <i>T. vivax</i>	27
5 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 Considerações éticas e infecção experimental	28
5.2 Testes de viabilidade de <i>T. vivax</i>	29
5.2.1 Avaliação da adição de conservantes	29
5.2.2 Avaliação da ação de desinfetantes na viabilidade de <i>T. vivax</i> em seringa/agulha..	30
5.2.3 Avaliação da viabilidade de <i>T. vivax</i> em soluções de ocitocina.....	32
5.2.4 Análises estatísticas dos testes de viabilidade.....	34

5.3 Validação da RIFI para diagnóstico de <i>T. vivax</i>	35
5.3.1 Obtenção do antígeno de <i>T. vivax</i> para realização da RIFI.....	35
5.3.2 Amostras de referência.....	36
5.3.3 Otimização do ensaio	37
5.3.4 Protocolo de RIFI.....	38
5.3.5 Repetibilidade.....	39
5.3.6 Sensibilidade analítica.....	39
5.3.7 Especificidade analítica.....	39
5.3.8 Sensibilidade e especificidade diagnósticas	40
5.3.9 Reprodutibilidade	40
5.3.10 Análises estatísticas de validação da RIFI	40
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1 Testes de viabilidade de <i>T. vivax</i>	41
6.1.1 Avaliação da adição de conservantes	41
6.1.2 Avaliação da ação de desinfetantes sobre a viabilidade de <i>T. vivax</i> em seringa/agulha.....	44
6.1.3 Avaliação da viabilidade de <i>T. vivax</i> em soluções de ocitocina.....	47
6.2 Validação da Reação de Imunofluorescência Indireta- RIFI para o diagnóstico de <i>T. vivax</i>: estabelecimento de parâmetros e características do ensaio.....	49
6.2.1 Definição da finalidade pretendida	49
6.2.2 Estudos de viabilidade e otimização	50
6.2.3 Repetibilidade e reprodutibilidade	50
6.2.4 Sensibilidade e especificidade analíticas.....	51
6.2.5 Sensibilidade e especificidade diagnósticas	53
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Trypanosoma (Duttonella) vivax (ZIEMANN, 1905) é um protozoário flagelado, que afeta ungulados silvestres e domésticos, altamente patogênico para bovinos e pequenos ruminantes (BATISTA et al., 2011; MELO et al., 2011). Do ponto de vista econômico, a doença é especialmente importante em bovinos (OIE, 2013). Os principais sinais clínicos da infecção crônica são anemia, febre, letargia, perda progressiva de peso, queda na fertilidade e na produção de leite e de carne, aborto, agalaxia e, eventualmente, morte (DELAFOSSÉ et al., 2006).

É originalmente um parasito heteroxênico, e seu vetor biológico são moscas conhecidas como moscas tsé-tsé (*Glossina* sp.) presentes no continente Africano (HOARE, 1957). Entretanto, *T. vivax* pode também ser transmitido de forma mecânica entre hospedeiros vertebrados, o que permitiu que o parasito se espalhasse para fora da África, e se estabelecesse nas Américas (JONES e DÁVILA, 2001; OSÓRIO et al., 2008).

Nas Américas Central e do Sul, *T. vivax* é considerado o principal agente de tripanossomose em rebanhos (GARCIA et al., 2016), representando uma importante restrição à produção pecuária (MORRISON et al., 2016). No Brasil, algumas regiões, como a planície Amazônica e Pantanal, são consideradas áreas endêmicas e com rara ocorrência de surtos (DESQUESNES, 2004; DÁVILA et al., 2003). Entretanto, nas duas últimas décadas, têm sido relatados surtos de tripanossomose causada por *T. vivax* nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste (BATISTA et al., 2007, 2009; CADIOLI et al., 2012; CUGLOVICI et al., 2010; DA SILVA et al., 2009; GALIZA et al., 2011; PIMENTEL et al., 2012), indicando que o parasito está se espalhando pelo Brasil.

Os surtos de tripanossomose em regiões não endêmicas se caracterizam por grave sintomatologia clínica, com elevada mortalidade (BATISTA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013). Perdas econômicas expressivas ocorrem devido à infecção por *T. vivax*, estando relacionadas à mortalidade, aumento do intervalo entre partos, redução da produção de leite e ganho de peso, gastos com medicamentos entre outros (SEIDL et al., 1999).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trypanosoma vivax*

2.1.1 Caracterização taxonômica

O *Trypanosoma vivax* é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (OIE, 2013).

Os membros do gênero *Trypanosoma* são parasitos digenéticos, ou seja, em seu ciclo estão envolvidos dois hospedeiros (HURTADO et al., 2016), e são agrupados nas seções Stercoraria e Salivaria, dependendo do local de multiplicação no hospedeiro invertebrado. A transmissão cíclica de *T. vivax*, envolve o desenvolvimento na probóscide, de moscas do gênero *Glossina*, o que o caracteriza como pertencente à seção Salivaria (OSÓRIO et al., 2008).

Dentro da seção Salivaria, os tripanossomos foram ainda divididos, com base em hipóteses filogenéticas, em quatro subgêneros: *Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon* e *Pycnomonas* (HOARE, 1972). *Trypanosoma vivax* foi introduzido no subgênero *Duttonella*, caracterizado por formas sanguíneas com grandes cinetoplastos terminais situados em uma extremidade posterior arredondada, uma membrana ondulante de médio desenvolvimento e um flagelo livre (OSÓRIO et al., 2008).

2.1.2 Ciclo e transmissão

Em seu ciclo de transmissão vetorial, *T. vivax* desenvolve-se na probóscide de moscas do gênero *Glossina* sp. (Diptera: Glossinidae) (BRUCE, 1915) onde as formas tripomastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, evoluem para formas epimastigotas. A partir daí, ocorre o desenvolvimento de tripomastigotas metacíclicos, a única forma capaz de infectar hospedeiros vertebrados. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripanossomos se multiplicam de forma contínua como tripomastigotas (BRENER, 1979) e, estando presentes no sangue periférico, são ingeridos pela mosca durante a hematofagia, completando assim o ciclo de transmissão biológico (HOARE, 1972; OSÓRIO et al., 2008).

Fora das áreas de ocorrência da mosca tsé-tsé, o parasito é transmitido de forma mecânica, transportado por outras moscas hematófagas como tabanídeos ou *Stomoxys* spp.,

sem crescimento ou multiplicação no inseto (HOARE, 1972; JONES e DÁVILA, 2001). Neste caso, é necessário que a mosca após picar um animal infectado, se alimente rapidamente de outro animal, pois permanece infecciosa por um curto período de tempo (OSÓRIO et al., 2008). A transmissão transplacentária também já foi descrita (BATISTA et al., 2012).

Acredita-se que transmissão mecânica iatrogênica, via agulhas e instrumentos contaminados com sangue tenha um papel importante na difusão de *T. vivax* (DÁVILA e SILVA, 2000; JONES e DÁVILA, 2001; VAN DEN BOSSCHE et al., 2000), porém esse mecanismo ainda é pouco estudado.

Alguns estudos têm apontado a transmissão iatrogênica de *T. vivax* em surtos brasileiros (BARBOSA et al., 2015; BASTOS et al., 2013; FRANGE, 2013; GALIZA et al., 2011). Bastos et al. (2013) relata a ocorrência de um surto em rebanho leiteiro altamente tecnificado no estado do Mato Grosso, envolvendo vacas em lactação que recebiam diariamente aplicações endovenosas de ocitocina com compartilhamento de agulhas. A ausência de infestação de tabanídeos e a maior incidência da infecção nas vacas em lactação levaram à conclusão de que a difusão de *T. vivax* naquele rebanho havia sido via iatrogênica. Situação semelhante foi relatada por Barbosa et al. (2015) no estado de Goiás. Entretanto, são necessários estudos científicos controlados que melhor elucidem a participação desta via de transmissão na epidemiologia de *T. vivax*.

2.1.3 Distribuição geográfica

Devido à adaptação à transmissão mecânica, *T. vivax* foi capaz de se difundir para regiões onde seu vetor biológico não está presente. Informações históricas e estudos filogenéticos sugerem que o *T. vivax* tenha sido introduzido nas Américas por meio de bovinos infectados provenientes do Oeste Africano (JONES e DÁVILA, 2001; OSÓRIO et al., 2008) e tenha sofrido uma expansão clonal pelo continente (GARCIA et al., 2014).

Em geral, acredita-se que essa introdução tenha ocorrido por volta de 1830, quando o gado Zebu do Senegal foi exportado para a Guiana Francesa e para as Antilhas, entretanto, o primeiro relato da doença no continente só ocorreu em 1919, na Guiana Francesa (LEGER e VIENNE, 1919, apud JONES e DÁVILA, 2001).

No Brasil, a ocorrência de *T. vivax* em bovinos foi relatada pela primeira vez no estado do Pará, por Bulhosa (1946, apud SHAW e LAINSON, 1972), e posteriormente

identificada em búfalos (*Bubalus bubalis*) em áreas inundadas daquele mesmo estado (SHAW e LAINSON, 1972; OSÓRIO et al., 2008).

Atualmente no país, a planície Amazônica e o Pantanal são consideradas áreas de estabilidade enzoótica (DÁVILA et al., 2003; GARCIA et al., 2016; SILVA et al., 2002). Nesses locais, as infecções geralmente ocorrem de forma assintomática e a parasitemia é controlada pela resposta imune do hospedeiro, devido à exposição contínua ao parasito. Condições ambientais e nutricionais estressantes ou infecções simultâneas, contudo, podem interferir na capacidade do hospedeiro de controlar a parasitemia, permitindo sua elevação e a ocorrência de surtos esporádicos (GARCIA et al., 2016).

Em regiões não endêmicas, entretanto, os surtos de tripanossomose geralmente se caracterizam por grave sintomatologia clínica hematológica e neurológica agudas, geralmente com elevada mortalidade (HURTADO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2013). Surtos dessa natureza têm sido relatados em diversos estados brasileiros, indicando que o parasito está se espalhando pelo país (Quadro 1). Em Minas Gerais, o primeiro relato da ocorrência de tripanossomose causada por *T. vivax* ocorreu em 2008, em um rebanho leiteiro localizado no município de Igarapé (CARVALHO et al., 2008).

Quadro 1 – Primeiros registros de ocorrência de *Trypanosoma vivax* em estados brasileiros considerados não-endêmicos no período de 2002-2015.

Ano	Estado	Referência
2002	Paraíba	(BATISTA et al., 2007)
2003	Maranhão	(GUERRA et al., 2008)
2006	Tocantins	(LINHARES et al., 2006)
2007	Minas Gerais	(CARVALHO et al., 2008)
2008	São Paulo	(CADIOLI et al., 2012)
2009	Rio Grande do Sul	(DA SILVA et al., 2009)
2010	Pernambuco	(PIMENTEL et al., 2012)
2015	Goiás	(BARBOSA et al., 2015)

A ocorrência de tais surtos associa-se, geralmente, à introdução de animais portadores assintomáticos, que servem de fonte de infecção para animais que não foram previamente expostos ao parasito (BATISTA et al., 2009; CADIOLI et al., 2012).

2.1.4 Características clínicas e patológicas

A gravidade da infecção por *T. vivax* e os sinais clínicos dependem da exposição prévia ao parasito, condição nutricional, ocorrência de infecções concomitantes e estresse (GARCIA et al., 2016). Animais que se recuperam da doença podem se tornar reservatórios com níveis baixos, ou mesmos indetectáveis, de parasitemia (PLATA, 1931).

Durante o período pré-patente, que normalmente varia de 1 a 3 semanas, dependendo da dose infectante e da condição imune do hospedeiro, não são observados sinais clínicos da doença (DAGNACHEW et al., 2015). Já no período patente, a hipertermia é geralmente a primeira alteração clínica observada (HURTADO et al., 2016).

A anemia é o principal sinal clínico da tripanossomose bovina, e sua persistência leva à insuficiência cardíaca congestiva, sendo esta a principal causa de morte (MURRAY et al., 1979). A anemia pode resultar da deposição de imunocomplexos na superfície dos eritrócitos, o que desencadeia sua fagocitose, provocando uma hemólise imunomediada (BUZA et al., 1995) além da fagocitose não específica de eritrócitos por meio de um sistema fagocitário hiperativado (TAYLOR, 1998). Também são apontados, como causas da anemia, a produção de um fator hemolítico e a redução da eritropoese; por diminuição de eritropoietina, aumento de citocinas pró-inflamatórias, e diminuição da oferta de ferro (ALMEIDA et al., 2008).

Outros sinais clínicos característicos incluem letargia, fraqueza, perda de peso progressiva, lacrimejamento, diarreia, aborto (SILVA et al., 1996), linfadenomegalia, redução da produção de leite (DAGNACHEW et al., 2015), inapetência, secreção nasal e ceratite (CADIOLI, et al., 2012). Sinais neurológicos como cegueira (CARVALHO et al., 2008) dismetria, ataxia, fraqueza muscular, especialmente no quarto posterior, são também relatados (DA SILVA et al., 2009).

As principais alterações reprodutivas decorrentes da infecção por *T. vivax*, são aborto, repetição de cio, retenção de placenta, atraso na involução uterina, infertilidade, mortalidade perinatal, partos prematuros e nascimento de crias fracas. Touros apresentam redução da qualidade do sêmen, infertilidade ou esterilidade (BATISTA et al., 2012; CADIOLI et al., 2012; HURTADO et al., 2016).

2.1.5 Aspectos imunológicos

A resposta imune de bovinos contra tripanossomos ainda é pouco compreendida (BASSI et al., 2018). Entretanto, raças de bovinos tripanotolerantes como N'Dama, além ovelhas Djallonke e cabras-anãs da África Ocidental, têm sido estudadas no intuito de melhor compreender os mecanismos envolvidos no controle da infecção pelo hospedeiro (YARO et al., 2016).

Em bovinos, a infecção por *T. vivax* desencadeia uma resposta imune do tipo pró-inflamatória (BASSI et al., 2018). Substâncias derivadas do parasito induzem a ativação de células B levando à produção de imunoglobulinas (STIJLEMANS et al., 2017). Inicialmente, já nos primeiros dias após a infecção, ocorre a liberação de imunoglobulina M (IgM) e a produção de imunoglobulina G (IgG) aumenta gradativamente, sendo que sua elevação leva ao controle da parasitemia (BASSI et al., 2018). A produção máxima de IgG ocorre entre 21 e 35 dias, coincidindo com o início do decréscimo da parasitemia (BASSI et al., 2018; DESQUESNES e TRESSE, 1996).

Paralelamente, células *Natural Killers* (NK), células *T-Natural Killers* (NKT) e células T são também ativadas por substâncias derivadas do parasito, levando à produção de interferon-gama (IFN- γ). Compostos derivados do parasito desencadeiam ainda, em associação com IFN- γ , a indução de macrófagos classicamente ativados (células M1), que liberam citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF), necessárias para a destruição do parasito, mas que ao mesmo tempo contribuem para o desenvolvimento da patologia associada à infecção (STIJLEMANS et al., 2017).

Uma característica importante deste protozoário, tal como observado em outros tripanossomos africanos, é sua notável capacidade de evadir à resposta imune do hospedeiro por alguns mecanismos entre os quais se destaca a variação antigênica, que se refere à expressão sequencial e em alta densidade de diferentes glicoproteínas variantes de superfície (VSGs) (MANNA et al., 2014). Um vasto repertório de genes e pseudogenes de VSG permite que o parasito produza ondas sucessivas de VSGs diferentes, ocorrendo assim, a fuga de uma subpopulação de tripanossomos da morte mediada por anticorpos (MANNA et al., 2014). Por esta razão, a resposta imune adaptativa à infecção por tripanossomos é de curta duração e eficaz apenas contra uma subpopulação dos tipos de VSG possíveis, o que resulta em flutuações de parasitemia no curso da infecção (BARRY, 1986; JACKSON et al., 2012). Nas fases aparasitêmicas, os tripanossomos podem ser encontrados extravascularmente, nos

linfonodos (HOARE, 1972), nos olhos (no plexo coróide e no humor aquoso) e no líquido cefalorraquidiano (WHITELAW et al., 1988).

Além da variação antigênica, estes protozoários também evadem ao sistema imune promovendo uma supressão imunológica geral do hospedeiro através de mecanismos ainda não compreendidos, mas há evidências de que fragmentos de VSG contribuam para isso (RADWANSKA et al., 2000; STIJLEMANS et al., 2017). Um terceiro mecanismo de evasão envolve a depuração rápida de anticorpos (BARRY, 1979).

2.1.6 Prevenção e controle

As inúmeras tentativas de se produzir uma vacina para controle de tripanossomose falharam, sobretudo em virtude do mecanismo de variação antigênica (STIJLEMANS et al., 2017; TAYLOR, 1998).

Entre as medidas de controle para a tripanossomose bovina nas áreas não endêmicas da América do Sul podem se enumerar, além do uso de drogas tripanocidas (PEREGRINE, 1994); o controle de moscas hematófagas e adoção de precauções para a compra de animais (JONES e DÁVILA, 2001).

Os cuidados na introdução de animais em rebanhos livres da infecção são de fundamental importância, uma vez que animais portadores assintomáticos da infecção parecem ser a principal forma de difusão da doença entre rebanhos (BATISTA et al., 2009; CADIOLI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015).

Há que se considerar, que a variedade de fármacos disponíveis para o tratamento de tripanossomose é bastante limitada, uma vez que há aproximadamente 60 anos que não são desenvolvidas novas drogas contra tripanossomose, assim, o risco de desenvolvimento de resistência às drogas atuais é crescente (CHITANGA et al., 2011). Os fármacos em uso corrente, considerados eficazes contra *T. vivax* são diaceturato de diminazeno (WHITELAW et al., 1988) e cloreto de isometamidium (PEREGRINE, 1994).

No Brasil, a bovinocultura de leite baseia-se principalmente na utilização de animais mestiços oriundos do cruzamento de raças européias, em especial a raça Holandesa com raças zebuínas (GUIMARÃES et al., 2002). Entretanto, características comportamentais destes animais, no que se refere à relação entre mãe e cria, levam à necessidade da presença do bezerro no momento da ordenha para estimular a ejeção do leite. Esta necessidade, contudo, pode ser sanada pela administração de ocitocina exógena (OLIVEIRA, 2010); prática que

vem sendo cada vez mais adotada no país (MENESES, 2016) e está associada à ocorrência de surtos de *T. vivax* (BARBOSA et al., 2015; BASTOS et al., 2013), sobretudo pelo compartilhamento de agulhas e seringas sem sua devida desinfecção. Neste contexto, medidas que visem reduzir a disseminação iatrogênica da infecção, tais como o uso individualizado de agulhas para a administração de medicamentos ou sua desinfecção, são fundamentais.

Tendo em vista a resistência de produtores rurais em adotar o uso individual de seringas e agulhas para aplicação de medicamentos e o provável envolvimento do seu uso compartilhado na ocorrência de surto de tripanossomose no estado de Goiás (BARBOSA et al., 2015), um estudo foi conduzido naquele estado para avaliar a sensibilidade de *T. vivax* frente a ação de diferentes desinfetantes, comumente utilizados (MADRID, 2017). Esse foi o primeiro estudo conduzido até então com a finalidade de avaliar a ação de desinfetantes sobre o parasito e os resultados demonstraram que álcool 40%, álcool 70% + iodo 0,5%, iodo 0,5% e hipoclorito de sódio 0,05% foram eficazes na eliminação do parasito.

2.2 Diagnóstico de *T. vivax*

Dada a inespecificidade dos sinais clínicos apresentados, o diagnóstico clínico da tripanossomose causada por *T. vivax* tem valor limitado (LUCKINS, 1992). Já o diagnóstico laboratorial da infecção pode ser feito por métodos diretos, ou parasitológicos, e por métodos indiretos, também denominados métodos sorológicos. Métodos diretos são aqueles em que o parasito em si ou seus constituintes são detectados, enquanto os métodos indiretos detectam anticorpos que o parasito induz no hospedeiro (LUCKINS, 1992; MADRUGA, 2004).

Embora os métodos diretos sejam os mais utilizados no Brasil (MADRUGA, 2004) sua capacidade de detectar infecções varia em função do nível de parasitemia. Graças à variação antigênica, durante o curso da infecção ocorrem grandes variações na parasitemia, com períodos até mesmo aparasitêmicos, o que compromete a sensibilidade de tais técnicas (CADIOLI et al., 2015; SAMPAIO et al., 2015).

Entre os métodos parasitológicos, destaca-se a técnica de centrifugação de hematócrito, também denominada técnica de Woo (WOO, 1970). Para sua execução, três quartos de um tubo capilar são preenchidos com sangue a ser testado, sela-se a extremidade com plasticina e centrifuga-se a 12.000 g por 5 minutos em uma centrífuga de hematócrito. Os tripanossomos se concentram na mesma camada que os leucócitos, entre as hemácias e o plasma. O capilar é então examinado ao microscópio óptico no aumento de 100X e os parasitos móveis podem ser vistos entre a camada de leucócitos e o plasma (BONNET et al., 2015).

A técnica de Woo apresenta como principais vantagens, a facilidade de uso, podendo ser aplicada a campo, e a elevada sensibilidade em relação aos demais métodos parasitológicos diretos. Além disso, durante sua execução, é possível medir também o Volume Globular (VG) do animal, que fornece uma importante informação sobre o *status* da anemia (NANTULYA, 1990).

A sensibilidade da técnica, entretanto, diminui consideravelmente quando a parasitemia está abaixo de 700 parasitos/ml (DESQUESNES e TRESSE, 1996). Além disso, a leitura do exame depende da motilidade dos parasitos, que é determinante para sua visualização no tubo capilar; portanto, um fator limitante da sua utilização é o tempo decorrido entre a coleta da amostra e o seu processamento, que deve ser inferior a 6 horas, quando os parasitos apresentam viabilidade máxima (WOO, 1970).

Na tentativa de elevar o tempo de viabilidade dos parasitos, e conseqüentemente o tempo de utilização da técnica de Woo, Motta et al. (2013) avaliaram a adição de água de côco industrializada a amostras de sangue fresco de um ovino experimentalmente infectado. Seus resultados indicam que a água de côco foi eficiente como conservante, aumentando a viabilidade dos parasitos. Estes autores discutem que o resultado encontrado possa ser atribuído à osmolaridade da água de côco, que se assemelha à do sangue de ruminantes; além de sua composição de carboidratos, vitaminas, minerais e aminoácidos, sobretudo L-prolina, que poderiam influenciar na sobrevivência de *T. vivax*.

A L-prolina é uma importante fonte de carbono para tripanosomas (BRINGAUD, et al., 2006). Em experimento visando o cultivo *in vitro* de *T. vivax*, verificou-se que crescimento de epimastigota na cultura foi maior na medida em que foi aumentada a concentração de L-prolina no meio, indicando que a prolina é uma peça chave no seu crescimento. Foi observado que 4 mM era a concentração ideal desse aminoácido e que variações nas concentrações de glicose não afetaram o crescimento do parasito (D'ARCHIVIO et al., 2011).

Podem também ser utilizados, como métodos diretos para diagnóstico de *T. vivax*, porém com menor sensibilidade em relação ao Woo, exames de amostras de sangue fresco entre lâmina e lamínula (gota espessa) e esfregaços sanguíneos convencionais corados. A camada que concentra os tripanossomos, obtida pela centrifugação do capilar, denominada *buffy coat*, pode ainda ser utilizada para a confecção de esfregaços (MURRAY et al., 1977), permitindo melhor identificação do parasito.

Técnicas moleculares de diagnóstico, como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* (LAMP), são mais sensíveis em relação às anteriores, sendo capazes de detectar o DNA do parasito em baixos níveis de parasitemia (CADIOLI et al., 2015). Contudo, o uso dessas técnicas, ainda é bastante limitado, seja por seu elevado custo ou pela necessidade uma estrutura laboratorial complexa, no caso da PCR (BOULANGÉ et al., 2017).

A detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma* em soros de animais possibilita a determinação da prevalência, fornece informações a respeito da situação da doença nos rebanhos e pode ser usada para avaliar os efeitos da infecção sobre a saúde animal e sua produtividade, bem como para estimar os riscos da doença (MADRUGA et al., 2006; OSÓRIO et al., 2008). É importante considerar, contudo, que a presença de anticorpos circulantes não indica, necessariamente, uma infecção ativa, uma vez que a persistência de

anticorpos circulantes pode ocorrer por longos períodos, mesmo após a eliminação do parasito (DELAFOSSÉ et al., 2006; NANTULYA, 1990).

Entre os métodos indiretos, merecem destaque a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Essas técnicas, ao detectarem IgG específico contra *T. vivax*, são eficazes para animais cronicamente infectados (CADIOLI et al., 2012; SAMPAIO et al., 2015), sendo úteis para investigações epidemiológicas (OSÓRIO et al., 2008). O ELISA baseado no uso de antígenos brutos tem especificidade limitada ao subgênero (MAGONA et al., 2003). Reações cruzadas com *T. evansi* podem ocorrer (MADRUGA et al., 2006), o que limita seu uso, especialmente em áreas onde ambas as infecções ocorrem, como o Pantanal.

A RIFI é considerada um método sensível, de baixo custo, de execução simples e rápida, além de não ter sido relatada a reação cruzada entre *T. vivax* e outros hematozoários (PLATT e ADAMS, 1976). Esse foi um dos primeiros testes de detecção de anticorpos a serem utilizados para o diagnóstico de tripanossomose (BAILEY et al., 1967), tendo sido muito utilizado em rebanhos na África (ASHKAR e OCHILO, 1972). Suas desvantagens são: não ser um método quantitativo, requerer microscópio de fluorescência e a falta de padronização da produção de antígenos (PILLAY et al., 2013).

Para execução da RIFI, utilizam-se tripanossomos inteiros, previamente obtidos de um animal inoculado com o *T. vivax*, que são fixados em uma lâmina que, em seguida, é tratada com o soro do animal a ser testado. Ao serem expostas a anticorpos anti-IgG bovino marcados por fluoresceína, as lâminas de animais positivos evidenciarão fluorescência quando analisadas à luz ultravioleta (LUCKINS e MEHLITZ, 1978).

A sensibilidade da RIFI é elevada, tendo sido estimada entre 85,7% (ASHKAR e OCHILO, 1972) e 96,4% (PLATT e ADAMS, 1976). Já a especificidade da técnica foi estimada em 100%, não ocorrendo reação cruzada com outros hematozoários, tais como *T. theileri*, *Eperythrozoon* sp., *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* (PLATT e ADAMS, 1976).

Quando comparada à técnica de ELISA convencional, baseada em antígenos brutos, a RIFI demonstrou-se menos sensível para a detecção de anticorpos anti-*T. vivax* (LEJON et al., 2003; SAMPAIO, 2013).

2.3 Validação de testes de diagnóstico

Os requisitos de um teste diagnóstico variam conforme a situação epidemiológica da infecção e as estratégias adotadas para seu controle, porém, de um modo geral os testes em si precisam cumprir, entre outros, os seguintes critérios, para serem de uso prático: alta especificidade e sensibilidade diagnósticas, reprodutibilidade, simplicidade de uso, economia, facilidade de interpretação. Além disto, devem ser idealmente, utilizáveis no campo (LUCKINS, 1992).

A validação é um processo que determina a capacidade de um ensaio; que foi devidamente desenvolvido, otimizado e padronizado; para atender a um fim pretendido (OIE, 2014a). Assim, um método será considerado validado quando suas características estiverem em conformidade com os critérios e limites estabelecidos (DINIZ, 2013).

Entretanto, uma vez validado, é necessário que o ensaio seja continuamente avaliado para garantir que mantenha sua adequação, seja pela avaliação dos resultados de amostras controle incluídas em cada corrida, ou pela sua avaliação durante o uso rotineiro na população alvo (OIE, 2014a).

Durante todo processo de desenvolvimento e validação, são utilizadas amostras de referência, que devem ser inequívocas quanto ao seu *status*, ou seja, devem representar amostras verdadeiramente positivas ou verdadeiramente negativas (OIE, 2014b).

A identificação direta da presença do agente no hospedeiro é considerada um padrão de referência positivo inequívoco. Assim as amostras de soro derivadas de um animal em que se verifica a presença do agente são usualmente consideradas como padrões de referência positiva (OIE, 2014b).

Por outro lado, amostras obtidas de animais de áreas geográficas onde, históricos de rebanho, perfis clínicos, resultados de testes anteriores e outros parâmetros fornecem evidências da ausência do patógeno, são consideradas um padrão inequívoco de referência negativa (OIE, 2014b).

A Organização Internacional de Saúde Animal (OIE) propõe 11 critérios para desenvolvimento e validação de ensaios aplicáveis a doenças infecciosas: a definição da finalidade, a otimização, a padronização, a repetibilidade, a sensibilidade e a especificidade analíticas, a definição do ponto de corte (para testes quantitativos), a sensibilidade e a

especificidade diagnósticas, a reprodutibilidade e a avaliação da aptidão para o fim pretendido (OIE, 2014a).

Para melhor entendimento do processo de validação de um ensaio, Jacobson (1998) propõe a sua divisão em duas partes: primeira fase contempla o estabelecimento de parâmetros e características do ensaio enquanto a segunda diz respeito à fase de monitoramento do desempenho do ensaio, bem como manutenção e extensão dos critérios de sua validação.

Estudos de viabilidade são realizados preliminarmente e visam determinar se os reagentes e protocolo selecionados têm a capacidade de detectar os anticorpos alvo na matriz, no caso de teste sorológico, soro ou plasma. Durante o desenvolvimento do ensaio é fundamental que seja feita sua otimização, que diz respeito à definição, através da realização de testes piloto, do protocolo que oferece os melhores resultados (JACOBSON, 1998).

A repetibilidade de um teste diz respeito ao nível de concordância entre os resultados obtidos pela avaliação de replicatas de uma amostra, dentro da mesma corrida do ensaio e entre diferentes corridas. Já a reprodutibilidade de um teste é obtida quando se comparam os resultados obtidos usando ensaio idêntico em diferentes laboratórios (JACOBSON, 1998).

Quanto às características analíticas a serem avaliadas em um teste, sensibilidade analítica refere-se à menor quantidade detectável do analito em questão e a especificidade analítica, ao grau em que este teste não apresenta reações cruzadas com outros analitos (JACOBSON, 1998). Assim, a especificidade analítica de um teste sorológico, é sua capacidade de diferenciar os anticorpos alvo de anticorpos não-alvo, mas relacionados (DINIZ, 2013).

As características diagnósticas de um ensaio são a sensibilidade diagnóstica, que é a proporção de amostras de referência de animais sabidamente infectados que dão resultado positivo no teste, e a especificidade diagnóstica, que é a porcentagem de amostras de referência de animais sabidamente não infectados que dão resultado negativo no teste (JACOBSON, 1998).

3 JUSTIFICATIVA

O aumento da incidência de surtos de tripanossomose bovina em diversas regiões do Brasil nos últimos anos, bem como a severidade dos mesmos, acarretando graves perdas produtivas diretas e indiretas justificam a realização de estudos sobre *T. vivax*. A maior parte das informações disponíveis na literatura científica sobre o parasito foi obtida no continente Africano, onde as características epidemiológicas diferem consideravelmente daquelas observadas nas Américas.

Alguns relatos indicam o provável envolvimento da via iatrogênica na transmissão de *T. vivax* em surtos ocorridos no Brasil, apontando o compartilhamento de seringas e agulhas, usadas para aplicação de ocitocina em vacas em lactação no momento da ordenha, como a provável via de difusão do parasito dentro dos rebanhos (BARBOSA et al., 2015; BASTOS et al., 2013). Entretanto, não há estudos que avaliem a ação da ocitocina sobre a viabilidade de *T. vivax*.

O uso de agulhas individuais é altamente recomendável como medida sanitária no controle de enfermidades transmissíveis por via iatrogênica, entre elas tripanossomose. Contudo, considerando-se a resistência de produtores rurais em adotar este procedimento, sobretudo pelo custo, o uso eficiente de desinfetantes, adequados à eliminação do parasito de seringas e agulhas, poderia minimizar os riscos de transmissão de *T. vivax*.

Devido à simplicidade de uso e à maior sensibilidade em relação aos demais métodos de diagnóstico direto, a técnica de Woo se destaca entre os métodos parasitológicos (MADRUGA, 2004). Entretanto, sua principal limitação é o tempo decorrido entre a coleta do material e seu processamento. Tentativas de incrementar este tempo, como o uso de conservantes, representam um importante avanço para melhoria no diagnóstico da doença em casos agudos.

A RIFI baseada na pesquisa de IgG, por outro lado, é útil para a detecção da infecção de *T. vivax* na fase crônica, já tendo sido utilizada em trabalhos científicos com bons resultados. Considerando seu baixo custo e elevado rendimento, esta técnica é apropriada para a realização de estudos epidemiológicos, sendo necessária, contudo, sua validação.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de conservantes e a ação de desinfetantes sobre a viabilidade de *T. vivax* e validar a técnica de RIFI como método de diagnóstico.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Testes de viabilidade de *T. vivax*

- Avaliar o efeito da adição de L-prolina, D-Glicose, da associação de ambos (L-prolina + D-Glicose) e de tampão PSG - *Phosphate saline glucose* em amostras de sangue fresco de animal experimentalmente infectado, sobre a viabilidade de *T. vivax*;
- Avaliar a viabilidade de *T. vivax* em soluções de diferentes concentrações de ocitocina comercial injetável;
- Avaliar a ação de hipoclorito de sódio 0,5%, álcool comercial (54° GL) e cloreto de alquil dimetil benzil amônio (CB-30 TA) 0,15% na eliminação de *T. vivax* de seringa de 1 ml/agulha 22G, através da aspiração e descarte do desinfetante;
- Avaliar a ação de hipoclorito de sódio 0,5%, álcool comercial (54° GL) e cloreto de alquil dimetil benzil amônio (CB-30 TA) 0,15% na eliminação de *T. vivax* de seringa de 1 ml/agulha 22G quando esta é apenas mantida imersa no desinfetante;

4.2.2 Validação da RIFI para diagnóstico de *T. vivax*

- Definir a finalidade de uso da RIFI como método de diagnóstico de *T. vivax*, estudar sua viabilidade e otimizar a técnica;
- Avaliar sua sensibilidade e especificidade analíticas;
- Determinar sua sensibilidade e especificidade diagnósticas;
- Avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade da técnica;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Considerações éticas e infecção experimental

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob os números 38/2017 e 163/2017.

Para a produção do antígeno utilizado na validação da RIFI e obtenção de parasitos vivos para os estudos de viabilidade, um caprino macho sem raça definida, de sete meses de idade, foi inoculado por via intravenosa com 1,8 ml de inóculo de *T. vivax* criopreservado em glicerol 10%, contendo $1,3 \times 10^6$ tripanossomos/ml, isolado de um surto ocorrido em Igarapé/MG (CUGLOVICI et al., 2010). O animal foi mantido no galpão do Departamento de Clínica de Ruminantes da Escola de Veterinária da UFMG, em uma baia individual telada, com água e alimentação *ad libitum*.

A avaliação clínica foi realizada diariamente pela aferição da temperatura retal, avaliação de mucosas e monitoramento de parâmetros respiratórios, circulatórios e digestivos. A avaliação parasitológica também foi realizada diariamente por meio da colheita de 0,5 ml de sangue em tubo vacutainer com anticoagulante EDTA, por punção na veia jugular, para o exame pela técnica de Woo.

A partir do terceiro dia da inoculação, foi observada a positividade no teste de Woo e iniciou-se o monitoramento da parasitemia pela técnica descrita por Brener (1962). Para tal, a amostra colhida no EDTA era cuidadosamente homogeneizada e 5 μ l eram colocados sobre uma lâmina de vidro e cobertos com lamínula de 22 x 22 mm. Realizava-se então a contagem de formas tripomastigotas em 50 campos do microscópio com aumento de 400X e o resultado era multiplicado pelo fator de correção 16.000, que considera a medida do campo do microscópio e o volume de sangue, obtendo-se o número de tripanossomos por mililitro de sangue (BRENER, 1962).

Os testes de viabilidade foram iniciados quando a parasitemia atingiu valores superiores a 1×10^6 tripanossomos/ml, que ocorreu no sexto dia pós-inoculação. Foram observadas alterações na parasitemia sendo que o pico da parasitemia ($4,08 \times 10^6$ tripanossomos/ml) ocorreu no 14º dia pós-inoculação, quando foram colhidos 40 ml de sangue para produção de antígeno utilizado na validação da RIFI.

5.2 Testes de viabilidade de *T. vivax*

5.2.1 Avaliação da adição de conservantes

Para avaliar a influência de diferentes conservantes na sobrevivência do parasito, o sangue do animal infectado foi coletado em tubos vacutainer com EDTA por punção na veia jugular. Os meios de conservação avaliados foram L-Prolina a 4mM (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), D-Glicose a 0,2% (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), L-Prolina + D-Glicose a 4 mM e 0,2%, respectivamente, e tampão PSG (95 mM de Na₂HPO₄; 5 mM de NaH₂PO₄; 73 mM de NaCl, 1% de D-Glicose; pH 8,0), que é um solução tampão empregada durante a purificação de *T. vivax* para produção de antígenos (LANHAM; GODFREY, 1970).

Realizou-se a diluição da amostra, pela adição de solução salina fisiológica 0,9% em quantidade suficiente para atingir as concentrações finais de 7×10^3 , 7×10^4 , 7×10^5 parasitos por ml. Para o tratamento PSG, o próprio conservante foi utilizado como diluente.

O sangue, em cada uma das diluições avaliadas, foi dividido em quatro alíquotas de 12 ml, armazenadas em tubos do tipo Falcon de 15 ml. Soluções concentradas de Prolina 173,71 mM e Glicose 8,7% foram adicionadas às respectivas alíquotas, para obtenção das concentrações finais desejadas (Quadro 2). Uma alíquota do sangue diluído com solução salina fisiológica, porém sem adição de nenhum conservante, foi utilizada como controle para cada nível de parasitemia. Para evitar interferência da diluição decorrente da adição das soluções conservantes, apesar do pequeno volume, igual volume de solução salina fisiológica era acrescentado aos tubos que receberam apenas um ou nenhum tratamento. As alíquotas devidamente identificadas foram mantidas refrigeradas a 4°C até o momento da avaliação.

Quadro 2 - Volumes de soluções acrescentados às amostras contendo diferentes concentrações de *T. vivax*.

Grupo	L-Prolina (173,71 mM)	D-Glicose (8,7%)	Salina Fisiológica (0,9%)
Controle (C)	-	-	500 µl
Prolina (P)	250 µl	-	250 µl
Prolina + Glicose (PG)	250 µl	250 µl	-
Glicose (G)	-	250 µl	250 µl
PSG	-	-	500 µl

As soluções obtidas foram então examinadas para avaliação da viabilidade de *T. vivax* pelo método de Woo, a cada 12 horas, até o tempo final de 60 horas. Para cada tempo, foram feitos 30 tubos capilares por tratamento e para cada diluição (SAMPAIO, I. B. M., comunicação pessoal). As amostras analisadas foram classificadas como positivas ou negativas; considerando a presença ou ausência de parasitos móveis (Figura 1).

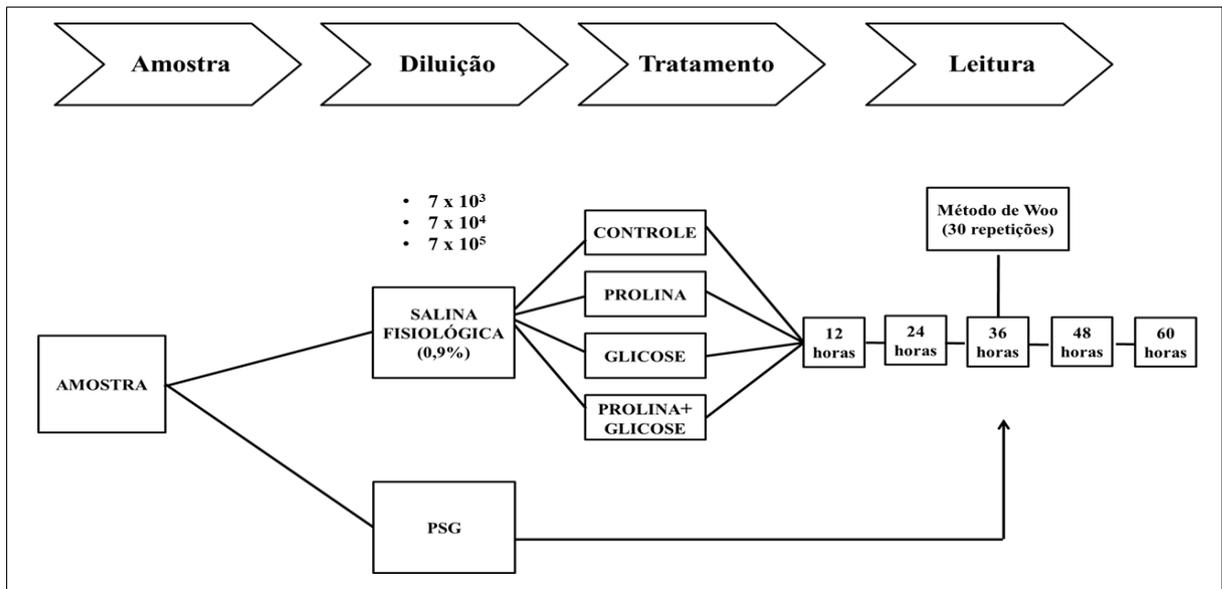


Figura 1: Esquema do experimento para avaliação da adição de conservantes a amostras de sangue fresco com a finalidade de prolongar a viabilidade de *T. vivax*.

5.2.2 Avaliação da ação de desinfetantes na viabilidade de *T. vivax* em seringas/agulhas

A avaliação da ação de desinfetantes sobre a viabilidade de *T. vivax* em seringas/agulhas foi feita através de dois processos. Primeiramente, avaliou-se seu efeito quando a solução desinfetante era aspirada e descartada (avaliação imediata) e em seguida quando o conjunto composto por seringa e agulha era apenas mantido imerso por 30 minutos dentro da solução desinfetante.

Utilizou-se seringas com capacidade de 1 ml acopladas a agulhas 0,70 x 25 (22 G), levando em conta as observações pessoais do autor e relatos de médicos veterinários que trabalham a campo de que este tipo de equipamento é utilizado com frequência na rotina de fazendas que praticam a aplicação de ocitocina endovenosa nas vacas em lactação.

Os desinfetantes avaliados foram: hipoclorito de sódio 0,5% (Start, Start Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), álcool comercial 54° GL (Álcool líquido, Carrefour, Embu das

Artes, SP, Brasil) e cloreto de alquil dimetil benzil amônio (CB-30 TA, Laboratório Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil) na diluição 1:200, concentração final de 0,15%.

Inicialmente, o sangue contendo *T. vivax* foi colhido do animal experimentalmente infectado e a contagem de tripanossomos foi determinada pela técnica de Brener, conforme descrito anteriormente, ajustando-se a concentração para 1×10^6 tripanossomos/ml, pela adição de salina fisiológica 0,9%. O sangue foi mantido sob refrigeração até o momento do uso.

No primeiro processo de desinfecção avaliado, o procedimento experimental consistia em aspirar-se, com a seringa acoplada à agulha, 0,2 ml de sangue contaminado e imediatamente desprezar todo o conteúdo. Feito isto, aspirava-se, com a mesma seringa, 0,2 ml de cada tratamento (hipoclorito, álcool, CB-30 TA), desprezando-se em seguida em um recipiente de descarte. Como controle, era aspirado e descartado igual volume de solução salina fisiológica 0,9%. O conteúdo residual da seringa era então aspirado e expirado por três vezes em frascos do tipo Eppendorf contendo 50 μ l de solução salina fisiológica 0,9% e a solução obtida era imediatamente avaliada entre lâmina e lamínula para contagem de tripanossomos viáveis, móveis, pelo método de Brener (Figura 2).

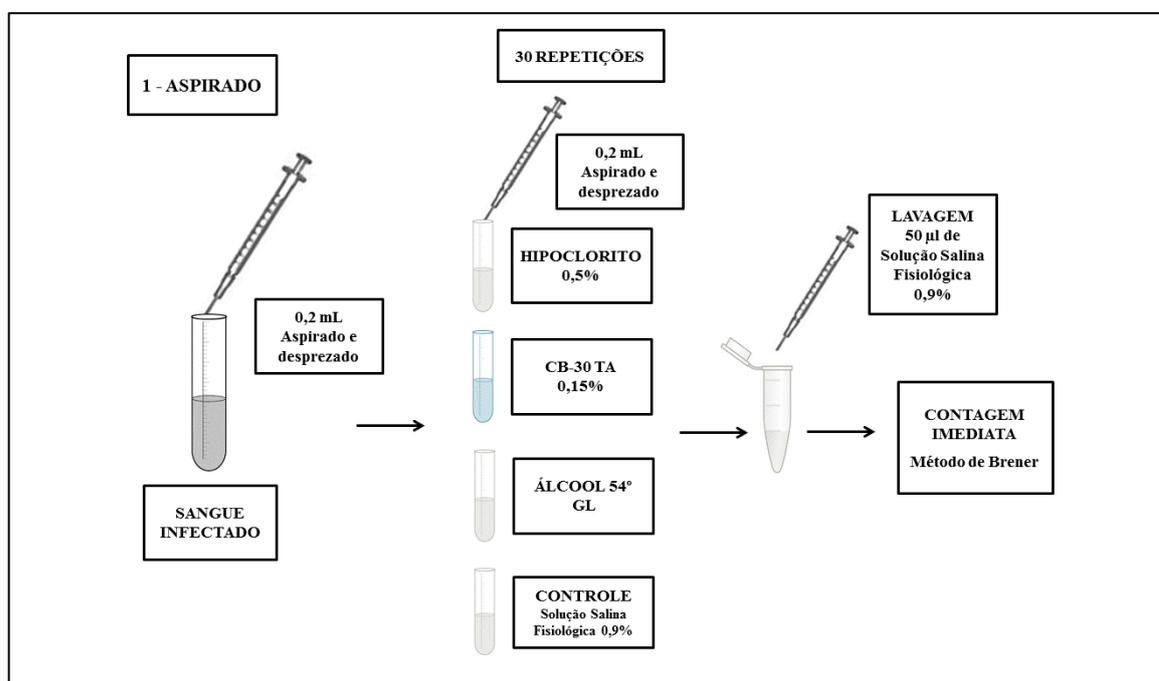


Figura 2: Esquema do experimento para avaliação da viabilidade de *T. vivax* em seringas e agulhas submetidas à desinfecção pela técnica de “aspirar e desprezar” o desinfetante.

No segundo processo, aspirava-se, com a seringa acoplada à agulha, 0,2 ml de sangue contaminado desprezando-se imediatamente todo o conteúdo. A seringa com a agulha acoplada, contendo o resíduo de sangue, era então mantida submersa nas soluções

desinfetantes, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Como controle, a seringa/agulha era mantida sobre a bancada pelo mesmo período. Transcorrido este tempo, procedia-se a “lavagem” do conteúdo em solução salina fisiológica 0,9% e avaliação de viabilidade tal como descrito no primeiro processo (Figura 3).

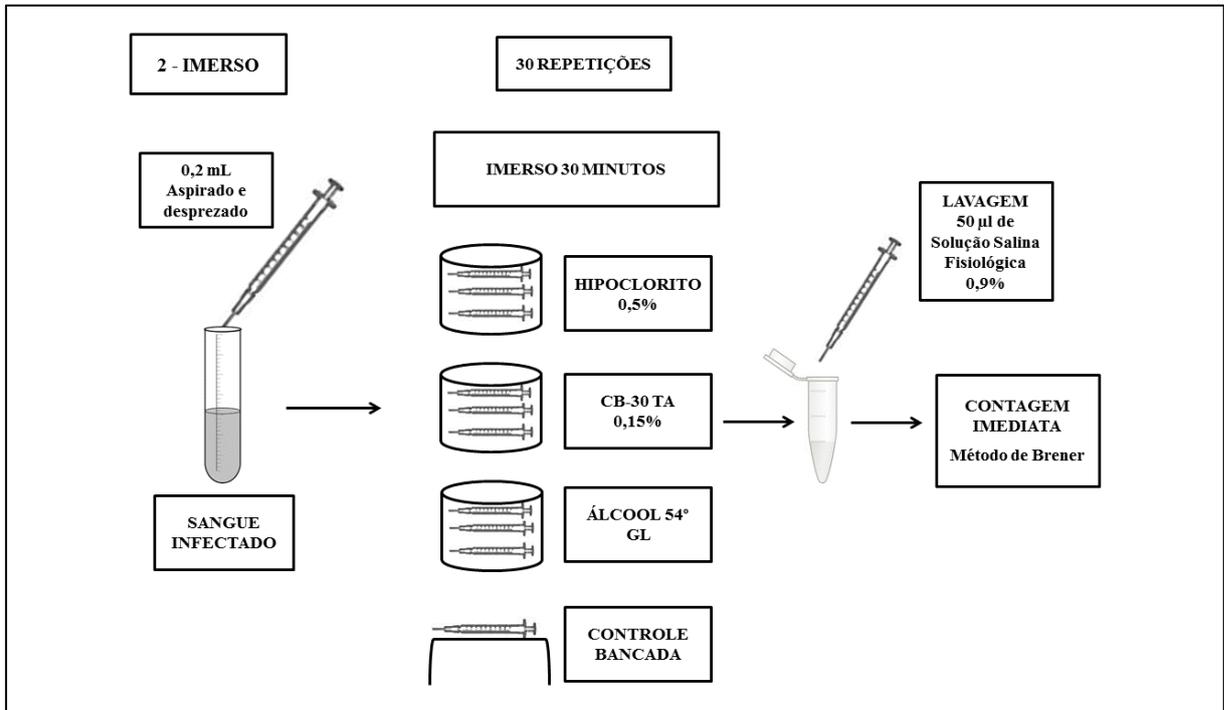


Figura 3: Esquema do experimento para avaliação da viabilidade de *T. vivax* em seringas e agulhas submetidas à desinfecção pela técnica de imersão por 30 minutos na solução desinfetante.

Em ambos os processos, foram feitas 30 repetições de cada tratamento, utilizando-se uma seringa e uma agulha para cada repetição (SAMPAIO, I. B. M., comunicação pessoal).

5.2.3 Avaliação da viabilidade de *T. vivax* em soluções de ocitocina

Para avaliação da viabilidade de *T. vivax* na ocitocina injetável de uso veterinário coletou-se uma amostra de sangue do caprino infectado e determinou-se a contagem de tripanossomos, utilizando a metodologia de Brener, ajustando-se em seguida a concentração para 1×10^6 tripanossomos/ml, pela adição de solução salina fisiológica 0,9%. O sangue foi mantido sob refrigeração até o momento da utilização.

Em placas de ELISA, foram preparadas soluções de sangue e ocitocina injetável comercial de uso veterinário 10 UI/ml (Placentex®, Laboratório União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil) nas proporções 1:1 e 1:200. Como controle utilizou-se solução de sangue e

salina fisiológica 0,9% na proporção de 1:1. Foram realizadas 10 repetições de cada diluente e cada uma das soluções foi avaliada imediatamente após o preparo e nos tempos 10 minutos, 20 minutos e 30 minutos (Figura 4).

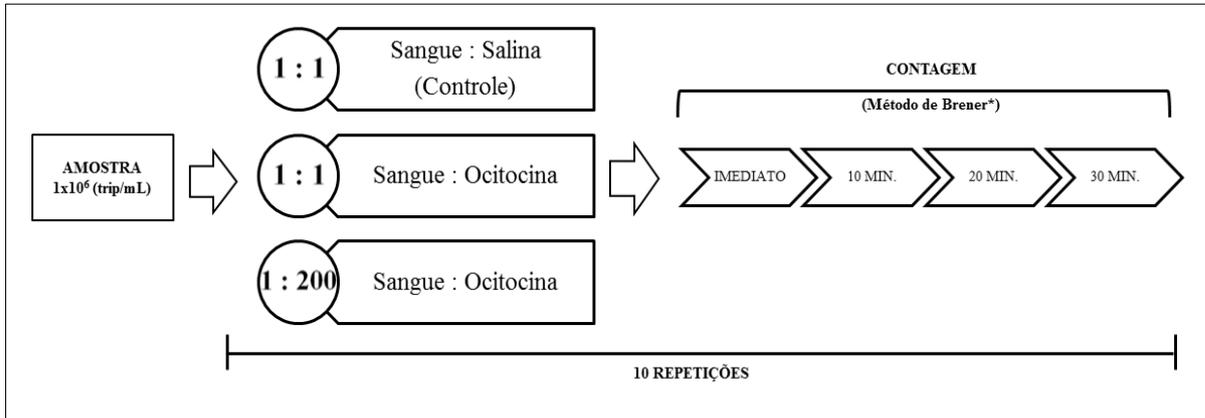


Figura 4: Esquema do experimento para avaliação da viabilidade de *T. vivax* em soluções de diferentes concentrações de ocitocina.

As proporções de sangue e ocitocina definidas visaram simular as condições encontradas dentro de uma seringa de ocitocina e dentro de um frasco de ocitocina. A proporção de 1:1 levou em consideração o hábito comum entre ordenhadores de realizar a aplicação de ocitocina na veia mamária (OLIVEIRA, 2010), aspirando um volume variável de sangue para confirmar a punção da veia e antes de injetar o fármaco; o que permite a ocorrência de um volume de sangue residual na seringa. Para a definição da proporção 1:200, considerou-se o pequeno volume de sangue que retorna ao frasco a cada aplicação realizada.

Entre as leituras, as placas contendo as soluções foram cobertas e mantidas sobre a bancada em temperatura ambiente, simulando a condição em que o frasco de ocitocina e a seringa contendo resíduo de sangue e ocitocina são mantidos na sala de ordenha.

Para avaliação da viabilidade, cada solução foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta automática com capacidade de 10 µl, regulada para 5 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), pipetando-se e desprezando-se o conteúdo por três vezes. Em seguida, 5 µl foram colocados entre lâmina e lamínula para contagem dos tripanossomos móveis pelo método de Brener (1962) adaptado, realizando-se a contagem de 25 campos, de modo a não interferir nos intervalos de tempo estabelecidos.

5.2.4 Análises estatísticas dos testes de viabilidade

Todas as análises estatísticas dos testes de viabilidade foram realizadas por meio do software R, versão 3.4.2 (R Core Team, 2017).

Para testar as diferenças entre os diferentes conservantes sobre a viabilidade de *T. vivax*, calculou-se o tempo em que a viabilidade foi igual a 0,5, isto é, 50% das amostras positivas, e este índice, foi chamado de T50. Em outras palavras, o valor de T50 corresponde ao tempo necessário para que 50% das amostras fiquem negativas. A média e o respectivo intervalo de 95% de confiança de T50 foram calculados para cada tratamento e para cada nível de parasitemia. Utilizou-se a correção de Tukey nas comparações múltiplas par-a-par.

Para avaliar a influência de soluções de ocitocina e de diferentes soluções desinfetantes sobre a viabilidade do parasito, foi ajustado um modelo de regressão linear generalizado com a distribuição de Poisson, que é adequada a dados de contagem. Esse modelo testou a diferença no número médio de parasitos contados pelo total de campos avaliados. Utilizou-se a correção de Tukey nas comparações múltiplas par-a-par.

5.3 Validação da RIFI para diagnóstico de *T. vivax*

A metodologia adotada seguiu a sistematização proposta por Jacobson (1998) para validação da RIFI para diagnóstico de *T. vivax*. Esse autor propõe a divisão do processo de validação, em duas partes principais, sendo a primeira, o estabelecimento de parâmetros e características do ensaio e a segunda, o monitoramento do seu desempenho, além da manutenção e a extensão dos critérios de sua validação. O presente trabalho aborda somente a primeira parte, uma vez que a segunda parte diz respeito a um processo constante de monitoramento do ensaio, a ser desenvolvido de forma permanente após sua implantação.

As etapas seguidas foram: definição da finalidade; avaliação de viabilidade; otimização, por meio da escolha e definição de reagentes e protocolos; além da determinação das características de desempenho: repetibilidade, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade analíticas e diagnósticas.

A definição de finalidade e viabilidade da técnica foram avaliadas mediante análise de informações disponíveis na literatura sobre sua utilização para diagnóstico de *T. vivax* enquanto as demais etapas foram conduzidas experimentalmente.

5.3.1 Obtenção do antígeno de *T. vivax* para realização da RIFI

O primeiro passo para realização das análises necessárias à validação da RIFI consistiu na obtenção do antígeno, que foi realizada conforme descrito por Katende et al. (1987), com adaptações.

Quando a parasitemia do caprino infectado atingiu seu pico, com $4,08 \times 10^6$ tripanossomos/ml, 40 ml de sangue foram colhidos em tubos vacutainer contendo EDTA. O sangue foi centrifugado a 8.000 g/10 min. em temperatura ambiente (Jouan A14, Jouan, St. Herbalin, França), em microtubos de 2,0 ml preenchidos até 80% de sua capacidade. O *buffy coat* foi coletado e ressuspenso em PSG (95 mM de Na_2HPO_4 ; 5 mM de NaH_2PO_4 ; 73 mM de NaCl, 1% de D-Glicose; pH 8,0) na proporção de 1:3. Os tripanossomos foram então separados dos demais componentes do sangue através de uma coluna de DEAE-celulose equilibrada com PSG (LANHAM e GODFREY, 1970).

Frações de aproximadamente 2,0 ml do eluato obtido da coluna foram recuperadas em tubos de ensaio de 4 ml e examinadas por microscopia. As frações que continham parasitos foram misturadas e centrifugadas a 4.500 g/ 15 min. a 4°C (Jouan BR4i, Jouan, St.

Herbalin, França). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de parasitos foi ressuspensão em PSG e novamente centrifugado conforme anteriormente. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes.

O sobrenadante foi então desprezado e os tripanossomos ressuspensos em solução salina fisiológica 0,9% até a obtenção de uma concentração de 1×10^6 parasitos/ml. Em seguida foi adicionada, delicadamente, a solução fixadora gelada, composta por 80% de acetona v/v e 20% de salina contendo formalina a 0,25%, na proporção de uma parte de suspensão de parasitos para duas partes da solução fixadora. Essa mistura foi deixada *overnight* a -20°C sendo posteriormente lavada por três vezes com solução salina fisiológica 0,9%, centrifugando-se a 380 g/15 min. a 4°C (Jouan BR4i, Jouan, St. Herbalin, França), descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o *pellet*. Finalmente o *pellet* foi ressuspensão em solução salina tamponada (PBS: 140 mM de NaCl; 10 mM de Na_2HPO_4 ; 1,76 mM de KH_2PO_4 ; 2,68 mM de KCl, pH 7,2) contendo 0,2% de azida sódica e 0,2% de albumina de soro bovino até uma concentração média de seis parasitos por campo microscópico, em aumento de 400X, e estocado sob refrigeração a 4°C .

5.3.2 Amostras de referência

As amostras de soro utilizadas como padrão de referência positivo para este estudo foram obtidas em uma propriedade, localizada no município de Maravilhas/MG, atendida pela equipe da Clínica de Ruminantes da Escola de Veterinária da UFMG, durante um surto de tripanossomose por *T. vivax*. Para que as amostras representassem positivos inequívocos, foram obtidas de animais com diagnóstico parasitológico positivo, pela técnica de Woo. Para assegurar-se a presença de anticorpos, considerando o tempo necessário para que o sistema imune do animal produzisse IgG, a coleta do soro destes animais foi realizada após 30 dias do diagnóstico parasitológico.

As amostras utilizadas como padrão de referência negativo neste estudo provêm de bovinos do Paraná; um estado considerado livre da doença, onde não se constatou até a presente data, nenhum surto da doença ou a presença do agente. Esses animais foram negativos nos testes parasitológicos de esfregaço sanguíneo de *buffy coat* realizados previamente, e as amostras também foram submetidas à prévia análise molecular, pela técnica de PCR, resultando negativas.

Para a definição do número de amostras de referência positivas, foi utilizada a fórmula abaixo, onde ‘ DSn ’ é a sensibilidade estimada, ‘ e ’ é a porcentagem de erro admitida na sensibilidade estimada e ‘ c ’ é o intervalo de confiança (JACOBSON, 1998).

$$n = \frac{(DSn)(1 - DSn)(c)^2}{e^2}$$

Portanto, para uma sensibilidade estimada de 98%, com uma porcentagem de erro de 5% na estimativa e com um intervalo de confiança de 95%, obteve-se o número de 30 amostras de referência positivas requeridas (JACOBSON, 1998; OIE, 2014a). Foram utilizadas 35 amostras, de modo a elevar a confiança dos resultados, uma vez que se dispunha desta quantidade de amostras sabidamente positivas.

O número de amostras de referência negativas foi definido pela mesma fórmula e considerando uma especificidade estimada de 98%. Admitindo a mesma porcentagem de erro na estimativa e igual intervalo de confiança (5% e 95%, respectivamente), chegou-se ao mesmo número de amostras negativas requeridas, 30 amostras. Da mesma forma que no caso anterior, uma vez que se dispunha de 35 amostras de referência negativas, optou-se por trabalhar com este número de amostras a fim de aumentar a confiança dos resultados.

5.3.3 Otimização do ensaio

Para a realização dos testes de otimização, foram utilizadas quatro amostras de referência positivas, variando do fraco ao forte positivo, e uma amostra de referência negativa, conforme estabelecido por Jacobson (1998). Estas amostras foram divididas em três alíquotas de 0,2 ml e estocadas a -20°C . Uma alíquota de cada amostra era retirada do freezer e mantida a 4°C durante a realização dos experimentos e novamente congelada, de forma a garantir que todas fossem submetidas ao mesmo número de ciclos de congelamento/descongelamento.

Os testes piloto foram realizados com modificações nas seguintes variáveis, uma a cada momento: diluição do soro (1:20, 1:40 e 1:80), diluição do conjugado (1:100, 1:150 e 1:200) , tempos de incubação (25’ e 30’), procedimento de lavagem (três lavagens com solução salina tamponada de 5’ cada; duas lavagens com solução salina tamponada e uma lavagem com água destilada de 3’ cada; duas lavagens com solução salina tamponada e uma lavagem com água destilada de 5’ cada), baseado em informações presentes na literatura

sobre a aplicação desta técnica no diagnóstico de tripanossomose bovina por *T. vivax* (BARBIERI et al., 2016; CUGLOVICI et al., 2010; PLATT e ADAMS, 1976; SAMPAIO, 2013).

Foi avaliada a qualidade das lâminas obtidas mediante as modificações mencionadas e o protocolo foi definido, considerando os melhores resultados obtidos e a otimização do uso de recursos.

5.3.4 Protocolo de RIFI

- **Sensibilização das lâminas:** Primeiramente, as lâminas de RIFI foram sensibilizadas com 3 µL do antígeno de *T. vivax*, secas ao ar livre e fixadas com acetona gelada durante cinco minutos em geladeira e novamente secas ao ar livre em temperatura ambiente;

- **Diluição dos soros:** Os soros a serem testados, juntamente com os soros controle, positivo e negativo, foram diluídos em solução salina tamponada (PBS 1X), utilizando-se o fator de diluição 1:40. Com as lâminas já secas, foram adicionados 3 µL do soro diluído sobre cada região demarcada das lâminas com o antígeno fixado, sendo utilizado em cada lâmina um controle positivo e negativo;

- **1ª Incubação:** As lâminas foram incubadas em câmara úmida, em estufa a 37° C por 30 minutos;

- **Lavagem:** As lâminas foram lavadas duas vezes, por 5 min. com PBS 1X e uma vez com água destilada pelo mesmo tempo, em cuba de vidro e secas à temperatura ambiente;

- **Conjugado:** A cada região demarcada da lâmina foram acrescentados 3 µL do conjugado anti-IgG de Bovino (FITC) (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), marcado com isotiocianato de fluoresceína (AbD®, Serotec, Oxford, Inglaterra) diluído ao título 1:150 em PBS acrescido de azul de Evans 0,04%;

- **2ª Incubação:** As lâminas foram novamente incubadas por 30 min a 37° C, lavadas e deixadas secar como descrito anteriormente na etapa de lavagem;

- **Leitura:** Finalmente, as lâminas foram cobertas com glicerina tamponada a pH 8,0 e sobrepostas por uma lamínula 24 mm x 60 mm, sendo a leitura realizada em microscópio de imunofluorescência epifluorescente (Olympus® BX41TF, Olympus

Corporation, Tokyo, Japão) com aumento de 200X e 400X, examinando-se todos os campos da circunferência.

5.3.5 Repetibilidade

Para avaliação da repetibilidade da RIFI foram utilizadas três amostras de referência; sendo uma forte positiva, uma fraca positiva e uma negativa. De cada uma, foram produzidas 15 alíquotas e todas foram avaliadas pela técnica de RIFI em cinco diferentes corridas, realizadas por dois operadores, totalizando dez corridas do ensaio (JACOBSON, 1998).

Para garantir que todas as amostras fossem submetidas ao mesmo número de ciclos de congelamento/descongelamento, e que a avaliação fosse cega; cada operador recebeu alíquotas já organizadas para cada corrida, identificadas por números aleatórios, sem repetições, sendo estas estocadas a -20°C. O responsável pela identificação das amostras não participou das análises.

5.3.6 Sensibilidade analítica

Foi analisada a sensibilidade analítica relativa da RIFI, em comparação ao ELISA de antígeno bruto. Para isso, quatro amostras de referência positivas foram diluídas em uma série de diluições de log₂ e analisadas por ELISA, até negatização. Essa fase da pesquisa foi desenvolvida em colaboração com o Departamento de Patologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP – Campus Jaboticabal).

Alíquotas das mesmas amostras foram diluídas da mesma forma e analisadas por meio da RIFI. A sensibilidade das duas técnicas foi comparada, seguindo as orientações de Jacobson (1998).

5.3.7 Especificidade analítica

Para determinação da especificidade analítica da RIFI, foram testadas amostras de soro de animais em que foram diagnosticadas infecções por patógenos sanguíneos que também afetam população alvo e poderiam gerar reações cruzadas na RIFI. Para isso, foram analisadas amostras de soro positivas para os seguintes hematozoários: quatro amostras de *A. marginale*, três amostras de *B. bovis*, quatro amostras de *B. bigemina* e duas amostras de *T. evansi*; oriundas do banco de soros do laboratório Protovet/ICB-UFMG.

Entre estas amostras, foram introduzidas também sete amostras de referência positivas de *T. vivax* e todas foram identificadas com números aleatórios. O responsável pela organização das amostras não participou da realização do ensaio.

5.3.8 Sensibilidade e especificidade diagnósticas

Para definição desses dois parâmetros, as 70 amostras de referência, sendo 35 positivas e 35 negativas, foram analisadas pela técnica de RIFI seguindo rigorosamente o protocolo descrito anteriormente. As amostras foram analisadas às cegas, identificadas por meio de códigos.

5.3.9 Reprodutibilidade

Para essa avaliação, 10 amostras variando do forte positivo ao negativo foram divididas em cinco alíquotas, cada. Cada alíquota foi analisada pela técnica de RIFI, conforme o protocolo definido, no Laboratório de Leishmanioses/ICB-UFMG e os resultados foram comparados àqueles obtidos empregando-se igual protocolo no Laboratório Protovet/ICB-UFMG (JACOBSON, 1998). O mesmo operador realizou os testes em ambos os laboratórios.

5.3.10 Análises estatísticas de validação da RIFI

Para definição de repetibilidade e reprodutibilidade, calculou-se o índice Kappa segundo Falotico e Quatto (2010). O intervalo de 95% de confiança do índice Kappa corrigido foi calculado por reamostragem *bootstrap* não-paramétrica (Quatto e Ripamonti, 2014).

Os valores de especificidade, sensibilidade foram calculados segundo Altman e Bland (1994a;b).

Para a análise de sensibilidade analítica, foi ajustado um modelo de regressão logística com duas variáveis explicativas, grupo e diluição, incluindo a interação entre essas duas variáveis. Esse modelo testou a diferença na probabilidade de se encontrar uma amostra positiva, sendo que esta probabilidade foi chamada de “positividade”. Os valores preditos foram plotados em um gráfico e os valores de diluição foram extraídos de cada grupo, quando a positividade média foi igual a 0,9; 0,7; 0,5; 0,3 e 0,1.

As análises estatísticas foram realizadas pelo software R, versão 3.4.2 (R Core Team, 2017).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Testes de viabilidade de *T. vivax*

6.1.1 Avaliação da adição de conservantes

Para comparar os efeitos dos diferentes conservantes analisados na viabilidade de *T. vivax*, isto é, a chance de encontrar uma amostra positiva no Woo, calculou-se o tempo onde a viabilidade era igual a 0,50, equivalente a 50% das amostras positivas, e este índice, foi chamado de T50, com intervalos de confiança de 95% (Tabela 1). O índice T50 tem a mesma interpretação do LD50, indicador de uso consolidado em estudos de farmacodinâmica (BRUNTON et al., 2012), mas ao invés da dose, o tempo é a variável no caso do T50. Assim, o valor de T50 para cada tratamento significa o tempo necessário para que 50% das amostras ficassem negativas, portanto, quanto maior o valor de T50, melhor o conservante avaliado.

Tabela 1 – Valores médios de T50 (IC95%) para cada um dos cinco tratamentos e para as três diferentes parasitemias avaliadas.

Tratamento	Níveis de parasitemia (nº de tripanossomos/ml de sangue)					
	7×10^3		7×10^4		7×10^5	
	T50	IC (95%)	T50	IC (95%)	T50	IC (95%)
Controle	21,9 ab	(20,1 - 23,7)	26,7 a	(25,2 - 28,2)	36,4 a	(33,6 - 39,2)
Glicose	21,7 ab	(19,5 - 23,9)	29,8 abc	(27,8 - 31,9)	49,2 bc	(44,7 - 53,6)
P+G	25,9 b	(24,3 - 27,5)	30,7 bc	(29 - 32,4)	51,9 c	(46,7 - 57,1)
Prolina	20,7 a	(18,5 - 22,9)	27,7 ab	(25,8 - 29,6)	42,6 ab	(38,9 - 46,2)
PSG	22,5 ab	(19,9 - 25)	31,6 c	(29,4 - 33,7)	45,6 bc	(41,9 - 49,3)

Para o primeiro nível de parasitemia avaliado, 7×10^3 tripanossomos/ml, o tratamento Prolina+Glicose apresentou T50 significativamente maior que o tratamento Prolina. Entretanto, quando comparado ao grupo Controle, bem como aos demais grupos (G e PSG), o tratamento Prolina+Glicose não elevou significativamente o T50 (Figura 5A).

Os resultados obtidos para o segundo nível de parasitemia avaliado, 7×10^4 tripanossomos/ml, indicam que tanto o tratamento Prolina+Glicose quanto o tratamento PSG, apresentaram um T50 significativamente maior que o do grupo Controle, apesar de não diferirem entre si. O tratamento Prolina+Glicose, não diferiu dos tratamentos Prolina e

Glicose; ao contrário do observado para o grupo PSG, que foi significativamente superior ao grupo Prolina, apesar de não diferir do tratamento Glicose.

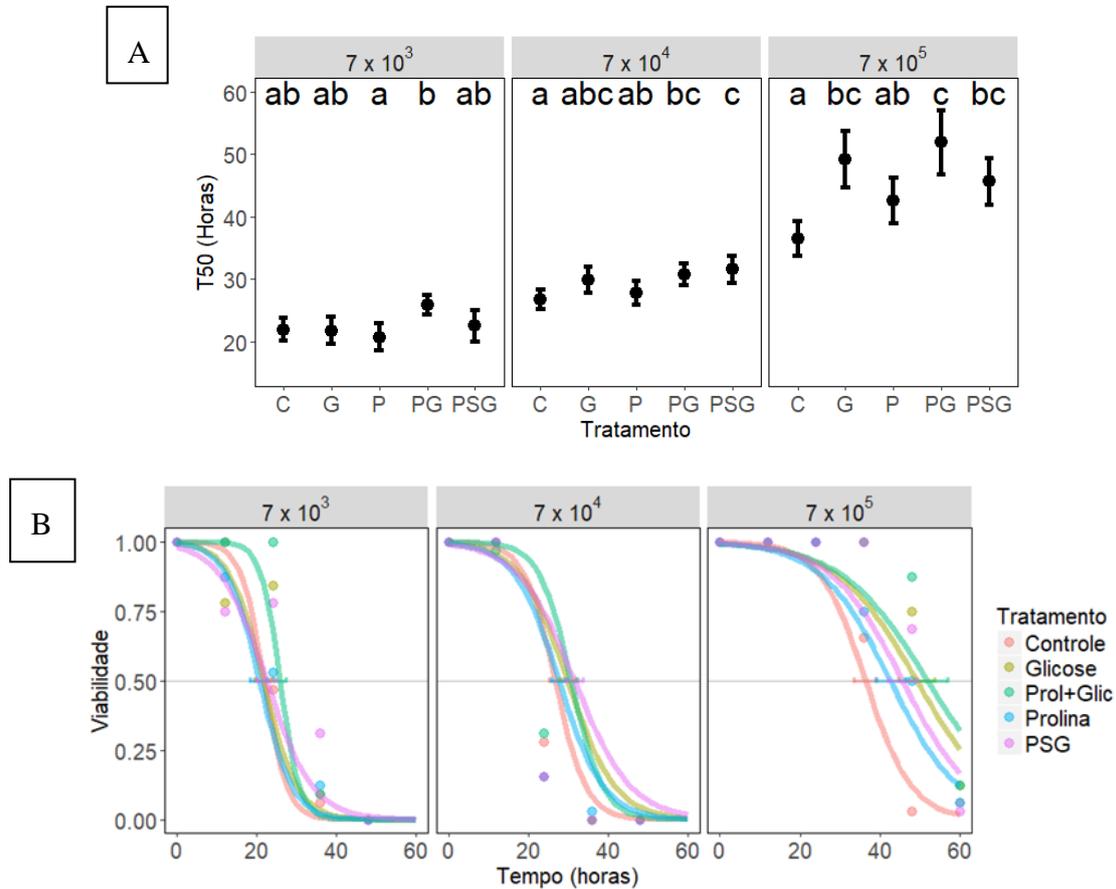


Figura 5A: Valores médios de T50 (IC95%) para cada um dos cinco tratamentos (Controle (C), Glicose (G), Prolina (P), Prolina+Glicose (PG) e PSG) para as três diferentes parasitemias avaliadas. As comparações podem ser realizadas apenas dentro da mesma parasitemia. Figura 5B: Curvas sigmóides da queda da viabilidade com o tempo e IC 95% do T50 para cada um dos cinco tratamentos. Curvas mais à direita significam que a queda da viabilidade está sendo adiada, ou seja, as amostras estão sendo preservadas por mais tempo.

Quando se avalia o terceiro nível de parasitemia, 7×10^5 tripanossomos/ml, os tratamentos Glicose, Prolina+Glicose e PSG elevaram significativamente o T50 em relação ao grupo Controle, apesar de não diferirem entre si. Prolina sozinha teve um desempenho igual ao Controle. Prolina+Glicose apresentou um resultado significativamente superior à Prolina sozinha.

O gráfico apresentando as curvas sigmóides da queda de viabilidade de *T.vivax* em função do tempo, para cada parasitemia avaliada, facilita a visualização dos efeitos dos tratamentos (Figura 5B). A linha horizontal que divide o gráfico ao meio representa o tempo em que 50% as amostras estavam viáveis, ou seja, apresentaram resultado positivo ao teste de

Woo. Assim, quanto mais à direita esta curva estiver, melhor o efeito promovido pelo conservante.

Avaliando-se esses resultados em conjunto, é possível perceber que Prolina+Glicose foi o tratamento que apresentou melhor resultado em relação à extensão do período de viabilidade das amostras, para as parasitemias avaliadas, entretanto seu efeito foi verificado de forma mais expressiva somente para a parasitemia mais elevada.

L-prolina é considerado uma importante fonte de carbono para tripanossomos (BRINGAUD et al., 2006). Experimentos anteriores mostraram a influência positiva da adição deste aminoácido, à concentração de 4 mM, na adesão e no crescimento de *T. vivax* em meios de cultura, sendo que, alterações na concentração de glicose não afetaram o crescimento do parasito (D'ARCHIVIO et al., 2011).

No presente estudo, contudo, a L-prolina isolada na concentração de 4mM não foi capaz de elevar a viabilidade de *T. vivax*, uma vez que em nenhuma das parasitemias analisadas, houve diferença significativa entre o grupo Prolina e o grupo Controle. Portanto, a associação à Glicose foi determinante para que a Prolina pudesse prolongar a viabilidade de *T. vivax*.

Os dados obtidos neste estudo permitiram ainda, a avaliação da positividade de amostras sem adição de nenhum conservante, em função do tempo. Isto pode ser visualizado gráfico (Figura 6) que representa as curvas sigmoides da queda da viabilidade de *T. vivax* no grupo Controle. Curvas mais à direita significam que os tripanossomos estão viáveis por mais tempo.

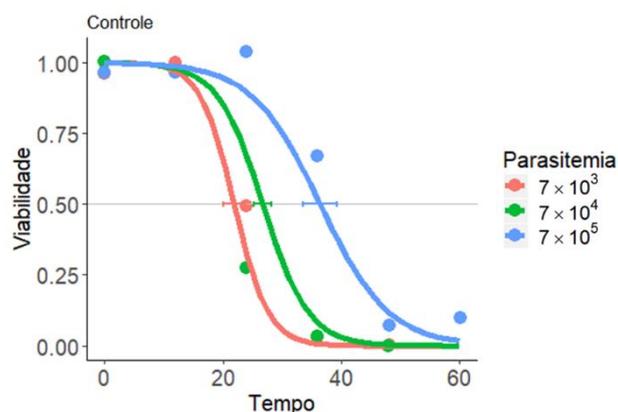


Figura 6: Curvas sigmoides da queda da viabilidade com o tempo (em horas) e IC 95% do T50 para o grupo Controle. Curvas mais à direita significam que os tripanossomos estão viáveis por mais tempo.

Apesar de a literatura consultada informar que o tempo decorrido entre a coleta de sangue e o processamento pela técnica de Woo ser de até seis horas (WOO, 1970), os resultados obtidos neste trabalho indicam que este tempo é bastante influenciado pelo nível de parasitemia do animal. Quanto mais elevada a parasitemia, maior o tempo de positividade das amostras, portanto maior poderá ser a janela de tempo entre a coleta do material e seu processamento.

Uma possível explicação para este fenômeno se relaciona ao fato de que, com o passar do tempo fora do organismo do hospedeiro, ocorre mortalidade dos parasitos (GREIF et al., 2015). Portanto, em amostras com elevado número de tripanossomos por ml, ainda que a mortalidade ocorra, a chance de encontrar tripanossomos vivos permanece por mais tempo, já que o número inicial de parasitos é maior.

É importante considerar, entretanto, que mesmo para a menor parasitemia avaliada, 7×10^3 tripanossomos/ml, houve aproximadamente 90% de positividade das amostras sem adição de nenhum conservante, após 12 horas da coleta. Decorridas aproximadamente 20 horas da coleta, 50% das amostras analisadas ainda permaneceram positivas para este nível de parasitemia.

Portanto, a utilização de Prolina+Glicose por veterinários e produtores rurais, como uma possível opção de conservante, a fim de aumentar o tempo para remessa a um laboratório, deve ser analisada com cautela. Levando-se em conta o elevado custo desses reagentes frente a seu efeito na elevação da viabilidade; considerando ainda que a viabilidade dos tripanossomos permaneceu detectável em metade das amostras sem adição de conservantes por aproximadamente 20 horas, mesmo na menor parasitemia avaliada, o uso de Prolina+Glicose não se apresenta como uma opção viável.

6.1.2 Avaliação da ação de desinfetantes sobre a viabilidade de *T. vivax* em seringa/agulha

A aplicação de ocitocina no momento da ordenha, por um lado, evita os transtornos gerados pela presença do bezerro no momento da ordenha, como maior mão-de-obra, tempo despendido e necessidade de instalações apropriadas (OLIVEIRA, 2010), por outra mão, representa um risco sanitário importante, sobretudo quando se compartilha seringas e agulhas. Este procedimento implica em risco de difusão de patógenos, entre eles *T. vivax*, já tendo sido

relatada sua associação a surtos de tripanossomose em rebanhos bovinos leiteiros no Brasil nos estados de Mato Grosso e Goiás (BARBOSA et al., 2015; BASTOS et al., 2013).

Os riscos de transmissão de patógenos relacionados à aplicação diária de ocitocina não se restringem a *T. vivax*, estendendo-se também a outros patógenos, estando relacionado ainda à ocorrência de flebites, além de causar desconforto ao animal, diminuindo seu bem-estar (BARROS, 2016). Apesar destas desvantagens e da não aprovação pela maioria dos médicos veterinários, o uso de ocitocina na rotina de ordenha tem sido uma prática cada vez mais adotada em rebanhos leiteiros como estratégia para estimular a ejeção do leite.

Diante disto, avaliou-se ação de desinfetantes sobre a viabilidade de *T. vivax* aplicando-se dois diferentes processos de desinfecção: por aspiração das soluções desinfetantes e por imersão da seringa/agulha nessas soluções por 30 minutos. O número de parasitos viáveis após a aplicação destes processos de desinfecção foi determinado pelo método de Brenner (Figura 7).

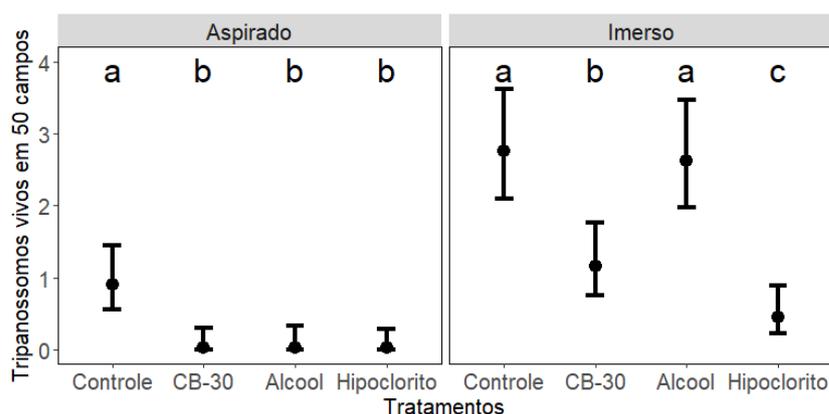


Figura 7: Média do número de tripanossomos vivos em 50 campos contados e seu respectivo intervalo de 95% de confiança para cada um dos quatro tratamentos para as duas técnicas avaliadas (nas colunas). Tratamentos que compartilham a mesma letra, não possuem diferenças significativas entre si a 5% de significância. As comparações podem ser realizadas apenas dentro da mesma técnica.

Os resultados da contagem de tripanossomos viáveis obtidos pela a técnica de aspiração do desinfetante permitem dizer que os três desinfetantes avaliados apresentaram um desempenho melhor que o Controle, não tendo sido observado nenhum parasito vivo na avaliação feita imediatamente (menos de um minuto) após o processo. Não houve diferença significativa entre os desinfetantes avaliados quando aplicado este processo de desinfecção, já que o número de tripanossomos vivos contados após o tratamento foi igual a zero, para os três desinfetantes testados.

Entretanto, quando a seringa acoplada à agulha foi apenas mantida imersa nas soluções desinfetantes durante 30 minutos, os desinfetantes CB-30 e hipoclorito tiveram um desempenho melhor que o controle. O álcool se apresentou como o pior desinfetante neste método de desinfecção, pois seu desempenho não diferiu significativamente do controle. Seu desempenho foi, ainda, significativamente inferior ao do CB-30 e do hipoclorito. O hipoclorito foi o melhor desinfetante neste processo de desinfecção, apresentando um desempenho melhor que todos os demais. É importante destacar, entretanto, que ao contrário do que foi observado no primeiro processo de desinfecção, nenhum dos desinfetantes avaliados eliminou completamente os parasitos através da técnica de imergir a seringa.

Quando a agulha e seringa contendo sangue contaminado foram mantidas apenas submersas dentro da solução desinfetante, é provável que a ação deste tenha ocorrido somente na porção distal da agulha, onde ocorreu o contato direto entre o sangue e a solução. Portanto, não havendo a penetração eficiente do desinfetante no interior da seringa e da agulha, tripanossomos permaneceram viáveis em seu interior, mesmo decorridos 30 minutos de imersão.

Ao avaliar a ação de desinfetantes sobre *T. vivax*, Madrid (2017) verificou que álcool 40% e hipoclorito de sódio 0,05% eliminaram todos os tripanossomos de forma imediata enquanto, CB-30 não foi capaz de eliminar prontamente os parasitos, apesar de promover sua redução gradual. Entretanto, essa autora trabalhou com CB-30 na diluição 1:2000, dez vezes menos concentrado que o presente trabalho. A metodologia aplicada por Madrid (2017) também difere, já que em seu experimento a solução desinfetante era colocada diretamente sobre a amostra de sangue contaminado na proporção de 2:1, realizando três repetições de cada análise. Apesar de esta metodologia permitir a avaliação do efeito da ação direta do desinfetante sobre o parasito, ela não leva em consideração a forma como o procedimento de desinfecção é realizado no campo.

A abordagem utilizada no presente trabalho permitiu comparar dois métodos de desinfecção de seringas e agulhas, além de comparar a ação de três desinfetantes de baixo custo e fácil acesso, a fim verificar qual deles seria eficiente para minimizar os riscos de transmissão de *T. vivax* pela via iatrogênica. É possível concluir, portanto, que o método de aspiração de desinfetante apresentou melhores resultados, apesar de não ter havido diferença entre os desinfetantes avaliados por esse método. O hipoclorito apresentou os melhores resultados no método de imersão sem, contudo, eliminar os parasitos completamente. Vale

ressaltar que o número de repetições realizado no presente estudo (30 repetições) permitiu boa confiabilidade dos resultados.

Os resultados observados evidenciaram que a adoção dessa simples prática de desinfecção de agulhas e seringas, aspirando e descartando o desinfetante após cada injeção intravenosa de ocitocina, durante o manejo de ordenha, poderia minimizar a chance de transmissão iatrogênica de *T. vivax*. Visto que os três desinfetantes avaliados apresentaram o mesmo desempenho neste método de desinfecção, a escolha do desinfetante a ser usado pelo produtor deverá levar em conta: hábito de uso, facilidade de aplicação e preço; mesmos critérios utilizados na escolha de desinfetantes para *pré-dipping* e *pós-dipping* (PEDRINI e MARGATHO, 2003).

É importante destacar, entretanto, que os resultados aqui apresentados se restringem ao patógeno avaliado, não podendo ser extrapolado a outros agentes patogênicos.

6.1.3 Avaliação da viabilidade de *T. vivax* em soluções de ocitocina

Ocitocina sintética para uso veterinário geralmente é comercializada na forma de solução injetável à concentração de 10UI/ml em veículo isotônico. Considerando a associação da utilização deste fármaco a ocorrência de surtos de tripanossomose (BARBOSA et al., 2015; BASTOS et al., 2013), levantou-se a hipótese de que a ocitocina poderia ser um bom meio para a manutenção de *T. vivax*, facilitando a difusão do parasito em rebanhos que fazem seu uso rotineiro.

Quando a amostra de sangue contaminado foi colocada em contato direto com a ocitocina nas duas proporções avaliadas, 1:1 e 1:200, houve redução significativa do número de parasitos vivos contados em relação ao controle, para todos os tempos avaliados (Figura 8).

Na proporção 1:200 a média de parasitos contados foi igual a zero, ou seja, nenhum parasito vivo foi encontrado nesse tratamento, em nenhum dos tempos avaliados. É importante considerar, entretanto, que a sensibilidade do exame realizado é baixa, sobretudo em uma elevada diluição do sangue. Também foi verificada ao exame, lise intensa das células sanguíneas, nesta diluição.

Os resultados mostram ter havido diferença significativa entre as duas diluições 1:1 e 1:200, apenas na avaliação imediata. Nos demais tempos analisados, as diluições não diferiram entre si. Entretanto, vale ressaltar que foram encontrados parasitos viáveis mesmo após 30 minutos de contato de sangue e ocitocina na diluição 1:1.

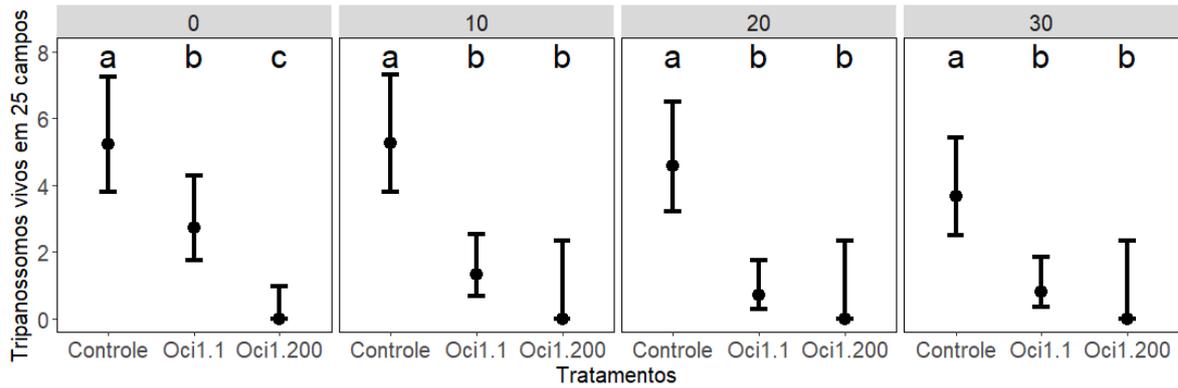


Figura 8: Média do número de tripanossomos vivos em 25 campos contados e seu respectivo intervalo de 95% de confiança para cada um dos três tratamentos para os quatro períodos de tempos avaliados (nas colunas). Tratamentos que compartilham a mesma letra, não possuem diferenças significativas entre si a 5% de significância. As comparações podem ser realizadas apenas dentro do mesmo período.

Apesar de os resultados aqui apresentados indicarem que a ocitocina reduz significativamente a viabilidade de *T. vivax*, ela permitiu a sobrevivência de parasitos, na diluição 1:1 por até 30 minutos. Portanto, em resíduos de sangue na seringa e agulha, mesmo na presença de ocitocina, é possível sobrevivência do parasito por tempo suficiente, para que ocorra a sua transmissão iatrogênica, caso nenhum procedimento de desinfecção seja adotado. Futuros estudos poderão ser realizados para avaliar tempos maiores a fim de determinar o tempo máximo de viabilidade de *T. vivax* nessas soluções.

6.2 Validação da Reação de Imunofluorescência Indireta- RIFI para o diagnóstico de *T. vivax*: estabelecimento de parâmetros e características do ensaio

6.2.1 Definição da finalidade pretendida

As características epidemiológicas da tripanossomose causada por *T. vivax* variam fortemente entre diferentes regiões. Da mesma forma, as estratégias de controle da doença são variáveis, e consequentemente, as características necessárias para que métodos de diagnóstico sejam eficientes na detecção da infecção (LUCKINS, 1992).

Assim, em áreas endêmicas, como nas regiões da África infestadas por tsé-tsé ou em áreas de alta prevalência, sem a presença do vetor biológico, como na planície Amazônica e Pantanal, os testes de baixa sensibilidade diagnóstica são suficientes, uma vez que o tratamento, quimioterápico ou a quimioprofilático, será administrado na base do rebanho (LUCKINS, 1992).

No entanto, em regiões não endêmicas, como ocorre na maior parte do Brasil, a terapia poderá, em alguns casos, ser administrada de forma individualizada para animais infectados. A abordagem terapêutica nestas condições deverá ser pensada levando-se em conta as condições epidemiológicas específicas que configurem o nível de exposição ao parasito e justifiquem ou não o tratamento de determinado lote ou categoria animal. Sendo assim, nestas condições, é importante a utilização de testes diagnósticos de alta sensibilidade (LUCKINS, 1992).

Os dados disponíveis na literatura sobre estudos que compararam a técnica RIFI a outras técnicas em áreas de baixa prevalência da infecção indicam que, apesar de apresentar uma sensibilidade inferior à da técnica de ELISA (SAMPAIO, 2013) e técnicas moleculares como PCR (ALVES et al., 2017); a técnica de RIFI foi consideravelmente mais sensível que a técnica de Woo (ALVES et al., 2017). Contudo, essas comparações devem ser realizadas com cautela, uma vez que as técnicas que se fundamentam em princípios diferentes: RIFI e ELISA pesquisam anticorpos enquanto PCR e Woo pesquisam o parasito, ou seu DNA.

Os testes sorológicos são eficientes na detecção de animais cronicamente infectados (CADIOLI et al., 2012; SAMPAIO et al., 2015) por isto são de grande importância para a realização de estudos epidemiológicos, como definição de índices a prevalência da infecção, avaliação de fatores de risco e estimativa de perdas econômicas (MADRUGA et al., 2006).

Entretanto, quando se deseja utilizar a técnica para diagnóstico individual e tomada de decisão sobre a adoção de quimioterapia, deve-se levar em consideração a persistência de anticorpos mesmo após infecções tratadas e curadas (DELAFOSSÉ et al., 2006; NANTULYA, 1990). Portanto, seu resultado, nestes casos, deverá servir como uma ferramenta auxiliar, devendo ser interpretado sempre em associação com achados clínicos e epidemiológicos, evitando assim custos desnecessários com tratamento.

6.2.2 Estudos de viabilidade e otimização

Diversos relatos estão disponíveis na literatura sobre a aplicação eficaz da RIFI como método de diagnóstico de *T. vivax* (ASHKAR e OCHILO, 1972; BAILEY et al., 1967; GUERRA et al., 2013; LUCKINS e MEHLITZ, 1978; PLATT e ADAMS, 1976; WILSON, 1969). A viabilidade da utilização da técnica para este fim foi também previamente avaliada no laboratório Protovet/ICB-UFMG, quando aplicada para o diagnóstico da infecção por *T. vivax* em bovinos naturalmente infectados, apresentando boa sensibilidade, porém baixa especificidade (CUGLOVICI, 2009).

Testes piloto foram conduzidos, utilizando amostras de referência e realizando modificações nas principais variáveis que poderiam influenciar os resultados: diluição do soro, diluição do conjugado, tempos de incubação e procedimento de lavagem. Assim, definiu-se o protocolo mais adequado, capaz de fornecer os melhores resultados com otimização do uso de recursos.

Quanto à diluição do soro, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o fator de diluição 1:40 em PBS 1X. O conjugado anti-IgG de Bovino na diluição 1:150 em PBS acrescido de azul de Evans 0,04%, apresentou melhor fluorescência sem, contudo, apresentar excesso de fluorescência inespecífica. O melhor tempo de incubação foi definido em 30 minutos e o processo de lavagem considerado mais adequado foi de dupla lavagem de 5 min. em PBS 1X seguida de uma lavagem com água destilada por igual período.

6.2.3 Repetibilidade e reprodutibilidade

Para determinação da concordância entre os resultados nos testes de repetibilidade e reprodutibilidade, foi utilizado o cálculo do índice Kappa, que é um método estatístico apropriado para este tipo de análise (Tabela 2). O valor deste índice varia de 0 (nenhuma

concordância) a 1 (concordância perfeita) (FLEISS et al., 2003). Landis e Koch (1977) caracterizaram diferentes faixas para os valores Kappa, segundo o grau de concordância que eles sugerem. Assim valores maiores que 0,75 representam excelente concordância. Valores situados entre 0,40 e 0,75 representam concordância mediana e valores abaixo de 0,40 representam baixa concordância.

Tabela 2 – Índices Kappa calculados e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%), para resultados obtidos na RIFI de replicatas de amostras de referência de *T. vivax* (positivas e negativas).

Teste	Tipo de Concordância analisada	Kappa	IC (95%)
Repetibilidade	Entre operadores	0,92	(0,84 – 1,00)
	Dentro de uma corrida	0,95	(0,83 – 1,00)
	Entre corridas	0,87	(0,72 - 1,00)
Reprodutibilidade	Entre Laboratórios	0,91	(0,78 – 1,00)

Os valores de Kappa obtidos no presente estudo ($\geq 0,87$) correspondem a uma excelente concordância entre os resultados, indicando ser a RIFI, um método com elevadas reprodutibilidade e repetibilidade. Não foram localizados, na literatura consultada, referências de pesquisadores que tenham determinado a repetibilidade e reprodutibilidade da RIFI empregada no diagnóstico de *T. vivax*.

É importante considerar que para obtenção dos resultados aqui apresentados, a RIFI foi realizada por operadores bem treinados e com experiência na utilização da técnica. Por ser um método qualitativo, existe certa subjetividade na interpretação dos resultados da RIFI. Assim, as características analíticas e diagnósticas do teste podem ser influenciadas por diferenças individuais de leitura. É essencial, portanto, que para a implantação do método na rotina laboratorial, especial atenção seja dada ao treinamento dos operadores que realizarão as análises, a fim de minimizar possíveis ocorrências de erros na leitura dos resultados.

6.2.4 Sensibilidade e especificidade analíticas

A sensibilidade analítica relativa da RIFI foi definida em relação à técnica de ELISA de antígeno bruto (Quadro 3).

Analisando-se os resultados obtidos pela avaliação de amostras pelas duas técnicas (Figura 9), é possível inferir que, no presente estudo, a sensibilidade analítica da RIFI foi

consideravelmente menor quando comparada ao ELISA, já que este último apresentou resultados positivos, em diluições mais elevadas. Em outras palavras, isto significa que a técnica de ELISA foi capaz de identificar os anticorpos IgG anti-*T. vivax*, em concentrações mais baixas, quando comparada à técnica de RIFI.

Quadro 3 – Resultados obtidos de quatro amostras de referência positivas analisadas em uma série de diluições pelas técnicas de RIFI e ELISA para diagnóstico de *T. vivax*.

Amostra	Teste	Diluição							
		1:40	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
1	ELISA	+	+	+	+	-	-	-	-
	RIFI	+	-	-	-	-	-	-	-
2	ELISA	+	+	-	-	-	-	-	-
	RIFI	+	-	-	-	-	-	-	-
3	ELISA	+	+	+	+	+	-	-	-
	RIFI	+	+	-	-	-	-	-	-
4	ELISA	+	+	+	+	-	-	-	-
	RIFI	+	-	-	-	-	-	-	-

Os símbolos (+) indicam resultado positivo na respectiva diluição e os símbolos (-) indicam resultado negativo.

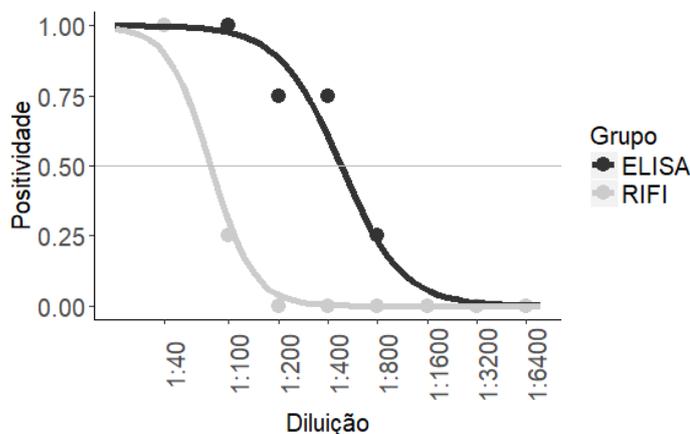


Figura 9: Curvas sigmóides da queda da positividade das amostras analisadas pelas técnicas de ELISA (linha preta) e RIFI (linha cinza) em função da diluição. Quanto mais à direita a curva, maiores as diluições com resultados positivos, portanto, maior a sensibilidade diagnóstica.

Ao ser comparada à técnica de ELISA, no diagnóstico de *T. vivax* em surto ocorrido no estado de São Paulo, a RIFI também demonstrou menor sensibilidade, diagnosticando 89,74% de bovinos positivos enquanto ELISA diagnosticou 93,09% (SAMPAIO, 2013).

Na avaliação às cegas de amostras controle positivo de *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina* e *T. evansi*, nenhuma das amostras testadas apresentou resultado positivo na RIFI, portanto, a especificidade analítica da técnica neste estudo foi de 100%.

Esse resultado está de acordo com o observado por Platt e Adams (1976) que, ao avaliarem RIFI para o diagnóstico de *T. vivax* na América do Sul, também observaram que não ocorreram reações cruzada com os outros hematozoários avaliados. Vale ressaltar que este estudo avaliou amostras controle positivo de *T. evansi*, que é filogeneticamente próximo de *T. vivax*, ambos pertencendo ao mesmo gênero e à Seção Salivaria. Apesar disto, as amostras de *T. evansi* resultaram todas negativas, não tendo havido, portanto, reação cruzada.

6.2.5 Sensibilidade e especificidade diagnósticas

Para definição de sensibilidade e especificidade, os resultados obtidos na avaliação de amostras de referência pelo teste de RIFI, foram associados ao real *status* de infecção do animal através de uma tabela dois-por-dois (Tabela 3). Assim, quando amostras de animais infectados apresentaram resultado positivo no teste, estes foram considerados verdadeiros positivos (VP) e os que resultaram negativos no teste foram considerados falsos negativos (FN). Por outro lado, as amostras de animais não infectados que apresentassem resultado positivo no teste seriam consideradas falsos positivos (FP) e as que apresentassem resultado negativo no teste, os verdadeiros negativos (VN).

A sensibilidade diagnóstica pôde então ser obtida dividindo-se o número de verdadeiros positivos pela soma dos verdadeiros positivos e falsos negativos. Nestas condições, a sensibilidade diagnóstica calculada para a RIFI no presente estudo foi de 0,829, ou seja, 82,9% de sensibilidade diagnóstica.

A especificidade diagnóstica do teste foi calculada pela divisão do número de verdadeiros negativos pela soma de verdadeiros negativos e falsos positivos, sendo, portanto de 1,0, ou seja, a RIFI, no presente estudo teve 100% de especificidade para diagnóstico de *T. vivax*.

Tabela 3 - Resultado da RIFI de *T. vivax* de amostras de referência positivas e negativas.

		<i>Status do animal em relação à infecção</i>	
		Infectado	Não-infectado
Resultado da RIFI	Positivo	29 (VP)	0 (FP)
	Negativo	6 (FN)	35 (VN)

Letras maiúsculas entre parênteses indicam a classificação do resultado do teste em relação ao real *status* do animal: (VP) verdadeiro positivo; (FP) falso positivo; (FN) falso negativo e (VN) verdadeiro negativo.

A especificidade diagnóstica de 100% verificada está de acordo com aquela encontrada por Platt e Adams (1976), quando avaliaram a RIFI para diagnóstico de *T. vivax* em animais experimentalmente infectados na América do Sul e também obtiveram 100% de especificidade.

Ao comparar a RIFI à técnica de PCR, entretanto, Cuglovici (2009) obteve uma especificidade de 25%. Isto pode ser explicado pela diferença entre o analito pesquisado nas duas técnicas, já que a RIFI pesquisa anticorpos (IgG), que podem persistir mesmo após a cura do animal, e a PCR pesquisa DNA do parasito. Essa característica faz com que a RIFI tenha valor limitado no diagnóstico individual da infecção.

A elevada sensibilidade diagnóstica obtida, de 82,9%, está de acordo com as informações encontradas na literatura (ALVES et al., 2017; ASHKAR e OCHILO, 1978; CUGLOVICI, 2009; PLATT e ADAMS, 1976; SAMPAIO, 2013) e confirmam que a RIFI é indicada para a realização de estudos epidemiológicos de *T. vivax* (MADRUGA, 2004; SAMPAIO et al., 2015) apresentando metodologia simples, baixo custo e elevado rendimento.

7 CONCLUSÃO

A associação de Prolina+Glicose foi é eficiente na extensão da viabilidade de *T. vivax* em amostras de sangue.

A ocitocina reduz a viabilidade de *T. vivax*, porém, permite sua sobrevivência por até 30 minutos, na 1:1.

Hipolcorito de sódio (0,5%), álcool 54°GL e CB-30 (0,15%) são eficientes na eliminação de *T. vivax* de seringas e agulhas, quando adotado o processo de “aspirar e descartar” o desinfetante.

A técnica de RIFI é válida para diagnóstico de *T. vivax*, apresentando elevadas repetibilidade, reprodutibilidade e especificidade analítica. Apresenta 82,9% de sensibilidade diagnóstica e 100% especificidade diagnóstica.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; JORGE, R. L. N.; et al. ASPECTOS HEMATOLÓGICOS DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma vivax* EM OVINOS. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1121–1127, 2008.
- ALVES, W. P.; CUGLOVICI, D. A.; FURTADO, L. F. V.; et al. Comparison of three methods for diagnosis of trypanosoma (*Duttonella*) *vivax* in cattle. **Genetics and Molecular Research**, 2017.
- ASHKAR, T.; OCHILO, M. The application of the indirect fluorescent antibody test to samples of sera and dried blood from cattle in the Lambwe Valley, South Nyanza, Kenya. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 47, p. 769–772, 1972.
- BAILEY, N. M.; CUNNINGHAM, M. P.; KIMBER, C. D. The Indirect Fluorescent Antibody Technique applied to dried blood, for use as a screening test in the diagnosis of human trypanosomiasis in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, 1967.
- BARBIERI, J. DE M.; BLANCO, Y. A. C.; BRUHN, F. R. P.; GUIMARÃES, A. M. Seroprevalence of *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, and *Babesia bovis* in dairy cattle. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 564-573, 2016.
- BARBOSA, J. C.; BASTOS, T. S. A.; RODRIGUES, R. A.; et al. Primeiro surto de tripanossomose bovina detectado no estado de Goiás, Brasil. **ARS VETERINARIA**, v. 31, n. 2, p. 100, 2015. Jaboticabal, SP.
- BARROS, J. P. N. **Metabolismo energético e protéico e perfil bioquímico hepático em vacas mestiças leiteiras submetidas ao uso diário de ocitocina durante a lactação**, 2016. Universidade Feredal Rural do Rio de Janeiro.
- BARRY, J. D. Capping of variable antigen on *Trypanosoma brucei*, and its immunological and biological significance. **Journal of cell science**, v. 37, p. 287–302, 1979.
- BARRY, J. D. Antigenic variation during *Trypanosoma vivax* infections of different host species. **Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 51, 1986.
- BASSI, P. B.; ARAÚJO, F. F. DE; GARCIA, G. C.; et al. Parasitological and immunological evaluation of cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Experimental Parasitology**, v. 185, p. 98–106, 2018.
- BASTOS, T. S. A.; LINHARES, G. F. C.; FREITAS, T. M. S.; SILVA, L. A. F.; CUNHA, P. H. J. Outbreak of Bovine Trypanosomiasis Unleashed After Improper. **ARS Veterinária**, v. 29, p. 63, 2013.
- BATISTA, J. S.; OLIVEIRA, A. F.; RODRIGUES, C. M. F.; et al. Infection by *Trypanosoma*

vivax in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: From acute disease outbreak to chronic cryptic infection. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 131-135, 2009.

BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. G.; et al. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 174-181, 2007.

BATISTA, J. S.; RODRIGUES, C. M. F.; GARCÍA, H. A.; et al. Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. **Veterinary Research**, v. 42:63, p. 1–7, 2011.

BATISTA, J. S.; RODRIGUES, C. M. F.; OLINDA, R. G.; et al. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: Epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, p. 73-80, 2012.

BONNET, J.; BOUDOT, C.; COURTIUUX, B. Overview of the Diagnostic Methods Used in the Field for Human African Trypanosomiasis: What Could Change in the Next Years? **BioMed Research International**, p. 1–10, 2015.

BOSSCHE, P. VAN DEN; CHIGOMA, D.; SHUMBA, W. The decline of anti-trypanosomal antibody levels in cattle after treatment with trypanocidal drugs and in the absence of tsetse challenge. **Acta Tropica**, v. 77, p. 263–270, 2000.

BOULANGÉ, A.; PILLAY, D.; CHEVTZOFF, C.; et al. Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis. **Veterinary Parasitology**, v. 233, p. 32–38, 2017.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389–396, 1962.

BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 1, p. 1–9, 2006.

BRUCE, D. Trypanosomes causing disease in man and domestic animals in Central Africa. **The British Medical Journal**, p. 91–97, 1915.

BUZA, J. J.; LOGAN-HENFREY, L.; ANDRIANARIVO, A. G.; WILLIAMS, D. J. L. Rise in erythropoietin concentrations in experimental *Trypanosoma congolense* infection of calves. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, n. 4, p. 343–356, 1995.

CADIOLI, F. A. B.; BARNABÉ, P. A.; MACHADO, R. Z.; et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 118–124, 2012.

CADIOLI, F. A.; FIDELIS JUNIOR, O. L.; SAMPAIO, P. H.; et al. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. **Veterinary Parasitology**, v. 214, p. 174–177, 2015.

CARVALHO, A. U.; ABRÃO, D. C.; FILHO, E. J. F.; PAES, P. R. O.; RIBEIRO, M. F. B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 769–771, 2008.

CHITANGA, S.; MARCOTTY, T.; NAMANGALA, B.; et al. High prevalence of drug resistance in animal trypanosomes without a history of drug exposure. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, 2011.

CUGLOVICI, D. A. **Surto por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro em Minas Gerais: aspectos epidemiológicos e clínicos**, 2009. Universidade Federal de Minas Gerais.

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

D'ARCHIVIO, S.; MEDINA, M.; COSSON, A.; et al. Genetic engineering of trypanosoma (*dutonella*) *vivax* and in vitro differentiation under axenic conditions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. 1–12, 2011.

DAGNACHEW, S.; BEZIE, M.; TEREFE, G.; et al. Comparative clinico-haematological analysis in young Zebu cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 24, p. 1–9, 2015.

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

DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Animal Trypanosomiasis in South America Current Status, Partnership, and Information Technology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **Anais...** p.199–212, 2000.

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

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 (4), p. 315–321, 1996.

DINIZ, R. S. **Validação de métodos laboratoriais aplicados ao diagnóstico de doenças dos animais**, 2013. Universidade Federal de Minas Gerais.

FIDELIS JUNIOR, O. L.; SAMPAIO, P. H.; MACHADO, R. Z.; et al. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal**, v. 25, n. 1, p. 69–81, 2016.

FRANGE, R. C. C. **Tripanossomiase em vacas na microrregião de Uberaba - MG: Estudo soroepidemiológico e relato de surto**, 2013. Universidade de Uberaba.

GALIZA, G. J. N.; GARCIA, H. A.; ASSIS, A. C. O.; et al. 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.

GARCIA, H. A.; RAMÍREZ, O. J.; RODRIGUES, C. M. F.; et al. *Trypanosoma vivax* in water buffalo of the Venezuelan Llanos: An unusual outbreak of wasting disease in an endemic area of typically asymptomatic infections. **Veterinary Parasitology**, v. 230, p. 49–55, 2016.

GARCIA, H. A.; RODRIGUES, A. C.; RODRIGUES, C. M.; et al. Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 210, 2014.

GREIF, G.; RODRIGUEZ, M.; REYNA-BELLO, A.; ROBELLO, C.; ALVAREZ-VALIN, F. Kinetoplast adaptations in American strains from *Trypanosoma vivax*. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 773, p. 69–82, 2015 2015.

GUERRA, N. R.; MONTEIRO, M. F. M.; SANDES, H. M. M.; et al. Detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de Imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, p. 1423–1426, 2013.

GUERRA, R. D. M. S. N. D. C.; FEITOSA JÚNIOR, A. B.; SANTOS, H. P.; ABREU-SILVA, A. L.; SANTOS, A. C. G. DOS. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. May 2014, p. 833–835, 2008.

GUIMARÃES, J. D.; ALVES, N. G.; COSTA, E. P. DA; et al. Eficiências Reprodutiva e Produtiva em Vacas das Raças Gir, Holandês e Cruzadas Holandês x Zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 641–647, 2002.

HOARE, C. A. **The trypanosomes of mammals. A zoological monograph**. Blackwell Scientific Publications, 5 Alfred Street, Oxford., 1972.

HURTADO, O. J. B.; CASTRO, P. D. J.; GIRALDO-RÍOS, C. Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 54–59, 2016.

JACKSON, A. P.; BERRY, A.; ASLETT, M.; et al. Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 9, p. 3416–3421, 2012.

JACOBSON, R. H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 17, p. 469-486, 1998.

JONES, T. W.; DÁVILA, A. M. Trypanosoma vivax--out of Africa. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 2, p. 99–101, 2001.

KATENDE, J. M.; MUSOKE, A. J.; NANTULYA, V. M.; GODDEERIS, B. M. A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis. **Tropical medicine and parasitology**, v. 38, n. 1, p. 41—44, 1987.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data Published by: International Biometric Society Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2529310>. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.

LANHAM, S. M.; GODFREY, D. G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. **Experimental Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 521–534, 1970.

LEJON, V.; REBESKI, D. E.; NDAO, M.; et al. Performance of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies against T. congolense and T. vivax in goats. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 2, p. 87-95, 2003.

LINHARES, G F C; DIAS-FILHO, F. C. F.; FERNANDES, P R; DUARTE, S. C. Tripanossomíase Em Bovinos No Município De Formoso Do Araguaia, Tocantins (relato de caso). **Ciência ANimal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 455–460, 2006.

LUCKINS, A. G. Methods for diagnosis of trypanosomiasis in livestock. **World animal review**, v. 70, p. 15–20, 1992.

LUCKINS, A. G.; MEHLITZ, D. Evaluation of an Indirect Fluorescent Antibody Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and quantification of immunoglobulins in the diagnosis of bovine trypanosomiasis. **Tropical Animal Health and Production**, v. 10, p. 149–159, 1978.

MADRID, D. M. C. **Avaliação da ultraestrutura e ação de desinfetantes em Trypanosoma vivax (Ziemann, 1905)**, 2017. Universidade Federal de Goiás.

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

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; CAVALCANTE-GOES, G.; et al. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for Trypanosoma vivax antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 801-807, 2006.

MANNA, P. T.; BOEHM, C.; LEUNG, K. F.; NATESAN, S. K.; FIELD, M. C. Life and times: Synthesis, trafficking, and evolution of VSG. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 5, p. 251-258, 2014.

MELO, S. A.; BARROS, A. C. E.; COSTA, F. B.; et al. Bovine Trypanosomiasis an Emerging Disease in Maranhão State–Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 7, p. 853-856, 2011.

MENESES, R. M. **Tripanossomose bovina em Minas Gerais, 2011: soroprevalência e fatores de risco**, 2016. Universidade Federal de Minas Gerais.

MORRISON, L. J.; VEZZA, L.; ROWAN, T.; HOPE, J. C. Animal African Trypanosomiasis: Time to Increase Focus on Clinically Relevant Parasite and Host Species. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 599-607, 2016.

MURRAY, M.; MAX, W. M.; MORRISON, W. I.; MCINTYRE, W. I. M. Trypanosomiasis in N'Dama and Zebu cattle. An experimental investigation of susceptibility to *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense* and mixed infections. 1979.

MURRAY, M.; MURRAY, P. K.; MCINTYRE, W. I. M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 4, p. 325–326, 1977.

NANTULYA, V. M. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 9, n. 2, p. 357–367, 1990.

OIE. *Trypanosoma Evansi* Infection (Surra). **OIE Terrestrial Manual 2013**. p.1–15, 2013.

OIE. Principles and methods for the validation of diagnostic tests for infectious diseases applicable to wildlife. **OIE Terrestrial Manual - Validation Recommendations**. p.21, 2014a.

OIE. Selection and use of reference samples and panels. **OIE Terrestrial Manual - Validation Recommendations**. p.9, 2014b.

OLIVEIRA, L. H. **Manejo de ordenha sobre o desempenho produtivo e reprodutivo de vacas F1 Holandês-Gir**, 2010. Universidade Federal de Minas Gerais.

OSÓRIO, A. L. A. R.; MADRUGA, C. R.; DESQUESNES, M.; et al. *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World -A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 1–13, 2008.

PEDRINI, S. C. B.; MARGATHO, L. F. F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 391–395, 2003.

PEREGRINE, A. S. Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 54, n. 1–3, p. 223–248, 1994.

PILLAY, D.; IZOTTE, J.; FIKRU, R.; et al. Trypanosoma vivax GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e78565, 2013.

PIMENTEL, D. S.; RAMOS, C. A.; RAMOS, R. A. N.; et al. First report and molecular characterization of Trypanosoma vivax in cattle from state of Pernambuco, Brazil. **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.

RADWANSKA, M.; MAGEZ, S.; MICHEL, A.; et al. Comparative analysis of antibody responses against HSP60, invariant surface glycoprotein 70, and variant surface glycoprotein reveals a complex antigen-specific pattern of immunoglobulin isotype switching during infection by Trypanosoma brucei. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 848–860, 2000.

RODRIGUES, C. M.; BATISTA, J. S.; LIMA, J. M.; et al. Field and experimental symptomless infections support wandering donkeys as healthy carriers of Trypanosoma vivax in the Brazilian Semiarid, a region of outbreaks of high mortality in cattle and sheep. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 564, 2015.

RODRIGUES, C. M. F.; OLINDA, R. G.; SILVA, T. M. F.; et al. Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with Trypanosoma vivax from the Brazilian semi-arid region. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1-2, p. 146-153, 2013.

SAMPAIO, P. H. **Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados pelo Trypanosoma vivax**, 2013. Universidade Estadual Paulista.

SAMPAIO, P. H.; JUNIOR, O. L. F.; MARQUES, L. C.; et al. Acute-phase protein behavior in dairy cattle herd naturally infected with Trypanosoma vivax. **Veterinary Parasitology**, v. 211, n. 3-4, p. 141-145, 2015.

SEIDL, A.; DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Estimated Financial Impact of Trypanosoma vivax on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 269-272, 1999.

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

SILVA, A. S. DA; COSTA, M. M.; POLENZ, M. F.; et al. Primeiro registro de Trypanosoma vivax em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, 2009.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. Trypanosoma evansi e

Trypanosoma vivax–Biologia diagnóstico e controle, EMBRAPA. Corumbá MS, Brasil, 2002.

SILVA, R. A.; SILVA, J. A. DA; SCHNEIDER, R. C.; et al. Outbreak of trypanosomiasis due to Trypanosoma vivax (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 5, p. 561-562, 1996.

STIJLEMANS, B.; RADWANSKA, M.; TREZ, C. DE; MAGEZ, S. African trypanosomes undermine humoral responses and vaccine development: Link with inflammatory responses? **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 582, 2017.

TAYLOR, K. A. Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic? **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 219–240, 1998.

WHITELAW, D. D.; GARDINER, P. R.; MURRAY, M. Extravascular foci of Trypanosoma vivax in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. **Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 51, 1988.

WILSON, A. J. Value of the indirect fluorescent antibody test as a serological aid to diagnosis of glossina-transmitted bovine trypanosomiasis. **Tropical Animal Health and Production**, v. 1, n. 2, p. 89-95, 1969.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Acta Tropica**, v. 27, n. 4, p. 384–386, 1970.

YARO, M.; MUNYARD, K. A.; STEAR, M. J.; GROTH, D. M. Combatting African Animal Trypanosomiasis (AAT) in livestock: The potential role of trypanotolerance. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p. 43-52, 2016.