

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em especial aos professores, por todo o ensinamento transmitido neste período, e aos funcionários, pelos serviços prestados e grande ajuda em diversos momentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, que foi imprescindível para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Professor Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, pela dedicação, pelos ensinamentos e, principalmente, pelo exemplo que é para mim.

Ao Prof. Antônio Último de Carvalho que, mais que um colaborador, foi um grande colega de profissão, transmitindo-me grandes ensinamentos.

À Prof<sup>a</sup>. Daniella Castanheira Bartholomeu que, com sua experiência e enorme dedicação, teve fundamental participação na realização de grande parte deste trabalho.

Aos professores Lobão e Patarroyo, pela disposição em ajudar e por sua valiosa e respeitável contribuição.

Ao prof. Ricardo Fujiwara, pela enorme disposição em sempre ajudar.

Às meninas do laboratório, Julinha e Camila que, mais que colegas de profissão e colaboradoras, se tornaram grandes amigas.

Aos meus amigos de sala: Helen, Jailza, Ariadna, Paulinha, Luciana, Rízia, Diogo, Denílson e Edu, que viveram comigo os dias mais estressantes do mestrado, porém não menos agradáveis, graças à sua companhia.

Também às pessoas de fundamental importância em minha vida: Norinne, Juliana, Renata, Sydnei, Sílvia, Clarinha, Luís, Rízia, Luciano, Wander, Sheila, Lílian, Nayara, Vânia, Natasha, Tati, Leandro, pelo carinho e companheirismo.

Aos meus pais pelo carinho e amor dedicados. Aos meus irmãos, avós, tios, primos, e toda a família, que sempre me apoiaram, acreditando nas minhas escolhas e lutando ao meu lado.

Ao João Marcos que, com sua presença, tornou os dias difíceis em momentos doces e ternos.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais, Michal e Claiton, pelo maior e mais importante ensinamento que me transmitiram: o amor!

Aos meus irmãos, Elis e Arie, e a toda a minha família, por fazerem parte do que sou.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar os aspectos epidemiológicos e clínicos da infecção por *Trypanosoma vivax* em um rebanho leiteiro de Minas Gerais, além de realizar a caracterização morfológica e molecular do isolado. A amostra de *T. vivax* foi inoculada experimentalmente em um bezerro e um caprino esplenectomizados e, posteriormente, criopreservada em nitrogênio líquido. Estudos morfológicos e morfométricos foram realizados em formas tripomastigotas de esfregaços sanguíneos das fases aguda e crônica da infecção destes animais. O rebanho bovino leiteiro foi acompanhado durante o período de setembro de 2007 a outubro de 2008, realizando-se coletas de sangue para a determinação do volume globular (VG), da parasitemia pela técnica de Woo, sorologia e PCR, além de acompanhamento clínico e necropsias. Para o estudo sorológico, antígenos foram produzidos para Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) purificando-se os parasitos em gradientes de Percoll. O impacto econômico em decorrência da infecção por *T. vivax* no rebanho leiteiro foi estimado comparando-se os dados produtivos e reprodutivos antes e após o início do surto. Constatou-se a semelhança morfológica e morfométrica do isolado de *T. vivax* com os demais encontrados no Brasil, tendo sido confirmada a espécie por meio de seqüenciamento. A soroprevalência encontrada em setembro/2007 foi de 7,4% e, em outubro/2008, foi de 45,3%. A maior incidência observada foi em fevereiro/2008 (24,0%), fato atribuído ao aumento da população de moscas *Stomoxys calcitrans* na região. Foi observado aumento significativo do número de mortes de vacas leiteiras, redução da média de produção de leite e descarte de animais. A anemia foi a alteração mais relevante encontrada nos animais infectados, os quais apresentaram médias de VG mais baixas que os animais parasitologicamente negativos ( $p < 0,01$ ). A PCR mostrou ser a técnica mais sensível na detecção de baixas parasitemias, e a técnica de Woo e a determinação do VG, técnicas que podem ser utilizadas na identificação de animais durante a fase aguda da infecção em surtos de *T. vivax*. Trata-se do primeiro relato da ocorrência de *T. vivax* no estado de Minas Gerais.

Palavras-chave: *Trypanosoma vivax*, Técnica de Woo, sorologia, PCR, epidemiologia, Minas Gerais.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the clinical and epidemiological aspects of *Trypanosoma vivax* infection in a dairy herd of Minas Gerais State, in addition to performing the morphological and molecular characterization of the isolate. The sample of *T. vivax* was experimentally inoculated into a splenectomized calf and a goat, and subsequently cryopreserved in liquid nitrogen. Morphological and morphometric studies were performed to trypomastigote forms of blood smears from acute and chronic infection stages of these animals. The dairy cattle herd was accompanied during the period September 2007 to October 2008, where samples of blood were collected for determination packed cell volume (PCV), for Woo technique of parasitemia determination, serology, PCR, and clinical monitoring and necropsies. Antigens were produced for indirect immunofluorescence reaction (IFA) to serological study, purifying parasites in Percoll gradients. The economic impact resulting from infection by *T. vivax* in dairy cattle was estimated comparing the productive and reproductive data before and after the start of the outbreak. It was verified morphological and morphometric similarities of *T. vivax* with others isolates found in Brazil, and the specie was confirmed by sequencing. The seroprevalence was 7.4% in September/2007 and 45.3% in October/2008. The highest incidence was observed in February/2008 (24.0%), attributed to the population increasing of *Stomoxys calcitrans* flies in this region. It was observed significant deaths increase of dairy cows, milk production reduction and discard of animals. Anemia was the most important change found in infected animals, which showed averages of PCV lowest than parasitological negative animals ( $p < 0.01$ ). The PCR technique showed to be more sensitive in the detection of low parasitemia, and Woo technique and the determination of PCV were techniques that can be used to the identification of animals during the outbreaks acute phase of *T. vivax* infection. This is the first report of occurrence of *T. vivax* in Minas Gerais State.

Key-words: *Trypanosoma vivax*, Woo technique, serology, PCR, epidemiology, Minas Gerais.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países da América do Sul e anos em que foram relatados os primeiros casos de infecção por <i>Trypanosoma vivax</i> em bovinos.....	20
Figura 2. Morfologia e pontos utilizados na morfometria dos <i>Trypanosoma vivax</i> observados em esfregaços sanguíneos de bovino naturalmente infectado durante fase crônica, Igarapé – MG, 2007. Barra: 5 µm.....	36
Figura 3. Fotografia de esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido de dois bovinos naturalmente infectados com <i>T. vivax</i> , Igarapé – MG, 1000X. A: forma delgada da fase crônica; B: forma larga da fase aguda.....	44
Figura 4. Média de volume globular (VG) dos bovinos positivos e negativos pelo teste de Woo e/ou pela PCR da fazenda onde ocorreu surto de <i>T. vivax</i> em Igarapé - MG no período de setembro de 2007 a outubro de 2008. Diferenças estatísticas foram observadas entre os animais positivos e negativos, Qui-quadrado ( $p < 0,0001$ ).....	47
Figura 5. Frequência dos títulos de anticorpos anti- <i>T. vivax</i> em bovinos da fazenda de Igarapé, MG durante o período de setembro de 2007 a outubro de 2008.....	49
Figura 6. Alinhamento das seqüências clonadas da região intergênica do gene <i>spliced-leader</i> do isolado de <i>T. vivax</i> de Igarapé (MG) com isolado de Miranda (MS).....	50
Figura 7. Eletroforese de gel de agarose 1.5%, corado com brometo de etídio, fotografado sob luz ultravioleta, mostrando da esquerda para direita: (1) Marcador de peso molecular 100-pb DNA Ladder (Invitrogen); (2) controle positivo da reação (animal experimentalmente infectado com amostra de <i>T. vivax</i> ); (3) Controle Branco da reação; (4, 12 e 15) Animais PCR - positivos; (5 a 11, 13, 14, 16 e 18) Animais PCR - negativos; (18) Controle negativo da reação (animal negativo e procedente de área livre para <i>T. vivax</i> ).....	51
Figura 8. Produção média de leite conforme o ano dos partos (2006 a 2008) em propriedade rural de Igarapé, MG.....	53
Figura 9. Produção de leite (L/d) e retorno bruto/ dia (R\$) no rebanho bovino leiteiro de Igarapé, MG (preço por litro de leite de R\$0,70).....	53
Figura 10. Pico de produção de leite (Kg) conforme a ordem e ano de início das lactações.....	54
Figura 11. Sintomatologia clínica em vacas positivas parasitologicamente para <i>T. vivax</i> , acometidas por surto agudo em fazenda de exploração leiteira no município de Igarapé, MG. A: aborto; B: natimorto; C: intensa palidez de mucosa vaginal; D: vaca com baixa condição corporal.....	57

Figura 12. Achados macroscópicos em necropsias de vacas com infecção por *Trypanosoma vivax* em Igarapé, MG. A: líquido em cavidade abdominal (seta); B: hemolinfóides de tamanho aumentado (setas); C: pontos de hemorragia no coração (seta); D: áreas hemorrágicas e necróticas no fígado (setas); E: petéquias na bexiga (setas); F: edema traqueal (seta)..... 57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efetivos dos rebanhos de animais de grande porte em 31/12/2006, segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação.....	15
Tabela 2. Comparação entre as médias biométricas ( $\mu\text{m}$ ) do <i>Trypanosoma vivax</i> isolado de bovinos naturalmente infectados de Igarapé, MG durante as fases aguda e crônica do surto (2007).....	45
Tabela 3. Comparação entre as médias biométricas ( $\mu\text{m}$ ) do <i>Trypanosoma vivax</i> isolado de bovinos naturalmente infectados de Igarapé, MG (2007) e outros isolados no Brasil.....	45
Tabela 4. Soroprevalência e frequência de infecção patente (técnica de Woo) por <i>T. vivax</i> e volumes globulares (VG) dos 345 bovinos observados no período de setembro de 2007 a outubro de 2008 em Igarapé, MG.....	49
Tabela 5. Dados produtivos e reprodutivos antes e durante surto clínico de <i>T. vivax</i> em fazenda de exploração leiteira de Igarapé – MG – 2006 a 2008.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS & SIGLAS

<b>µl</b>	- Microlitro
<b>ml</b>	- Mililitro
<b>L</b>	- Litro
<b>Kg</b>	- quilograma
<b>ha</b>	- Hectare (10.000 metros quadrados)
<b>PCR</b>	- Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RIFI</b>	- Reação de Imunofluorescência Indireta
<b>ELISA</b>	- <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>Kdna</b>	- DNA cinetoplástico
<b>SL</b>	- gene <i>spliced-leader</i>
<b>EDTA</b>	- Ácido etilenodiaminotetracético
<b>g</b>	- gravidade
<b>°C</b>	- graus Celsius
<b>pb</b>	- pares de base
<b>PBS</b>	- <i>Phosphate buffer saline</i>
<b>Mm</b>	- Milimolar
<b>ng</b>	- Nanograma
<b>u</b>	- Unidade
<b>Dntp</b>	- Trisfosfato de desoxirribonucleosídeo
<b>VG</b>	- Volume globular
<b>min.</b>	- Minuto
<b>h</b>	- Hora
<b>N.I.</b>	- Índice nuclear
<b>K.I.</b>	- Índice cinetoplástico
<b>P.N.</b>	- Final da extremidade posterior do tripanosoma ao núcleo
<b>N.A.</b>	- Distância do núcleo ao final da extremidade anterior do tripanosoma
<b>P.K.</b>	- Final da extremidade posterior ao cinetoplasma do tripanosoma
<b>K.N.</b>	- Distância do cinetoplasto ao núcleo do tripanosoma

<b>L</b>	- Comprimento total do tripanosoma
<b>F</b>	- Comprimento do flagelo do tripanosoma
<b>ICB</b>	- Instituto de Ciências Biológicas
<b>UFMG</b>	- Universidade Federal de Minas Gerais
<b>CETEA</b>	- Comitê de Ética em Experimentação Animal
<b>VSG</b>	- glicoproteínas variáveis de superfície
<b>LB</b>	- linfócitos B
<b>LT</b>	- linfócitos T
<b>VPP</b>	- valor preditivo positivo
<b>VPN</b>	- valor preditivo negativo
<b>nt</b>	- nucleotídeos
<b>nr</b>	- não redundantes

## SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1. SITUAÇÃO DA BOVINOCULTURA NO BRASIL .....	14
1.2. TAXONOMIA & RELAÇÕES FILOGENÉTICAS .....	15
1.3. CICLO BIOLÓGICO & TRANSMISSÃO .....	16
1.4. DISTRIBUIÇÃO DAS TRIPANOSSOMÍASES NA AMÉRICA LATINA.....	18
1.5. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DAS TRIPANOSSOMÍASES .....	20
1.6. PATOFISIOLOGIA & SINAIS CLÍNICOS CAUSADOS POR <i>T. vivax</i> .....	22
1.7. MECANISMOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO .....	24
1.8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	26
1.8.1. PARASITOLÓGICO.....	26
1.8.2. TÉCNICAS MOLECULARES.....	27
1.8.3. SOROLÓGICO.....	29
1.9. TRATAMENTO & CONTROLE .....	30
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. OBJETIVO GERAL .....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
4. MATERIAL & MÉTODOS .....	34
4.1. LOCAL DE ESTUDO .....	34
4.2. ISOLAMENTO DA AMOSTRA DE <i>Trypanosoma</i> sp. ....	34
4.3. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS DO ISOLADO DE <i>Trypanosoma vivax</i> DA REGIÃO DE IGARAPÉ, MINAS GERAIS .....	35
4.4. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DO REBANHO BOVINO.....	36
4.4.1. ACOMPANHAMENTO CLÍNICO DO REBANHO & OBTENÇÃO DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS.....	36
4.4.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS .....	36
4.5. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	37
4.5.1. PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE <i>T. vivax</i> .....	37
4.5.2. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA <i>T. vivax</i> .....	39
4.6. TÉCNICA MOLECULAR .....	40
4.6.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	40
4.6.2. CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS & ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS .....	41
4.7. MEDIDAS PREVENTIVAS ADOTADAS PARA O CONTROLE DA TRIPANOSSOMÍASE NO REBANHO .....	42
4.8. AVALIAÇÃO DAS PERDAS ECONÔMICAS.....	42
4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	42
5. RESULTADOS .....	44
5.1. ESTUDO MORFOMÉTRICO DO ISOLADO DE <i>T. vivax</i> .....	44
5.2. INFECÇÃO PATENTE .....	46
5.2.1. TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS .....	46
5.2.2 VOLUME GLOBULAR.....	46
5.3. SOROLOGIA DO <i>T. vivax</i> NO REBANHO .....	48
5.3.1. SOROPREVALÊNCIA.....	48
5.3.2. INCIDÊNCIA.....	48

5.4. TÉCNICAS MOLECULARES – PCR & SEQUENCIAMENTO .....	50
5.5. TRATAMENTO COM ACETURATO DE DIMINAZENE.....	51
5.6. PERDAS ECONÔMICAS NO REBANHO .....	51
5.7. ACHADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS & DE NECROPSIA .....	55
6. DISCUSSÃO .....	58
6.1. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS .....	58
6.2. INFECÇÃO PATENTE .....	59
6.3. SOROLOGIA .....	60
6.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	62
6.5. SEQUENCIAMENTO .....	63
6.6. TRATAMENTO COM ACETURATO DE DIMINAZENE.....	64
6.7. EPIDEMIOLOGIA DO <i>T. vivax</i> NA PROPRIEDADE.....	65
6.8. SINTOMATOLOGIA CLÍNICA & ACHADOS DE NECROPSIA .....	68
7. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS .....	71
ANEXOS.....	83

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1. SITUAÇÃO DA BOVINOCULTURA NO BRASIL**

Detentor do segundo maior rebanho de bovinos no mundo (USDA, 2007), o efetivo brasileiro encontra-se disperso por todo o território nacional, havendo maior concentração na região Centro-Oeste do país, principalmente nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás. Minas Gerais exerce também grande importância na bovinocultura, mantendo 10,8% do efetivo brasileiro (Tabela 1).

A estimativa percentual do rebanho bovino nacional no ano de 2003 entre as cinco maiores regiões do Brasil mais expressivas aponta: Centro-Oeste, com 34,24% do rebanho nacional, Sudeste, com 21,11%, seguidos pelo Sul (15,27%), Nordeste (15,24%) e Norte (14,15%) (Ferraz e Figueiredo Jr, 2003).

Em 2006, o Brasil teve um crescimento de 12,9% na quantidade de carne bovina exportada em relação a 2005 (ALICE-WEB, 2007). Além disso, é o sexto maior produtor de leite de vaca do mundo, depois dos Estados Unidos, Índia, China, Rússia e Alemanha (FAO, 2006). A Região Sudeste é a maior produtora nacional, concentrando 38,4% do produto, e Minas Gerais é o principal estado produtor de leite, com 27,9% do total produzido. Segundo dados do IBGE (2006), 7,1 bilhões de litros da produção nacional vêm deste estado.

Tabela 1. Efetivos dos rebanhos de animais de grande porte em 31/12/2006, segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação

Grandes Regiões e Unidades da Federação	Efetivo dos rebanhos de animais de grande porte em 31.12 (cabeças)				
	Bovinos	Bubalinos	Eqüinos	Muares	Asininos
Brasil	205 886 244	1 156 870	5 749 117	1 386 015	1 187 419
<b>Sudeste</b>	39 208 512	115 494	1 515 764	280 193	46 156
Minas Gerais	22 203 154	38 059	865 340	174 533	35 918
Espírito Santo	2 119 309	672	72 575	15 371	1 747
Rio de Janeiro	2 095 666	5 405	105 014	15 870	2 153
São Paulo	12 790 383	71 358	472 835	74 419	6 338
<b>Centro-Oeste</b>	70 535 922	71 489	1 133 022	163 486	14 731
Mato Grosso do Sul	23 726 290	17 846	370 673	46 791	4 042
Mato Grosso	26 064 332	20 543	312 219	72 945	4 589
Goiás	20 646 560	32 200	445 130	43 590	6 030
Distrito Federal	98 740	900	5 000	160	70

Modificado de: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2006.

## 1.2. TAXONOMIA & RELAÇÕES FILOGENÉTICAS

*Trypanosoma* spp. compõe um grande grupo de hemoparasitos flagelados que infectam membros de todas as classes de vertebrados. Os membros deste gênero podem ser transmitidos pelos mais diversos vetores, tais como os invertebrados hematófagos (Hoare, 1972).

Os hemoflagelados pertencem à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida e, baseado no seu modo de transmissão e desenvolvimento nos vetores, Hoare (1972) e Losos (1986) dividiram o gênero *Trypanosoma* em duas seções: Salivaria e Stercoraria. A seção Stercoraria compreende as espécies que se desenvolvem no intestino posterior do inseto-vetor, são transmitidas pelas fezes deste e, portanto, possuem transmissão contaminativa (Hoare, 1957). Fazem parte desta seção os subgêneros *Schizotrypanum* (representado principalmente pela espécie *Trypanosoma cruzi*), *Herpetosoma* (*T. rangeli* e *T. lewisi*) e *Megatrypanum* (*T. theileri*).

Já as espécies da seção Salivaria são transmitidas pela glândula salivar do inseto-vetor, sendo esta transmissão do tipo inoculativa (Hoare, 1957; Silva *et al.*, 2002). Esta seção é

dividida em quatro subgêneros: *Dutonella* (espécie *T. vivax*), *Nannomonas* (espécies *T. congolense* e *T. simiae*), *Trypanozoon* (espécies *T. brucei*, *T. rhodesiense*, *T. gambiense*, *T. evansi* e *T. equiperdum*) e *Pycnomonas* (*T. suis*) (Hoare, 1972; Losos, 1986).

Admite-se que os tripanosomas transmitidos de forma contaminativa representem as formas mais primitivas e ancestrais, devido à correspondência de seu ciclo de vida com a de insetos flagelados (Hoare, 1957). As diferenças na susceptibilidade dos vetores à infecção também são evidências das relações filogenéticas entre os tripanosomas de mamíferos. No caso do *Trypanosoma cruzi*, praticamente 100% dos triatomíneos são infectados, enquanto a infecção de *Glossina* sp. é muito menor (Hoare, 1957).

### 1.3. CICLO BIOLÓGICO & TRANSMISSÃO

*T. vivax* é um protozoário pleomórfico, apresentando apenas a forma de tripomastigota na corrente sangüínea de seu hospedeiro vertebrado, onde se multiplica por fissão binária. Nessa forma, o parasito apresenta o corpo alongado e achatado, com extremidades afiladas e cinetoplasto pós-nuclear. O flagelo surge próximo ao cinetoplasto e emerge ao lado do corpo, correndo ao longo da membrana ondulante (Uilenberg e Boyt, 1998).

As formas sangüíneas são transmitidas diretamente do hospedeiro mamífero ao outro pela picada de insetos hematófagos ou por fômites (agulhas contaminadas com sangue) (Silva *et al.*, 2002). No continente africano, *T. vivax* é transmitido ciclicamente por moscas tsé-tsé<sup>1</sup> (*Glossina* sp.), as quais se infectam com as formas tripomastigotas sangüíneas, que se transformam em formas epimastigotas no esôfago e faringe do inseto. Estas formas migram para o canal alimentar do inseto-vetor, onde se multiplicam intensivamente. Em seguida, migram novamente em direção à hipofaringe para se desenvolverem em tripomastigotas, que se transformarão em formas infectantes – os tripomastigotas metacíclicos (Silva *et al.*, 2002).

No Novo Mundo, *T. vivax* não possui desenvolvimento cíclico em vetores potenciais, sendo transmitido apenas mecanicamente (Hoare, 1972). Na América do Sul é transmitido por

---

<sup>1</sup> A palavra tsé-tsé é originada da linguagem Tswana (Botswana) e significa “mosca que mata o rebanho”. Estas moscas estão restritas somente a África Tropical (Mattioli & Wilson, 1996).

moscas hematófagas como a *Stomoxys calcitrans* e tabanídeos (Silva *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstraram que nos períodos em que ocorrem picos populacionais destes dípteros, ou seja, nas épocas chuvosas, há maior risco de transmissão de tripanosomas (Otte *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2002).

Alguns carrapatos como *Hyalomma anatolicum anatolicum* e *H. aegyptium* também já foram apontados tanto como vetores mecânicos quanto biológicos de *T. theileri* (Herbert, 1964; Morzaria *et al.*, 1986). Lopez *et al.* (1979), por meio de transmissão experimental, verificaram a possibilidade de *Boophilus microplus* ser um potencial vetor de transmissão de *T. vivax*, porém isto não ficou bem estabelecido. Em Cuba, já foram apontadas como transmissoras de *T. vivax* nove espécies das famílias Culicidae, Ceratopogonidae, Simuliidae e Muscidae (Cordoves *et al.*, 1982). Ao contrário do que ocorre na África, a adaptação à transmissão mecânica restringiu a variação antigênica deste parasito, que está relacionada com sua patogenicidade (Jones e Dávila, 2001).

Os animais domésticos sensíveis à infecção por *T. vivax* são bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos. Equídeos, cães e suínos, assim como ratos, camundongos ou cobaios eram considerados refratários à infecção (Soltys e Woo, 1978). Porém, Levine (1973) reportou a ocorrência de *T. vivax* também em eqüinos. Em estudos recentes, têm-se encontrado suínos parasitados por *T. vivax* (Ng`ayo *et al.*, 2005; Simo *et al.*, 2006).

Ashcroft *et al.* (1959) ainda apontam o veado, o coelho silvestre e o porco selvagem como sendo reservatórios em potencial de *T. vivax* devido à sua resistência à doença, acompanhada de um longo período de parasitemia. Possivelmente, como resultado da co-evolução, os animais selvagens não são cometidos pela doença (Taylor, 1998). Alterações no meio ambiente acabam aumentando o contato entre animais selvagens e domésticos, o que causa uma modificação nos perfis dos ciclos de transmissão das doenças, acarretando então, a emergência ou re-emergência de doenças como as tripanossomíases (Lafferty, 1997).

#### 1.4. DISTRIBUIÇÃO DAS TRIPANOSSOMÍASES NA AMÉRICA LATINA

Na América do Sul, as espécies causadoras de tripanossomíase em animais domésticos são *Trypanosoma cruzi*, *T. theileri*, *T. equiperdum*, *T. evansi* e *T. vivax*, sendo os três últimos os mais patogênicos e de maior importância veterinária.

O primeiro relato de *T. theileri* no Brasil foi feito no estado de São Paulo por Carini, em 1911. Este tripanosoma é um parasito cosmopolita, encontrado em todos os continentes onde há presença de bovinos. Produz infecção latente em bovinos, tornando-os portadores sãos (Burgdorfer *et al.*, 1973). Apesar de considerado não patogênico, em algumas circunstâncias este hemoprotozoário pode apresentar potencial patogênico (Silva *et al.*, 2002).

De ampla distribuição geográfica, *T. evansi* é responsável por causar doença significativa em animais de áreas de clima tropical, especialmente na África e América Latina (Lun e Desser, 1995; Silva *et al.*, 2002). *T. evansi* é conhecido no Pantanal Mato-Grossense e na área subtropical da Argentina por causar o “Mal das Cadeiras”, tendo sido introduzido nestas regiões no século XVI por espanhóis assentados (Hoare, 1972; Seidl *et al.*, 1998; Herrera *et al.*, 2007). É uma doença enzoótica em eqüinos do Pantanal Mato-Grossense, onde assume grande importância econômica (Silva *et al.*, 1995) causando perda de peso, anemia, febre intermitente, fraqueza e edema dos membros pélvicos (Levine, 1973). Segundo Seidl *et al.* (1998), surtos de “Mal das Cadeiras” são decorrentes das enchentes sazonais que ocorrem na região do Pantanal. As formas tripomastigotas presentes na circulação de vertebrados são veiculadas por insetos hematófagos durante o repasto sanguíneo, sendo os tabanídeos e as moscas *Stomoxys* os principais transmissores (Silva *et al.*, 2002). *T. evansi* é também encontrado parasitando bovinos, quatis, cães, capivaras e búfalos, sendo os três últimos susceptíveis à doença, enquanto que os bovinos exercem papel de reservatório do parasito (Seidl *et al.*, 1998, Herrera *et al.*, 2004). Na Venezuela, a maioria das infecções por tripanosomas encontradas em eqüídeos e roedores silvestres é atribuída ao *T. evansi* (García *et al.*, 2006).

*Trypanosoma vivax* é transmitido ciclicamente por moscas tsé-tsé (*Glossina* spp) na África e Ásia (Silva *et al.*, 1999). Foi introduzido na América Latina pela importação de gado zebu

do Senegal para Guiana Francesa e Antilhas em 1830 (Leger e Vienne, 1919). Devido à sua alta capacidade de adaptação, passou a ser transmitido mecanicamente por moscas hematófagas como *Stomoxys calcitrans* e tabanídeos (Silva *et al.*, 2002), se espalhando assim por toda a América do Sul (Batista *et al.*, 2007). O primeiro relato deste tripanosomatídeo no Novo Mundo foi feito na Guiana Francesa por Leger e Vienne (1919), os quais observaram altas parasitemias em gado leiteiro, associadas à queda na produção, anemia, perda de peso e mortalidade. Posteriormente, outros autores relataram a existência deste hemoprotozoário em diversas partes da América do Sul (Figura 1) e Central e em algumas ilhas do Caribe (Meléndez *et al.*, 1993). Wells *et al.* (1977), em estudo sorológico, utilizando-se da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), encontraram anticorpos anti-*T. vivax* em rebanhos bovinos em regiões de diversos países, como em El Salvador (15%), na Costa Rica (23%), na Colômbia (48%), no Equador (23%), no Peru (14%), no Paraguai (40%) e no Brasil (54%), no estado do Mato Grosso.

Boulhosa (1946) fez o primeiro relato da ocorrência de *T. vivax* no Brasil, relatando a presença deste tripanosomatídeo em bovinos no estado do Pará. Anos mais tarde, no mesmo estado, Shaw e Lainson (1972) encontraram búfalos (*Bubalis bubalis*) parasitados por *T. vivax* nas imediações da cidade de Belém. Em 1995, Silva *et al.* (1996), realizando a técnica do microhematócrito por centrifugação e esfregaços sangüíneos da camada leucocitária, observaram a presença do parasito no sangue periférico de dez dos 29 bovinos estudados, relatando, então, um surto de tripanossomíase por *T. vivax* no norte da região do Pantanal, na fronteira entre Brasil e Bolívia. Três anos mais tarde, por meio de estudos morfológicos e biométricos, Silva *et al.* (1998) relataram o primeiro surto de *T. vivax* em bovinos na Bolívia, sendo atribuído aos bovinos importados do Brasil a fonte de infecção. As localidades mais afetadas na Bolívia são os departamentos de Santa Cruz e Beni, onde as condições climáticas propícias (chuva abundante e umidade) são favoráveis à manutenção das populações de tabanídeos (González *et al.*, 2003).

O primeiro relato da ocorrência de *T. vivax* no estado do Mato Grosso do Sul foi feito por Paiva *et al.* (1997), no município de Miranda. Posteriormente, Barbosa Jr *et al.* (2001) verificaram a presença deste tripanosomatídeo no mesmo estado, no município de Aquidauana.

Linhares *et al.* (2006) relataram a ocorrência de *T. vivax* no estado do Tocantins e, em 2007, Batista *et al.*, verificaram um surto desta tripanossomíase em bovinos leiteiros no Sertão da Paraíba, no qual morreram 11 de 130 animais adultos e 5 de 100 bezerros. Em 2008, Guerra *et al.* encontraram este tripanosoma parasitando bezerros no estado do Maranhão.

Carvalho *et al.* (2008) relataram um surto de *T. vivax* em bovinos leiteiros no município de Igarapé, região central do estado de Minas Gerais.

Na América do Sul, *T. vivax* é enzoótico e apresenta constantes aumentos e quedas em sua população, espalhando-se por novas áreas (Desquesnes *et al.*, 2008). Nos arredores da região do Pantanal há um equilíbrio enzoótico do parasito (Batista *et al.*, 2007). No Brasil, estudos conduzidos com animais naturalmente infectados têm demonstrado que *T. vivax*, na maioria das vezes, causa infecção crônica e assintomática em bovinos, búfalos e ovelhas, o que dificulta seu diagnóstico na maioria dos rebanhos (Batista *et al.*, 2007).



Figura 1. Países da América do Sul e anos em que foram relatados os primeiros casos de infecção por *Trypanosoma vivax* em bovinos.

### 1.5. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DAS TRIPANOSSOMÍASES

As doenças animais afetam tanto o desenvolvimento da produção agropecuária quanto o bem estar do homem, criando assim barreiras para o escape da pobreza em países em desenvolvimento (Perry *et al.*, 2002).

Nos rebanhos da África sub-Saariana, a tripanossomíase é a doença que causa maior perda na produtividade do rebanho, tendo significativo impacto econômico também em outras partes do mundo (Madruca, 1964; Taylor e Mertens, 1999). Para Peregrine (1994), as tripanossomíases constituem risco potencial para 500 milhões de bovinos, 100 milhões de búfalos e 12 milhões de camelos no Mundo. Os impactos econômicos causados por *T. vivax* na produção se devem ao amplo espectro de vetores e hospedeiros susceptíveis e à imunodeficiência dos animais, em sua maioria subnutrida (García *et al.*, 2006). Os sinais clínicos incluem perda progressiva de peso, queda de fertilidade e produção de carne, aborto, agalaxia e, eventualmente, morte (Delafosse *et al.*, 2006).

Em 1982, o comércio de quimioterápicos para o combate de tripanosomas, babesias e anaplasma no Brasil representou 2,9% do comércio de produtos veterinários. Em 1983, 539.883 frascos de quimioterápicos foram comercializados e, em 1984, 729.924 frascos, sendo o maior consumo na região sudoeste (Horn, 1984).

*T. vivax* também deve ser considerado um dos agentes etiológicos causadores de danos reprodutivos em bovinos e ovinos (Seidl *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004a; Batista *et al.*, 2008). Este tripanosomatídeo pode causar degeneração do hipotálamo, glândulas pituitárias e gônadas, ocorrendo alterações nas secreções e concentração plasmáticas de hormônios necessários para o processo reprodutivo dos animais. Nos machos, estas alterações acarretam a perda de libido, retardamento da puberdade e má qualidade do sêmen. Nas fêmeas pode ocorrer anestro temporário ou permanente, ciclos estrais anormais, morte fetal, distocia, abortamento, morte neonatal, além de efeitos patogênicos no feto e no recém nascido (Silva *et al.*, 2004a).

É difícil definir as perdas econômicas causadas por *T. vivax* devido à sua ocorrência concomitante com outros protozoários e outros agentes (Clarkson, 1976). Segundo Seidl *et al.* (1999), estas perdas poderiam exceder 160 milhões de dólares Pantanal brasileiro e nas planícies bolivianas, considerando que as regiões possuam 11 milhões de cabeças de gado com valor total estimado em mais de três bilhões de dólares.

## 1.6. PATOFISIOLOGIA & SINAIS CLÍNICOS CAUSADOS POR *T. vivax*

Animais com alta parasitemia apresentam febre, anemia, leucopenia, hipoglicemia e alta atividade sérica de AST (Batista *et al.*, 2007). A leucopenia é atribuída à redução na mielopoiese, podendo causar imunossupressão (Jain, 1986).

Ao exame de esfregaços sangüíneos corados com Giemsa observa-se anisocitose, policromasia e presença de corpos Howell–Jolly. No exame de microhematócrito e contagem em câmara de Neubauer, verifica-se acentuada queda nos valores de células vermelhas – indicativos da anemia (Silva *et al.*, 1999).

Apesar de sua natureza não ter sido completamente elucidada (Saror, 1979; Anosa e Kaneko, 1983), sabe-se que a anemia causada por *T. vivax* é atribuída à hemólise intra e extra-vascular, diminuição da eritropoiese e hemorragias (Saror, 1979). Constitui a maior causa de morbidade e mortalidade nas tripanossomíases bovinas, podendo ser usada como parâmetro para monitorar a intensidade da doença no rebanho (Andrianarivo *et al.*, 1995). A anemia por *T. vivax* é do tipo normocítica normocrômica, com tendência a se tornar macrocítica normocrômica (Saror, 1979). No estado do Pará, Láu (1988) observou anemia normocítica normocrômica em búfalos doentes deste tripanosoma e Silva *et al.* (1999), observaram anemia macrocítica hipocrômica em bovinos na região do Pantanal brasileiro e Bolívia, concluindo que nestas regiões a anemia tem sido a maior causa de mortalidade dos animais infectados com tripanosoma.

Os mecanismos envolvidos na patofisiologia da anemia são vários, tanto na hemólise extravascular, que ocorre primariamente no fígado e baço na fase inicial da infecção, quanto posteriormente, quando há uma hematopoiese insuficiente (Andrianarivo *et al.*, 1995). Um dos mecanismos também relacionados com a anemia está associado à secreção de neuramidase, que atua hidrolisando o ácido siálico, importante componente da superfície das hemácias (Esievo *et al.*, 1982). A remoção desta superfície é um processo idade-dependente que leva à remoção de células velhas por meio de fagocitose (Osório *et al.*, 2008). A quantidade de sialidase e a subsequente hemólise são proporcionais à quantidade de parasitos existentes no sangue do animal (Esievo *et al.*, 1990). Outro mecanismo descrito seria a ação de fosfolipases liberadas pelos parasitos mortos, gerando lipídeos que

alterariam as hemácias (Ilrad, 1983). Atualmente, há evidências que os mecanismos auto-imunes participam do processo anêmico do animal infectado devido à deposição de complexos imunes na superfície das hemácias. As alterações da superfície das hemácias pela ação das neuramidases, fosfolipases e proteases geram epítomos que são reconhecidos como estranhos, induzindo a produção de anticorpos. Além disto, o *T. vivax* gera anticorpos que reconhecem também epítomos nas hemácias dos bovinos (Okech *et al.*, 1996).

Podem ocorrer quadros de coagulação intravascular disseminada, conforme descrito por Welde *et al.* em 1989, no Quênia. Os animais deste estudo apresentaram melena, diminuição de 7,5 a 17% nos valores de volume globular, trombocitopenia e diminuição dos níveis de fibrinogênio e fibrina.

Batista *et al.* (2006), realizando-se infecção experimental de ovinos com *T. vivax* isolado de bovinos naturalmente infectados da Paraíba, encontraram como principais achados de necropsia linfadenopatia, hepatomegalia e presença de líquido nas cavidades peritoneal e pericárdica. Avaliando-se dois surtos por *T. vivax* ocorridos em bovinos provenientes do alto sertão da Paraíba, Batista *et al.* (2008) encontraram os mesmos achados macroscópicos descritos anteriormente, além de hidropericárdio e presença de petéquias e equimoses no pericárdio.

Os principais sinais clínicos encontrados em estudo conduzido por Silva *et al.* (1999) na região do Pantanal brasileiro e planícies da Bolívia foram lacrimejamento, palidez das mucosas, perda progressiva de peso, inapetência, diarreia e aborto durante o terceiro trimestre de gestação. Em 2007, Batista *et al.* descreveram sintomatologia nervosa em nove vacas provenientes do semi-árido da Paraíba, onde havia ocorrido um surto de tripanossomíase por *T. vivax* no ano de 2002. Ao exame histológico, estes animais apresentaram meningoencefalite e malácia, resultantes de lesões inflamatórias e degenerativas no cérebro causadas pelo parasito. O tratamento com aceturato de diminazene, droga de escolha no Brasil, não foi eficaz nestes animais, que tiveram recaída e morreram. As lesões nervosas causadas pelos tripanosomas podem estar associadas com a presença do parasito em tecidos nervosos e fluído cerebrospinal, alterações circulatórias causadas por êmbolos formados pelos parasitos, leucócitos e fibrina nos capilares e vênulas

do cérebro, reações auto-imunes, e ainda, apoptose de células endoteliais provenientes de veias do cérebro e cerebelo (Batista *et al.*, 2007).

### 1.7. MECANISMOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO

Devido à localização extracelular do tripanosoma, a resposta imune predominante é a humoral (Taylor, 1998). Uma vez instalada a infecção, o sistema imune do hospedeiro mamífero mobiliza as respostas celular e humoral para atacar o tripanosoma que, por sua vez, escapa mudando seus padrões antigênicos externos, conhecidos como glicoproteínas variáveis de superfície (VSG). As VSG's são novamente reconhecidas pelo sistema imune, e tal mecanismo de escape acaba por provocar ondas de alta e baixa parasitemia (Mattioli e Wilson, 1996). Os anticorpos de animais não susceptíveis à doença agem modificando a membrana dos parasitos, que ficam expostos à ação de lise pela interação complemento-anticorpo (Ferrante, 1985). A especificidade dos anticorpos aos epitopos expostos pelas VSG's é crucial no processo de fagocitose do parasito, além de neutralizarem tanto o parasito como os fatores hemolíticos, responsáveis pela anemia (Taylor, 1998). O sistema complemento participa do processo de fagocitose e lise do *T. vivax*, além de ter atividade regulatória na troca do isotipo de imunoglobulina (Taylor e Mertens, 1999). Participa, ainda, aumentando a ativação de linfócitos B (LB) devido à sua ligação aos receptores CR<sub>2</sub> de LB. Animais susceptíveis à infecção por *T. vivax* possuem baixos níveis séricos de complemento, o que prejudica a fagocitose e atividade regulatória do complemento (Nielsen *et al.*, 1978). Acredita-se que a deficiência de complemento e/ou IL-4 nestes animais contribua, ainda, dificultando a troca de imunoglobulinas da classe IgM para IgG1 (Naessens *et al.*, 2002).

Após a infecção pelo tripanosoma, ocorre uma ativação policlonal de LB, demonstrada pelo aumento no número destas células e da secreção de imunoglobulinas, principalmente IgM (Naessens *et al.*, 2002). Os níveis séricos de IgG podem ou não aumentar durante a infecção, dependendo da raça, estado de saúde e das condições ambientais em que o animal se encontra (Nielsen *et al.*, 1978). Os anticorpos que se ligam às moléculas de VSG's, produzidos durante a infecção, são protetores, uma vez que promovem a remoção dos parasitos, além de neutralizarem os produtos dos parasitos. Em animais tripanotolerantes, esta resposta é mais rápida e alta do que nos animais susceptíveis (Naessens *et al.*, 2002).

Em contraste à resposta contra VSG, os títulos de anticorpos contra antígenos não variantes diferem entre animais resistentes e susceptíveis, observando-se altos títulos de IgG1 em tripanotolerantes (Naessens *et al.*, 2002).

Os linfócitos T (LT) não exercem função importante no controle da parasitemia. Linfócitos T- $\gamma\delta$ , entretanto, secretam IFN- $\gamma$ , importante citocina no controle da parasitemia e de diversas patologias relacionadas. Comparando-se bovinos “nocauteados” para LT CD4<sup>+</sup> e normais, Naessens *et al.* (2002) observaram que a depleção de CD4<sup>+</sup> reduziu drasticamente os títulos de anticorpos tanto contra antígenos expostos à superfície variante quanto para antígenos não variantes. Tal diminuição sugere que as respostas geradas durante a infecção por tripanosoma são, na sua maioria, dependentes de LT. Realizando-se a depleção de CD8<sup>+</sup>, estes autores concluíram que tal subpopulação não influencia nem na sobrevivência do parasito nem na anemia.

Pode ser estabelecido um equilíbrio entre parasito e hospedeiro, que permanece clinicamente normal por um longo período (Schenk *et al.*, 2001). Este fenômeno, de origem genética e ambiental, é denominado tripanotolerância e pode variar ainda de acordo com a idade, estado nutricional, condições de estresse, infecções intercorrentes e cepas envolvidas (Van den Bossche e Rowlands, 2001). O fenômeno de tripanotolerância foi definido por Pagot, em 1974, como sendo uma aptidão racial em sobreviver, se reproduzir e produzir sob infecção por tripanosomas sem demonstrar sinais clínicos da doença (FAO, 1983). Este fenômeno foi observado pela primeira vez em 1906 por Pierre e, desde então, diversos estudos vêm sendo conduzidos em rebanhos domésticos da África (Mattioli e Wilson, 1996). Já se descreveu que as raças taurinas (*Bos taurus*) africanas N'Dama, Baoulé, Muturu, Dahomey e Lagune são menos acometidas por tripanossomíases do que as raças zebuínas (*Bos indicus*) e taurinas européias (Murray *et al.*, 1982; Uilenberg e Boyt, 1998; Osório *et al.*, 2008). Tal capacidade é resultado da longa exposição e sobrevivência dos animais em áreas infestadas por tsé-tsé no oeste da África (Naessens *et al.*, 2002). Uma vez infectadas, estas raças conseguem controlar sua parasitemia e valores de hematócrito (Mattioli e Wilson, 1996). Isso pode ser demonstrado pelo fato de taurinos da raça N'Dama possuírem maior concentração de ácido siálico na superfície de suas hemácias quando comparados aos zebuínos, necessitando assim de uma maior parasitemia para atingir o

mesmo nível de dano nestas células (Esievo *et al.*, 1990). As hemácias de N'Dama são mais resistentes à modificação ou remoção, além destes animais possuírem uma eritropoiese mais eficiente, o que compensa a destruição de eritrócitos (Naessens *et al.*, 2002). Outra característica de bovinos tripanotolerantes é que estes possuem uma resposta humoral secundária mais eficiente devido à participação do componente C3 do complemento no aumento da produção de células B de memória (Paling *et al.*, 1991). Porém, tanto as raças tripanotolerantes taurinas quanto raças susceptíveis zebuínas são altamente susceptíveis à infecção por cepas hemorrágicas de *T. vivax* (Taylor, 1998). Naessens *et al.* (2002) observaram que a resistência natural dos animais ao tripanosoma compreende dois mecanismos distintos: um mecanismo inato, que age controlando a parasitemia, e outro, que envolve o tecido hematopoético e age limitando a anemia. Em animais tripanotolerantes o controle dos parasitos é feito pela resposta imune inata, independentemente da resposta imune adquirida. A natureza deste mecanismo inato não é bem conhecida, porém, está associado a um fator tripanolítico sérico. Já nos animais susceptíveis, anticorpos e LT CD4+ são de fundamental importância no controle dos tripanosomas.

## **1.8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Para que medidas de controle das tripanossomíases sejam aplicadas, é necessário que se conheça a prevalência e a difusão da infecção, possibilitando, assim, a aplicação das medidas de controle quimioterápicas e quimioprofiláticas necessárias (Luckins e Mehlitz, 1978; Snow e Rawlings, 1999). O diagnóstico das tripanossomíases pode ser feito por métodos parasitológicos, imunológicos ou de biologia molecular.

### **1.8.1. PARASITOLÓGICO**

O método parasitológico é o mais utilizado no Brasil para o diagnóstico das infecções por *T. vivax* em rebanhos de bovinos (Madruca, 2004).

A partir de esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa, a estrutura geral das formas sangüneas pode ser observada por microscopia óptica. As espécies de *Trypanosoma* são então diferenciadas pelo tamanho, forma do corpo, posição do núcleo e do cinetoplasto e grau de desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo (Silva *et al.*, 2002).

Esfregaços sangüíneos úmidos também podem ser preparados com 25 µl de sangue (Wilson, 1969). Entretanto, durante a infecção ocorrem flutuações da parasitemia, tornando difícil o encontro de parasitos em esfregaços sangüíneos (Madruga *et al.*, 2006).

A infecção por *T. vivax* pode ser superaguda, aguda ou crônica. Na primeira, encontra-se parasitemia alta e persistente, associada à morte do animal. Na segunda, encontra-se grande número de parasitos no sangue periférico, e na fase crônica ocorre baixa parasitemia, que se estende por vários meses (Madruga, 1964).

Algumas técnicas de concentração podem ser empregadas no diagnóstico de tripanosomas, tal como a técnica do microhematócrito de Woo (1970), mais comum dentre os exames parasitológicos empregados – entretanto com baixa sensibilidade na fase crônica da doença (Masake *et al.*, 1994). Tal técnica consiste no preenchimento de dois tubos capilares de vidro para cada amostra de sangue, centrifugação por cinco minutos e leitura destes tubos em microscópio ótico (cinco campos sob imersão em óleo) para visualização das formas sangüíneas, que se concentram entre o plasma e a camada leucocitária. Quebrando-se o capilar entre a camada líquida e a camada celular e depositando-se duas a três gotas em lâmina de vidro, um esfregaço corado com Panótico Rápido pode ser confeccionado. Esta técnica é chamada Buffy Coat (Murray *et al.*, 1977).

A inoculação em camundongos também é uma prática freqüente no diagnóstico das tripanossomíases, já que possui boa sensibilidade. Consiste na inoculação via intraperitoneal ou intramuscular de 0,2 ml de sangue infectado em camundongos de linhagem suíça ou Balb/c, que são acompanhados pela determinação da parasitemia e/ou mortalidade (Silva *et al.*, 2002). Entretanto, diversos autores apontam que a inoculação em camundongo seja pouco sensível na detecção de *T. vivax* (Murray *et al.*, 1977; Kalu *et al.*, 1986).

### **1.8.2. TÉCNICAS MOLECULARES**

Desde os anos 80, técnicas baseadas na identificação do DNA de tripanosomas têm contribuído com o diagnóstico parasitológico (Desquesnes e Dávila, 2002). Embora os métodos sorológicos sejam úteis em *screenings* epidemiológicos, estes usualmente não

distinguem infecções passadas de presentes, e a detecção do DNA de tripanosomas abre novas perspectivas neste campo (de Almeida *et al.*, 1998). Técnicas como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tiveram uma considerável contribuição na identificação, caracterização e diagnóstico de tripanosomas em diversos níveis taxonômicos com precisão e confiabilidade (Desquesnes e Dávila, 2002).

O material genômico dos tripanosomas é composto de DNA nuclear e cinetoplástico, este último denominado kDNA. Diversas seqüências de DNA já foram investigadas como possíveis alvos para o diagnóstico das tripanossomíases, especialmente os genes de múltiplas cópias, como mini-exon, mini-círculos e o DNA satélite nuclear dos mini-cromossomos, seqüências curtas e altamente repetitivas (Desquesnes e Dávila, 2002).

Segundo Silva *et al.* (2002), o diagnóstico de tripanosomas baseado no DNA combinado com a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) apresenta alta especificidade e permite detectar pequenas quantidades do parasito nas amostras (1 tripanosoma/ml de sangue). O uso desta técnica trouxe um considerável ganho na identificação, caracterização e diagnóstico de tripanosomas, permitindo a definição de novos táxons, espécies ou subespécies. Além disto, a PCR possibilitou o aumento na sensibilidade e especificidade do diagnóstico destes parasitos nos seus vetores, como as moscas tsé-tsé (Desquesnes e Dávila, 2002).

Diversos iniciadores já foram desenvolvidos para a detecção de *T. vivax*: TVW1/2, que fornece um produto espécie-específico de 150 pares de base (pb) (Masiga *et al.*, 1992); ILO1264/1265, que fornece um produto de 400 pb (Masake *et al.*, 1997); e TV80/322.24, com um produto de 266 pb (Clausen *et al.*, 1998).

Em 2001, Ventura *et al.* analisaram as seqüências SL (spliced-leader) do RNA de amostras brasileiras de *T. vivax*, definindo o grau de parentesco entre isolados americanos e africanos, e a posição taxonômica dos isolados brasileiros. A partir disso, desenvolveram iniciadores, denominados TviSL1 e 2 – que amplificam o mini-exon de *T. vivax* – tornando o método de diagnóstico molecular mais específico e sensível. Posteriormente, em estudo feito por Cortez *et al.* (2006), estes iniciadores amplificaram o DNA de todos os isolados provenientes da América do Sul e do Oeste da África, mas não amplificaram isolados do

Leste da África. A semelhança das populações da América do Sul e do Oeste da África, as quais são transmitidas de maneiras distintas (mecânica ou ciclicamente, respectivamente), sugere que o mecanismo de transmissão não está envolvido de maneira crítica na evolução (Ventura *et al.*, 2001).

### 1.8.3. SOROLÓGICO

Segundo Rebeski *et al.* (1999), o diagnóstico de tripanossomíase em animais com baixa parasitemia é dificultado pela baixa sensibilidade que os métodos tradicionais possuem. Conforme observado por Ventura *et al.* (2001), a ocorrência de doença crônica e assintomática em bovinos no Brasil dificulta a detecção de *T. vivax* pelos métodos parasitológicos. A detecção de anticorpos anti-tripanosoma em soros de animais fornece, por meio da determinação da prevalência, informações exatas a respeito da situação das tripanossomíases nos rebanhos, além de avaliar os efeitos da infecção sobre a saúde animal e sua produtividade, estimando os riscos da doença (Mattioli *et al.*, 2001). Os métodos diagnósticos sorológicos mais comumente utilizados no Brasil para detectar infecções por *T. vivax* são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Silva *et al.*, 2002).

O ELISA é baseado no uso de antígenos brutos obtidos a partir do sangue de roedores experimentalmente infectados ou de culturas de tecidos (Rebeski *et al.*, 1999). Ocorrem reações cruzadas, pois antígenos brutos dos tripanosomas têm especificidade limitada ao subgênero (Magona *et al.*, 2003). Além disso, Lejon *et al.* (2003), em seu experimento, verificaram que a utilização do ELISA na detecção de anticorpos contra *T. vivax* em caprinos falhou na identificação dos animais infectados.

Madrugá *et al.* (2006) desenvolveram uma técnica de ELISA para detecção de anticorpos contra *T. vivax* no Brasil e conseguiram diferenciar as infecções por *T. vivax* de *T. evansi*, não havendo reações cruzadas em seu estudo. Uma das vantagens da utilização do ELISA em estudos sorológicos na América do Sul é a ausência de espécies de tripanosomas que induzam resposta imune que gere fortes reações cruzadas com os antígenos crus de *T. vivax*, fato este que ocorre na África com *T. congolense*. Além disso, *T. theileri*, que ocorre

na América Latina, não apresenta reação cruzada com antígenos de *T. vivax* (Madruga *et al.*, 2006).

A RIFI, na qual são utilizados tripanosomas inteiros e fixados para a demonstração de anticorpos, já foi utilizada com sucesso no diagnóstico de tripanossomíase bovina em diversos estudos (Platt e Adams, 1976; Luckins e Mehlitz, 1978; García *et al.*, 2006). Este método diagnóstico fornece dados a respeito do nível de exposição dos animais ao parasito, além de possibilitar a identificação das áreas mais afetadas, onde a aplicação de medidas preventivas deve ser concentrada (García *et al.*, 2006). Além disso, Platt e Adams (1976) verificaram em seu estudo que não há reação cruzada na RIFI entre *T. vivax* e outros hemoparasitos, tais como *Anaplasma marginale*, *Eperythrozoon* sp., *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Trypanosoma theileri*, concluindo que este método pode ser usado em todo o hemisfério oeste para detectar bovinos expostos ao *T. vivax*. Porém, métodos sorológicos como a RIFI possuem especificidade relativamente baixa quando comparadas aos métodos moleculares (García *et al.*, 2006).

## 1.9. TRATAMENTO & CONTROLE

Os medicamentos existentes na literatura para tratamento da tripanossomíase por *T. vivax* são aceturato de diminazene, brometo de homidium, cloreto de homidium e cloreto de isometamidium (Silva *et al.*, 2004b). No Brasil, o tratamento e profilaxia da tripanossomíase bovina são feitos, basicamente, com aplicação de produtos químicos a base de aceturato de diminazene na dose de 3,5 mg/kg de peso vivo por via intramuscular (Paiva *et al.*, 2000b). Na Bolívia, tem-se utilizado substâncias à base cloreto de isometamidium (0,5 a 1,0 mg/kg de peso vivo) (Silva *et al.*, 1999). Já na Venezuela, o aceturato de diminazene e cloreto de isometamidium são as drogas de escolha (García *et al.*, 2006). O tratamento ou profilaxia da tripanossomíase bovina depende de uso correto destas drogas, sendo importante a identificação dos parasitos envolvidos, de modo a evitar o estabelecimento de resistência aos antiparasitários (García *et al.*, 2006). Algumas destas drogas, que são armazenadas nos tecidos, possuem lenta liberação na corrente circulatória do animal, o que mantém uma concentração do composto ativo suficiente para que este exerça o controle dos tripanosomas (Peregrine, 1994).

Em áreas onde a tripanosomíase é endêmica, o uso de tripanocidas deve ser aliado a outras medidas, tais como o controle de moscas hematófagas, diagnósticos periódicos e restrição da movimentação de animais infectados para locais livres da doença, levando assim a um uso mais racional de drogas (García *et al.*, 2006). Atualmente, o controle dos vetores tem sido feito com drogas *pour on* e armadilhas impregnadas com inseticidas (Silva *et al.*, 2004b).

Devido ao uso indiscriminado de drogas tripanocidas por proprietários que tratam animais suspeitos sem antes confirmar o diagnóstico de tal doença, vem-se estabelecendo um quadro de resistência, principalmente ao aceturato de diminazene na América do Sul. Já foram descritos casos de resistência na Colômbia e Guiana Francesa (Desquesnes *et al.*, 1995). A resistência é considerada de acordo com o nível de cada droga recomendado e os padrões de resistência são classificados de acordo com graduação usada para malária pelo World Health Organization (1973):

R1 - parasitemia desaparece, mas retorna em menos de 21 dias;

R2 - há queda na parasitemia para um nível mais baixo, mas esta não desaparece;

R3 - a parasitemia não diminui após o tratamento ou pode aumentar mesmo com a terapia.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Em agosto de 2007, uma vaca proveniente de um rebanho leiteiro situado no município de Igarapé – MG apresentava perda da visão e foi encaminhada ao Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG. No exame clínico verificou-se que o animal estava anêmico e, ao realizar-se o hemograma, foi constatada a presença de protozoários flagelados na forma de tripomastigota, diagnosticados como *Trypanosoma* sp. O material foi enviado ao Laboratório de Protozoologia Veterinária do Departamento de Parasitologia da UFMG onde, por meio de estudos morfológicos, identificou-se o *Trypanosoma vivax*. Amostras de sangue deste animal foram colhidas e criopreservadas em glicerol 10% em nitrogênio líquido.

Este foi o primeiro relato de ocorrência de animais domésticos no estado de Minas Gerais infectados por *T. vivax*. Dado o risco de disseminação desta doença a outros animais da mesma região, fez-se necessário um estudo epizootiológico de modo a se obterem os dados para avaliação da situação do parasito neste rebanho, bem como seu efeito na produtividade e impacto econômico na bovinocultura do local. Até o momento, estudos intensivos sobre a ocorrência de *T. vivax* na América do Sul vinham sendo conduzidos somente em áreas endêmicas, como no Pantanal e região norte do Brasil. O *T. vivax* possui grande potencial de distribuição para outras áreas do Brasil por ser transmitido principalmente por moscas hematófagas, freqüentemente presentes em regiões tropicais e subtropicais. Portanto, existe a necessidade de se expandirem estes estudos a outras áreas para que se tenha o conhecimento das diversas situações endêmicas no Brasil, verificando quais medidas de controle comuns podem ser aplicadas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar, caracterizar e verificar aspectos epidemiológicos e clínicos da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro de Minas Gerais.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar o *Trypanosoma* sp. de bovinos naturalmente infectados e, posteriormente, realizar a identificação da espécie;
- Realizar estudos morfológicos e biométricos de isolado de *Trypanosoma vivax* proveniente de Igarapé – MG;
- Produzir antígenos de *T. vivax* para Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI);
- Realizar sorologia periódica para *T. vivax* dos bovinos da fazenda problema;
- Determinar a frequência da infecção de *T. vivax* nos animais pela técnica de PCR;
- Descrever as alterações clínicas e patológicas nos bovinos infectados com *T. vivax*;
- Realizar o seqüenciamento dos genes da amostra de *T. vivax* de Igarapé e comparar com as demais amostras isoladas no Brasil.

#### 4. MATERIAL & MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), sob o número de protocolo 143/2008.

##### 4.1. LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado em uma propriedade rural de criação de bovinos leiteiros, situada no município de Igarapé, MG (20°4'S, 44°21'W e altitude 765 m), com área física de 246 ha.

A região possui clima tropical úmido, com estação chuvosa no verão (de novembro a março), com transição para seca em abril e maio, e seca no inverno (de junho a agosto), com transição para chuvosa em setembro e outubro. Apresenta precipitação média anual de 1.400 mm e temperatura média anual de 22,2°C, sendo que, no inverno, a temperatura média é de 18,5°C e no verão de 22,4°C (Normas Climatológicas, 1992).

Na propriedade, o rebanho é constituído de 235 bovinos das raças Gir, Holandês e Girolando, dos quais 63 são vacas em lactação, 13 vacas secas, 64 novilhas, 28 novilhos, 66 vacas de corte (as quais não usadas para reprodução) e um touro de repasse.

A fazenda utiliza ordenha mecânica em circuito fechado e tem produção de aproximadamente 1.400 litros de leite por dia.

##### 4.2. ISOLAMENTO DA AMOSTRA DE *Trypanosoma* sp.

Da vaca com exame parasitológico positivo para *Trypanosoma* sp., foram colhidos 20 ml de sangue em tubos vacutainer com anticoagulante (EDTA). Acrescentou-se 10% de glicerol à amostra sanguínea e esta foi alíquotada em ampolas e congelada a -20°C. Posteriormente, as ampolas foram colocadas em nitrogênio líquido de forma lenta e gradual.

Uma ampola foi descongelada rapidamente em banho maria a 37°C e inoculada por via intramuscular em bezerro esplenectomizado e livre de infecção por hemoparasitos. O animal foi acompanhado diariamente por meio de tomada de temperatura, determinação do volume globular (VG) e esfregaços sanguíneos. Quando o bezerro atingiu

parasitemia de  $10^6$  tripanosomas/ml de sangue, foram colhidos 10 ml de sangue em tubos contendo anticoagulante e criopreservados em glicerol 10%, conforme descrito anteriormente. Amostras criopreservadas em nitrogênio líquido encontram-se armazenadas no Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG.

#### **4.3. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS DO ISOLADO DE *Trypanosoma vivax* DA REGIÃO DE IGARAPÉ, MINAS GERAIS**

Esfregaços sangüíneos foram confeccionados com o sangue colhido do bovino naturalmente infectado e do bezerro infectado experimentalmente com o isolado de *Trypanosoma vivax*, durante as fases aguda e crônica da infecção. Os esfregaços foram corados pelo método Panótico Rápido (Laborclin, Pr) e estudos morfológicos e morfométricos (Hoare, 1972) foram realizados em 50 tripomastigotas das diferentes fases da infecção. As tripomastigotas foram observadas em microscópio óptico sob imersão, fotografadas e, posteriormente, realizadas as medições pelo programa Image Pro Plus versão 4.51.

Os índices NI (índice nuclear) e KI (índice cinetoplástico) foram utilizados para definir, respectivamente, a posição do núcleo e do cinetoplasto no parasito. Para o cálculo destes índices, foram realizadas as seguintes medições: PN (final da extremidade posterior ao núcleo), PK (final da extremidade posterior ao cinetoplasto), NA (distância do núcleo ao final da extremidade anterior), KN (distância do cinetoplasto ao núcleo), L (comprimento total do tripanosoma) e F (comprimento do flagelo) (Figura 2). O cálculo do NI se dá pela divisão  $PN/NA$ , e o cálculo do KI é feito dividindo-se PN por KN. Quando NI for igual a 1, considera-se que o núcleo está posicionado no meio do corpo; quando NI for maior que 1, o núcleo está na metade anterior do corpo; e quando NI for menor que 1, está na metade posterior. Quando KI for menor do que 2, considera-se que o cinetoplasto está localizado entre a extremidade posterior e o núcleo. Se KI for maior que 2, então o cinetoplasto estará localizado próximo ao núcleo.

As características morfológicas e morfométricas observadas foram comparadas com isolados de *T. vivax* de outros estados brasileiros.

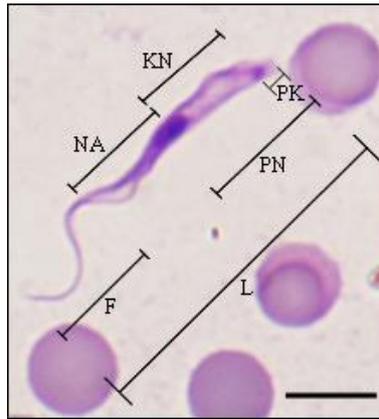


Figura 2. Morfologia e pontos utilizados na morfometria dos *Trypanosoma vivax* observados em esfregaços sanguíneos de bovino naturalmente infectado durante fase crônica, Igarapé – MG, 2007. Barra: 5  $\mu$ m.

#### 4.4. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DO REBANHO BOVINO

##### 4.4.1. ACOMPANHAMENTO CLÍNICO DO REBANHO & OBTENÇÃO DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS

O trabalho foi realizado no rebanho leiteiro durante o período de setembro de 2007 a outubro de 2008. Das vacas em lactação ou secas foram colhidas amostras sanguíneas nos meses de setembro de 2007 (coleta 1), fevereiro (coleta 2), junho (coleta 3), agosto (coleta 4) e outubro de 2008 (coleta 5). Nos demais animais da propriedade (bezerros, novilhas, gado de corte, caprinos, ovinos e eqüídeos), foram realizadas coletas de material apenas no início (setembro/2007) e final (outubro/2008) do trabalho. De cada animal foi colhida amostra sanguínea em tubos contendo EDTA, que foram refrigeradas e enviadas no mesmo dia ao laboratório para o devido processamento.

Durante o período experimental, todos os animais que demonstravam sintomatologia clínica da doença ou apresentavam resultado positivos ao exame parasitológico e/ou sorológico, foram tratados com aceturato de diminazene (Ganaseg plus® Novartis), seguindo a posologia recomendada pelo fabricante. Os animais que morreram neste período foram necropsiados e os achados patológicos foram registrados.

##### 4.4.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

As amostras de sangue, devidamente acondicionadas em caixas com gelo no campo, foram levadas para o Laboratório de Protozoologia Veterinária do ICB/UFMG, no máximo quatro horas após a coleta, para os seguintes procedimentos:

- Determinação do volume globular (VG) pela técnica de centrifugação do microhematócrito;
- Diagnóstico parasitológico pela técnica da centrifugação em tubo capilar (Woo, 1970), que consiste no preenchimento de dois tubos de microhematócrito para cada amostra de sangue, centrifugação a 12.000 rpm por 5 min. e leitura em microscópio óptico da interface entre a papa de leucócitos e o plasma. Considerou-se 1 cruz quando foram encontrados até 10 parasitos por tubo capilar; 2 cruces de 10 a 50 parasitos por tubo; e 3 cruces acima de 50 parasitos por tubo.
- Confeção de lâminas de esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido dos animais positivos no teste de Woo;
- Contagem de tripanosomas no sangue periférico pela metodologia descrita por Brener (1962) dos animais positivos no teste de Woo. Tal técnica consiste em colocar 5µl de sangue entre lâmina/lamínula (22 x 22 mm) e realizar a leitura de 50 campos microscópicos. O número de parasitos observados é multiplicado pelo fator 80, obtendo-se o número de tripanosomas em 5µl de sangue;
- Alíquotas de plasma de todos os animais foram separadas e congeladas a -20°C para realização de sorologia pelo método da reação de imunofluorescência indireta (RIFI);
- Alíquotas de sangue de todos os animais foram separadas e congeladas a -20°C para extração de DNA.

Com as amostras de sangue colhidas dos caprinos, ovinos e eqüídeos, foi feito o diagnóstico parasitológico (técnica de Woo, 1970) e separado plasma para sorologia.

#### **4.5. REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)**

##### **4.5.1. PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE *T. vivax***

Um caprino com cinco meses de idade e livre de hemoparasitos foi esplenectomizado e inoculado por via intramuscular com 5 ml da amostra de *T. vivax* crioconservado. O animal foi mantido em isolamento e examinado diariamente pela colheita de 1 ml de

sangue com anticoagulante para o exame da técnica da centrifugação em tubo capilar (Woo, 1970) e a determinação da parasitemia pela metodologia descrita por Brener (1962).

Quando a contagem das formas sangüíneas atingiu  $2 \times 10^7$  tripanosomas/ ml de sangue (pico da parasitemia), foram colhidos 150 ml de sangue em tubos vacutainer contendo EDTA. Uma solução de Percoll foi preparada com 8,55g de sacarose, 2 g de glicose e 100 ml de Percoll 100% (Sigma) (densidade 1.130/ml), e o pH ajustado para 7,4 adicionando-se HEPES sólido. O sangue foi então misturado com igual proporção da solução de Percoll e acondicionado em tubos próprios para centrifuga refrigerada (Sorvall), preenchendo-se somente 80% da capacidade destes tubos (em tubos de 42 ml, foram colocados 16,8 ml de solução de Percoll e 16,8 ml de sangue). A mistura foi centrifugada a 17.500g por 20 minutos a 4°C. A banda de parasitos formada próxima ao topo do gradiente foi colhida e ressuspensa em PBSG (PBS de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM pH 7,5 e NaCl 150 mM + 1% de glicose) na proporção de 1:3. Após nova centrifugação, a 6000g, por 15 min. a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com PBSG (40 ml) 6000g/ 15 min. a 4°C para eliminar resíduos de Percoll. Os tripanosomas parcialmente purificados foram ressuspensos em PBSG e cromatografados através de coluna de DEAE-celulose equilibrada com PBSG.

O preparo da coluna DEAE-celulose foi feito de acordo com o protocolo “SIGMA Regeneration of DEAE-cellulose”.

Os parasitos foram passados através da coluna de DEAE-Celulose e pequenas frações do eluato foram recuperadas em tubos e examinadas por microscopia. As frações que continham parasitos foram misturadas e centrifugadas a 6000 g/ 15 min. a 4°C.

O sobrenadante foi desprezado e os tripanosomas ressuspensos em PBS até a obtenção de seis parasitos por campo microscópico em aumento de 400X. Uma gota (10  $\mu$ l) desta suspensão foi colocada em cada orifício de lâminas de vidro previamente demarcadas. Após secarem ao ar, as lâminas foram fixadas em acetona resfriada por 5 min., secas ao ar e embrulhadas em lenços de papel, envoltas por papel alumínio e conservadas a -20°C até o momento de uso.

#### 4.5.2. REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA *T. vivax*

As alíquotas de plasma separadas das amostras sanguíneas de cada animal foram testadas quanto à presença de anticorpos anti-*T. vivax* pela técnica de RIFI. Inicialmente, foi realizada uma triagem utilizando-se a diluição de 1:80 e as amostras positivas nesta diluição foram testadas nas diluições triplas 1:240, 1:720 e 1:2160.

As lâminas com antígenos foram retiradas do freezer imediatamente antes do uso e secas a 37°C por cinco minutos. Nos orifícios de cada lâmina, foram colocados os plasmas testes, os controles negativo (bovino livre de *T. vivax*) e positivo (bovino naturalmente infectado com *T. vivax*) e o controle PBS. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, na estufa a 37°C durante 30 minutos. Após serem lavadas em PBS para retirar o excesso de plasma, as lâminas foram cobertas com PBS por cinco minutos, seguido de lavagem com água destilada por cinco minutos. As lâminas foram secas e posteriormente foi adicionado em cada orifício o conjugado anti-IgG de bovino marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma) diluído a 1:200 em azul de Evans (1:50 em PBS Tween). Nas lâminas onde foram testados os plasmas dos ovinos, caprinos e eqüídeos, utilizou-se o conjugado anti-espécie animal marcados com isotiocianato de fluoresceína (Sigma) na diluição citada anteriormente. As lâminas foram incubadas novamente a 37°C/ 30 minutos e lavadas novamente com PBS e água destilada conforme descrito anteriormente. Posteriormente, foram secas, cobertas com glicerina tamponada e lamínulas.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência em aumento de 400X. Foram consideradas positivas as reações com fluorescência com títulos  $\geq$  1:80 (García *et al.*, 2006).

O cálculo da soroprevalência foi feito baseado no número de casos encontrados da doença no período de tempo estudado. Para o cálculo de incidência, considerou-se o número de novos casos da doença baseado na população de susceptíveis em determinado período de tempo.

## 4.6. TÉCNICA MOLECULAR

### 4.6.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A confirmação molecular da identificação da espécie de tripanosoma envolvida, bem como a determinação da frequência de infecção nos bovinos da propriedade problema foi feita utilizando-se a técnica de PCR.

A PCR foi realizada nas amostras de sangue de todas as vacas em lactação colhidas em setembro de 2007 e das obtidas em outubro de 2008. O DNA foi extraído a partir de 300 µl de sangue de cada amostra utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®) conforme as recomendações do fabricante.

O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria e amplificado pela técnica da PCR, utilizando-se os seguintes iniciadores, que amplificam um fragmento específico de 210 pares de base (pb) correspondente às regiões intergênicas dos genes do *spliced-leader* (SL) de *T. vivax*:

TviSL1 – 5' GCT CTC CAA TCT TAA CCC TA 3' (Ventura *et al.*, 2001).

TviSL2 – 5' GTG CAA ACG CTC CGT GCC 3' (adaptado de Ventura *et al.*, 2001).

As amplificações foram conduzidas em 30 µl de mistura de reação contendo 3 µl de tampão 10X; 0,3 µl (10 mM) dos quatro dNTP's; 0,6 µl (100 ng/µl) de cada iniciador; 0,3 µl (5 u/µl) de Taq DNA polimerase; e quantidades variáveis de DNA (aproximadamente 25 ng/µl).

As reações foram efetuadas em um termociclador de DNA TC3000 da Techne por 35 ciclos. Cada ciclo consistiu de um passo de desnaturação (94°C por 1 minuto), um passo de anelamento (65°C por 2 minutos), um passo de extensão (72°C por 3 minutos), seguido de 10 minutos de extensão final a 72°C. Para certificar-se de que não houve contaminação da PCR, como controle branco foi adicionada água ao invés de DNA, executando-se o mesmo procedimento. Depois de confirmado por seqüenciamento que se tratava da espécie *T. vivax*, o DNA extraído do sangue do caprino infectado experimentalmente com parasitemia de  $9,8 \times 10^6$  tripanosomas/ml de sangue foi utilizado como controle positivo da reação. Como controle negativo, foi usado o DNA

extraído do sangue de bezerros provenientes da região de Inhaúma - MG, área livre de tripanossomíases em bovinos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, o gel corado com brometo de etídio e examinado em luz ultravioleta para verificar o tamanho dos fragmentos amplificados por comparação com marcadores de pesos moleculares de 100-pb DNA Ladder (Invitrogen).

#### **4.6.2. CLONAGEM, SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS & ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS**

Para a realização do seqüenciamento dos genes da amostra de *T. vivax*, os produtos de PCR obtidos do DNA extraído do sangue do caprino infectado experimentalmente foram purificados do gel de agarose utilizando-se o kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (Pharmacia/Amersham) conforme instruções do fabricante. Os fragmentos purificados foram clonados no vetor TOPO (Invitrogen) e a cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* termocompetente foi transformada com o sistema de ligação. A cultura foi plaqueada em meio LB contendo 100µg/ml de ampicilina e incubadas a 37°C por aproximadamente 12h. O DNA plasmidial de cinco clones isolados foi preparado por cromatografia de troca iônica usando-se colunas do Qiaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram então seqüenciadas em ambas as extremidades pelo método de terminação de cadeia (Sanger *et al.*, 1977) em seqüenciador automático MegaBace.

As seqüências foram analisadas pelo pacote Phred-Phrap-Consed (Ewing e Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998). Realizou-se o *base calling*, atribuindo a cada base um valor de qualidade e as seqüências derivadas do vetor de clonagem foram mascaradas. As seqüências dos *contigs* correspondentes à montagem das seqüências de ambas as extremidades de cada fragmento clonado foram obtidas e submetidas à pesquisa de homologia em banco de dados utilizando o programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tools”) (Altschul *et al.*, 1990). Os alinhamentos múltiplos de seqüência foram realizados utilizando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

#### 4.7. MEDIDAS PREVENTIVAS ADOTADAS PARA O CONTROLE DA TRIPANOSSOMÍASE NO REBANHO

Durante o período experimental foram adotadas medidas sanitárias visando reduzir a transmissão do parasito pelas moscas hematófagas *Stomoxys calcitrans*. Para tanto, os currais passaram a serem limpos diariamente e as fezes dos bovinos incorporadas ao solo, eliminando os criadouros de larvas e pupas das moscas. Para controle tanto de moscas quanto de carrapatos na propriedade, os animais foram pulverizados em intervalos de aproximadamente 30 dias intercalados com amifos, cipermetrina e cipermetrina associada à ethion. Além disto, medidas de controle da transmissão mecânica por fômites foram adotadas na propriedade, passando-se a utilizar agulhas descartáveis e individuais nos animais.

Foi feito um tratamento massal do rebanho com aceturato de diminazene na época de encontro de maior número de animais com infecção patente.

#### 4.8. AVALIAÇÃO DAS PERDAS ECONÔMICAS

Na propriedade existe um banco de dados onde são registradas as ocorrências de produção e aspectos sanitários dos animais. Dados obtidos no período de 2005 ao 1º semestre de 2007 (antes do surto) foram comparados com dados do 2º semestre de 2007 e 2008, de modo a estimar o impacto econômico causado pela infecção por *T. vivax* no rebanho leiteiro.

#### 4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados relativos ao exame parasitológico (técnica de Woo), intensidade de parasitemia, RIFI e volume globular foram arranjados em Tabela de Contingência 2 x 2 e comparados pelo teste de Qui-Quadrado utilizando-se o nível de significância 0,01.

A comparação dos resultados da PCR com a RIFI e da PCR com o exame direto (técnica de Woo) foram feitas utilizando-se as Tabelas de Contingência 2 x 2 (Fletcher Fletcher, 1989):

	Padrão ouro		
	Positivo	Negativo	
Teste Positivo	A	B	a + b
Teste Negativo	C	D	c + d
	a + c	b + d	

Para o cálculo da sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, as seguintes fórmulas foram utilizadas:

$$\text{Sensibilidade (S)} = \frac{A}{a + c}$$

$$\text{Especificidade (E)} = \frac{D}{c + d}$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo (VPP)} = \frac{A}{a + b}$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo (VPN)} = \frac{D}{c + d}$$

As medidas das tripomastigotas da fase aguda e da fase crônica – observadas em microscópio óptico e fotografadas – foram submetidas ao teste T para verificar se houve diferença estatística entre as medidas das duas fases do surto. As médias de volume globular (VG) dos animais positivos e negativos para todos os testes utilizados neste estudo também foram comparadas pelo teste T. Para tanto, utilizou-se o software Bioestat versão 4.0, mantendo-se o nível de significância entre 1 e 5% em todas as análises.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ESTUDO MORFOMÉTRICO DO ISOLADO DE *T. vivax*

As formas tripomastigotas observadas nos esfregaços sanguíneos apresentaram extremidade posterior arredondada, membrana ondulante fracamente desenvolvida, núcleo central, cinetoplasto terminal e flagelo livre presente. Em 100% (n=50) das formas observadas durante a fase crônica da infecção o cinetoplasto estava localizado entre a extremidade posterior e o núcleo (KI<2). Quanto à localização do núcleo foi constatado que 54% (n=27) das tripomastigotas mensuradas apresentaram o núcleo na metade anterior do corpo (NI>1); 44% (n=22) na metade posterior (NI<1) e, em 2% (n=1), o núcleo situava-se no meio do corpo (NI=1) do parasito. O comprimento total das formas medidas variou de 14,79 a 24,19  $\mu\text{m}$  (média de  $19,89 \pm 2,15 \mu\text{m}$ ). As médias biométricas do *T. vivax* isolado de Igarapé apresentaram semelhanças com os demais isolados de outras regiões do Brasil (Tabela 3).

No presente estudo, foi observado que nos esfregaços sanguíneos de animais confeccionados no período inicial do surto predominavam as formas largas e, na fase crônica da doença, eram mais freqüentes as formas delgadas (Figura 3). As diferenças entre as mensurações do *T. vivax* da fase aguda e crônica da doença apresentaram diferenças estatisticamente significativas somente para os valores referentes à distância do cinetoplasto ao meio do núcleo (KN) ( $p < 0,001$ ), distância do final da extremidade posterior ao meio do núcleo (PN) ( $p < 0,001$ ) e distância do meio do núcleo ao final da extremidade anterior (NA) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

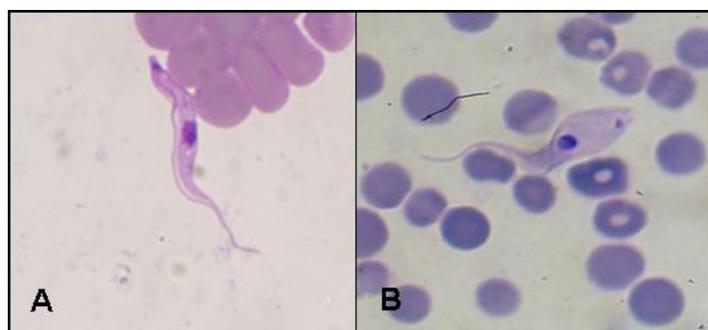


Figura 3. Fotografia de esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido de bovino naturalmente infectado com *T. vivax*, Igarapé – MG, durante as fases aguda e crônica da doença, 1000x. A: forma delgada da fase crônica; B: forma larga da fase aguda.

Tabela 2. Comparação entre as médias biométricas ( $\mu\text{m}$ ) do *Trypanosoma vivax* isolado de bovinos naturalmente infectados de Igarapé, MG durante as fases aguda e crônica do surto (2007).

Médias/ desv padrão	L	PK	KN*	PN*	NA*	F	KI	NI
Fase Aguda (n = 50)	19,89 $\pm$ 2,15	0,90 $\pm$ 0,29	6,64 $\pm$ 0,89	7,55 $\pm$ 0,93	7,46 $\pm$ 1,32	6,22 $\pm$ 1,21	1,04 $\pm$ 0,2	1,14 $\pm$ 0,05
Fase Crônica (n = 50)	22,06 $\pm$ 2,06	1,99 $\pm$ 0,69	4,79 $\pm$ 1,03	6,78 $\pm$ 1,16	6,85 $\pm$ 1,61	8,22 $\pm$ 1,40	1,44 $\pm$ 0,22	1,04 $\pm$ 0,32

L (comprimento total do parasito, incluindo o flagelo livre); PK (distância do final da extremidade posterior ao cinetoplasto); KN (distância do cinetoplasto ao meio do núcleo); PN (distância do final da extremidade posterior ao meio do núcleo); NA (distância do meio do núcleo ao final da extremidade anterior); F (comprimento do flagelo livre); KI (índice cinetoplástico); NI (índice nuclear).

\* houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a fase aguda e crônica da doença.

Tabela 3. Comparação entre as médias biométricas ( $\mu\text{m}$ ) do *Trypanosoma vivax* isolado de bovinos naturalmente infectados de Igarapé, MG (2007) e outros isolados no Brasil.

	L	PK	KN	PN	NA	F	KI	NI
Minas Gerais (presente estudo)	19,89 ( $\pm$ 2,15)	0,90 ( $\pm$ 0,29)	6,64 ( $\pm$ 0,89)	7,55 ( $\pm$ 0,93)	7,46 ( $\pm$ 1,32)	6,22 ( $\pm$ 1,21)	1,04 ( $\pm$ 0,2)	1,14 ( $\pm$ 0,05)
Pará (Shaw e Lainson, 1972)	22,77	0,65	6,16	7,60	8,22	6,92	1,23	0,94
Mato Grosso (Silva <i>et al.</i> , 1996)	18,73	1,02	6,10	7,18	5,40	6,15	1,17	1,50
Mato Grosso do Sul (Silva <i>et al.</i> , 1997)	18,10	0,30	7,46	7,76	6,03	4,30	1,04	1,34
Tocantins (Linhares <i>et al.</i> , 2006)	19,42	0,96	6,24	7,25	5,87	6,29	1,16	1,24
Maranhão (Guerra <i>et al.</i> , 2008)	19,94	1,35	6,40	7,64	6,75	6,01	1,20	1,15

Os resultados da morfometria do isolado de *T. vivax* foram publicados na revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Anexo 1).

## 5.2. INFEÇÃO PATENTE

### 5.2.1. TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS

Durante o período experimental, dos 345 bovinos avaliados, 25 animais apresentaram parasitemia patente por *T. vivax* segundo a técnica de Woo (prevalência de 7,2%). Na coleta de amostras sanguíneas realizada em fevereiro foram constatados que 23,1% das vacas apresentavam teste Woo positivo, sendo a frequência significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que a observada nos demais períodos. Na última colheita de outubro de 2008 nenhum animal apresentou exame Woo positivo (Tabela 4).

As parasitemias, quantificadas por escores 1, 2 ou 3 no teste de Woo e/ou pela metodologia de Brener (1962) variaram de 1 a 3 cruzeiros e de  $1 \times 10^6$  a  $1,8 \times 10^7$  tripomastigotas/ml de sangue, respectivamente. Os maiores valores nas quantificações da técnica de Woo e nas contagens de formas sanguíneas foram observados em fevereiro de 2008. Considerando-se todas as coletas, 36% dos animais positivos ao exame de Woo apresentaram parasitemia 1 cruz, enquanto que 16% apresentaram 2 cruzeiros e 48%, 3 cruzeiros.

Nenhum caprino, ovino ou eqüideo avaliado apresentou infecção corrente.

O teste de Woo, ao ser comparado com a PCR, apresentou sensibilidade de 75%, especificidade de 94%, valor preditivo positivo (VPP) de 79% e valor preditivo negativo (VPN) de 92%.

### 5.2.2 VOLUME GLOBULAR

Os valores de VG dos animais, no decorrer do período experimental, variaram de 11 a 38% (média  $29,1 \pm 3,64\%$ ), com associação de valores mais baixos ( $VG \leq 24\%$ ) e animais positivos parasitologicamente ( $p < 0,0001$ ) (Figura 4). Na coleta 1, o VG variou de 12 a 33% (26,8%); na coleta 2, de 17 a 37% (28,95%); na coleta 3, de 21 a 36% (29,9%); na coleta 4, de 21 a 36% (28,9%); e na coleta 5, de 25 a 38% (30,7%).

Considerando-se todas as coletas, a média de VG dos animais parasitologicamente positivos (pelo teste de Woo ou pela PCR) foi de  $24,6 \pm 4,72\%$ , sendo significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) que a média de VG dos animais não infectados ( $29,5 \pm 3,27\%$ ). Entre

os animais com infecção corrente, o VG não apresentou diferença significativa com a intensidade da parasitemia: animais com escore 1, 2 e 3 tiveram média de VG (%) de  $24 \pm 5,13$ ;  $23 \pm 2,6$ ; e  $25 \pm 3,1$ , respectivamente.

Não houve associação entre positividade na RIFI e valores mais baixos de VG ( $p > 0,01$ ).

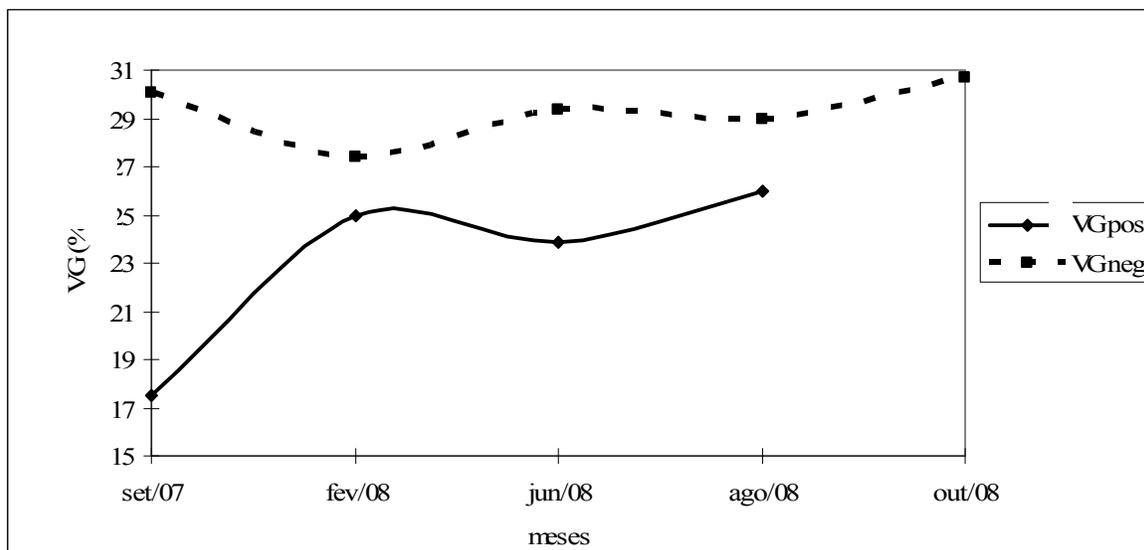


Figura 4. Média de volume globular (VG) dos bovinos positivos e negativos pelo teste de Woo e/ou pela PCR da fazenda onde ocorreu surto de *T. vivax* em Igarapé - MG durante o período de setembro de 2007 a outubro de 2008. Diferenças estatísticas foram observadas entre os animais positivos e negativos, Qui-quadrado ( $p < 0,0001$ ).

### 5.3. SOROLOGIA DO *T. vivax* NO REBANHO

#### 5.3.1. SOROPREVALÊNCIA

Durante o período de setembro de 2007 a outubro de 2008, foram realizados 345 ensaios de RIFI das vacas secas e em lactação, dos quais 112 apresentaram resultado positivo (frequência 32,5%) (Tabela 4).

Na primeira sorologia realizada nas vacas leiteiras da propriedade, em setembro de 2007, a prevalência de anticorpos anti-*T. vivax* foi de 7,4% (4 positivas em 54 animais). Os animais soropositivos apresentaram títulos de 1:80 (1); 1:240 (1) e 1:720 (2).

Nas sorologias subsequentes foi notado um aumento gradativo da frequência, sendo que na última constatou-se que 45,3% dos animais eram sorologicamente positivos (Figura 5).

Quanto aos títulos de anticorpos, foi verificado um aumento gradual dos títulos elevados ( $\geq 1:240$ ), indicando infecção ativa de novos casos no plantel.

A RIFI, quando comparada com a técnica da PCR, apresentou sensibilidade de 80%, especificidade de 25%, VPP 25% e VPN 80%.

#### 5.3.2. INCIDÊNCIA

As sorologias realizadas nos meses de setembro de 2007, fevereiro, abril, agosto e outubro de 2008, utilizando os mesmos animais do plantel de bovinos, possibilitaram a identificação de novos casos de infecção por *T. vivax*. Foram considerados casos novos quando ocorreu a soroconversão pela RIFI, indicando que os animais entraram em contato com antígenos do parasito.

No período de setembro de 2007 a fevereiro de 2008 foram constatados 15 novos casos de infecção, o que corresponde a uma taxa de incidência de 24%. Em junho de 2008, verificou-se taxa de incidência de 21% (13 casos novos) e, em agosto de 2008, a incidência foi de 10,6%, significativamente menor ( $p < 0,05$ ) em comparação às anteriores. Em outubro de 2008 não foram verificados casos novos da infecção.

No entanto, na última colheita de amostras sanguíneas constatou-se uma incidência de 22%, significativamente superior à anterior e semelhante às iniciais do trabalho.

Tabela 4. Soroprevalência e freqüência de infecção patente (técnica de Woo) por *T. vivax* e volumes globulares (VG) dos 345 bovinos observados no período de setembro de 2007 a outubro de 2008 em Igarapé - MG.

	Coletas				
	Set/07	Fev/08	Jun/08	Ago/08	Out/08
Nº de animais avaliados	54	65	76	75	75
Nº de animais soropositivos	4 (7,4%)	18 (27,7%)	29 (38,2%)	27 (36%)	34 (45,3%)
Média VG (%) dos:					
Soropositivos	26	25	28,6	28	30,2
Soronegativos	30,7	27,5	29,1	29,4	31,1
Nº de animais com infecção patente	2 (3,7%)	15 (23,1%)	6 (7,9%)	2 (2,7%)	0
Média VG (%) dos:					
Animais com infecção patente	17,5	24,9	23,8	26	-
Animais sem infecção patente	30,08	27,4	29,4	29	30,7

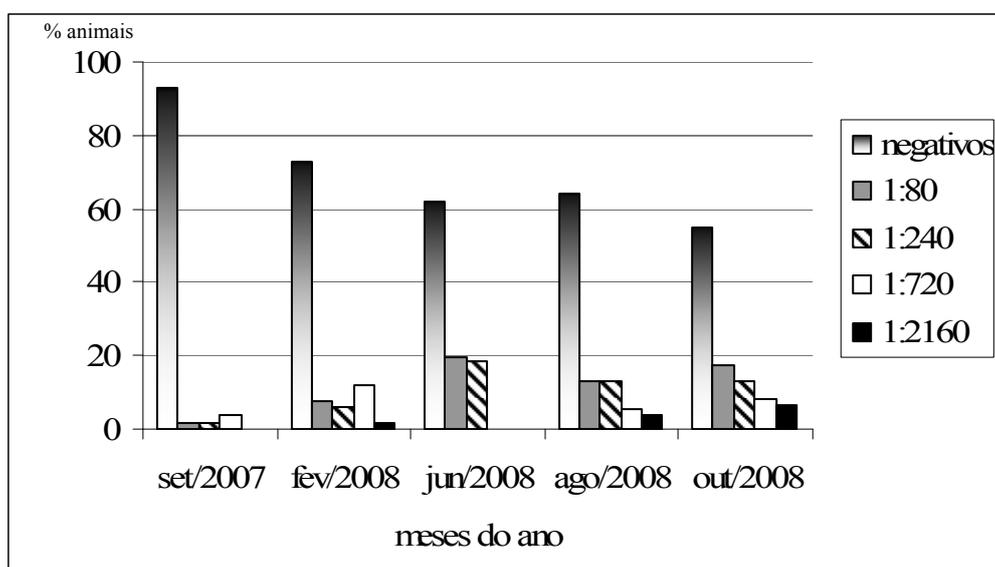


Figura 5. Freqüência dos títulos de anticorpos anti-*T. vivax* em bovinos da fazenda de Igarapé, MG durante o período de setembro de 2007 a outubro de 2008.

#### 5.4. TÉCNICAS MOLECULARES – PCR & SEQUENCIAMENTO

Como resultado do seqüenciamento da região intergênica do gene *spliced-leader*, foi obtido um produto de 208 nucleotídeos (nt) que, quando submetido à pesquisa de homologia em banco de dados de seqüências nucleotídicas não redundantes (nr) do NCBI usando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), demonstrou 97% de identidade com outra amostra de *T. vivax* oriunda da região do Pantanal, MS (nº acesso no GenBank: AF335565.1) (Figura 6).

Uma vez confirmada a espécie de tripanosoma envolvida, foram feitas as PCR's de bovinos para confirmação do diagnóstico parasitológico e validação da técnica de PCR. De 19 amostras parasitologicamente positivas ao teste de Woo, 15 estavam positivas na PCR. Dentre 65 amostras negativas ao teste de Woo, cinco (7,6%) estavam positivas na PCR.

Dos vinte animais positivos na PCR, oito (40%) apresentavam VG  $\leq$  24%, enquanto que entre os sessenta e quatro negativos na PCR, nove (14%) apresentaram valores de VG baixos.

Os resultados da PCR específica para *T. vivax*, que amplifica fragmentos de 210-pb, podem ser observados na Figura 7. Algumas bandas de maior peso molecular, de 500 a 700-pb, também foram observadas em diversas amostras.

```

BLASTN
Query: Contig1 clone D6 - 208 nt
DB: Nucleotide collection (nr/nt)

>gb|AF335565.1| Trypanosoma vivax isolate TviMi trans-spliced leader SL sequence
Length=689
Score = 342 bits (378), Expect = 4e-91
Identities = 204/210 (97%), Gaps = 3/210 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 2      TTGCTCTCC-AATCTTAAACCCTAACC-TGGccccttccgcccgcgcacatccc-ttctccttc 58
             |||
Sbjct 461     TTGCTCTCCCAATCTTAAACCCTAACCCTGGCCCCTTCGCGCGCATCCCCTTCTCCTTC 520

Query 59     ctcttcttctccttcccttccgacccttctcctcctccacccccctctcaaggcgcccca 118
             |||
Sbjct 521     CTCTTCTTCTCCTTCCTTCCGACCCTTCTCCTCCTCCACCCCCTCTCAAGGCGCCCCA 580

Query 119    cccgccccctgcccacgcaccacgcgcgcgcgcCATTTTCGTACGCGCACGTTTGAC 178
             |||
Sbjct 581     CCCGCCCCCTGCCACGCACCACGCGCGCGCGCCATTTTCGTACGCGCACGTTTGAC 640

Query 179    CGCCTTGCTGGGGGCACGGAGCGTTTGAC 208
             |||
Sbjct 641     CGCCTTGCTGGGGGCACGGAGCGTTTGAC 670

```

Figura 6. Alinhamento das seqüências clonadas da região intergênica do gene SL do isolado de *T. vivax* de Igarapé (MG) com isolado de Miranda (MS).

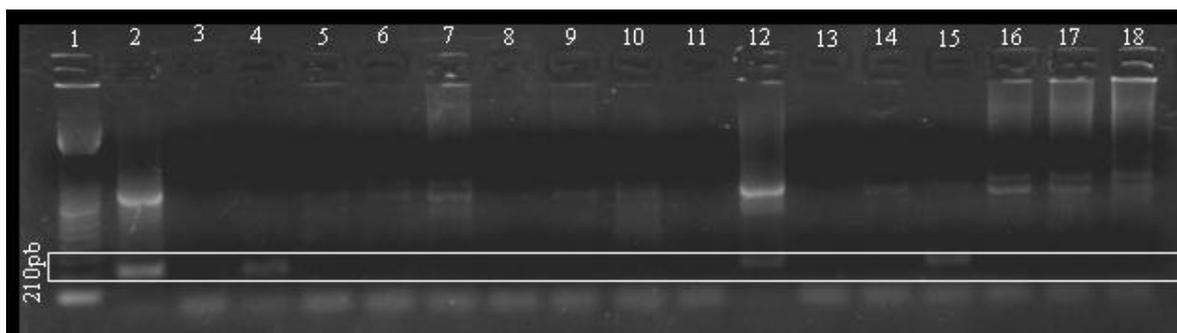


Figura 7. Eletroforese de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta, mostrando da esquerda para direita: (1) Marcador de peso molecular 100-pb DNA Ladder (Invitrogen); (2) controle positivo da reação (animal experimentalmente infectado com amostra de *T. vivax*); (3) Controle branco da reação; (4, 12 e 15) Animais PCR - positivos; (5 a 11, 13, 14, 16 e 18) Animais PCR - negativos; (18) Controle negativo da reação (animal negativo e procedente de área livre para *T. vivax*).

### 5.5. TRATAMENTO COM ACETURATO DE DIMINAZENE

Durante todo o período experimental, os animais que demonstraram sintomatologia clínica da doença ou exame parasitológico positivo e/ou altos títulos de anticorpos foram tratados com aceturato de diminazene. Devido ao encontro de grande número de animais com infecção patente em fevereiro de 2008, no mês de abril foi feito o tratamento preventivo de todos os animais do setor de bovinos, incluindo os eqüídeos, com Ganazeg Plus®, totalizando 270 tratamentos. Seguindo as recomendações do fabricante, o leite dos três dias posteriores ao tratamento foi descartado.

Em fevereiro de 2008, 40% (14/35) dos animais eram positivos na PCR e, após o tratamento em massa do rebanho, constatou-se 6,67% (2/30) de positividade. Dos animais que foram avaliados pela técnica de PCR em ambas as coletas, 57,14% (12/21) tornaram-se negativos e duas novas infecções ocorreram, indicando uma incidência de 9,5%.

### 5.6. PERDAS ECONÔMICAS NO REBANHO

Os impactos econômicos causados pela tripanossomíase no rebanho foram calculados com base nas mortes diretas, abortos, natimortos e queda no ganho de peso e na produção de leite, além dos gastos com drogas tripanocidas. Tais dados podem ser visualizados na Tabela 5. O descarte do leite após o tratamento com aceturato de diminazene em abril de 2008 causou um prejuízo de R\$ 2.006,55, pois nesta época sessenta e cinco vacas estavam em produção, com média de produção diária de 14,7 Kg de leite, com valor de venda de R\$ 0,70/Kg.

Observou-se aumento significativo do número de mortes de vacas leiteiras, redução da média de produção de leite e descarte de animais.

Na Figura 8, estão representadas as pesagens em quilogramas (Kg) feitas da produção leiteira da fazenda em intervalos de duas a quatro semanas. Verifica-se que no final de 2007 e em 2008 ocorreram as menores médias de produção de leite dos animais do rebanho. Na Figura 9, o retorno financeiro bruto da fazenda foi calculado com base na quantidade de litros de leite vendida por dia, considerando-se o preço do litro de leite de R\$ 0,70. Observa-se queda acentuada do retorno financeiro, com pico no período de fevereiro a março de 2008. Na Figura 10, estão representados os anos de início das lactações e os picos de produção de leite (em Kg) em cada lactação. O pico de produção de leite em condições normais de alimentação e saúde é um excelente indicador de manejo pré e pós-parto, como também de produção de leite durante a lactação.

Tabela 5. Dados produtivos e reprodutivos antes e durante surto clínico de *T. vivax* em fazenda de exploração leiteira de Igarapé - MG - 2006 a 2008.

	Antes do surto		Durante o surto		
	2006	1º /2007	2º /2007	1º /2008	2º /2008
Morte de vacas leiteiras	05	01	07	09	02
Abortos	19	04	07	11	04
Produção de leite (Kg)	497034	238900	222963	193156	177162
Vacas em produção	68	71	74	65	63
Média de produção diária (Kg/ cabeça)	20,4	17,3	17,7	14,7	16,9
Descarte de animais	10	12		14	
Natimortos*	02	05		02	
Dias em lactação **	205	234		283	
Taxa de gestação***	44,44	15,04		24,35	
Custo com drogas (R\$)****		800		5,600	

\* nascidos mortos e mortes ocorridas até 24h após nascimento.

\*\* no mês de novembro de cada ano (ideal  $\pm 180$ ).

\*\*\* número de vacas gestantes em relação ao número de inseminações/monta (dados parciais até setembro 2008).

\*\*\*\* Só o custo do Ganaseg plus (1ml para 10 kg).

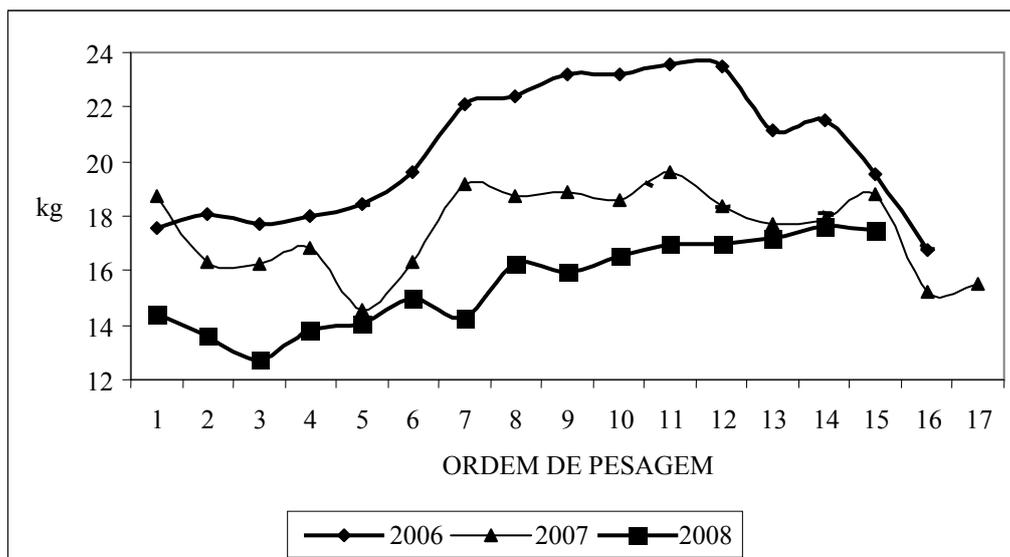


Figura 8. Produção média de leite conforme o ano dos partos (2006 a 2008) em propriedade rural de Igarapé, MG.

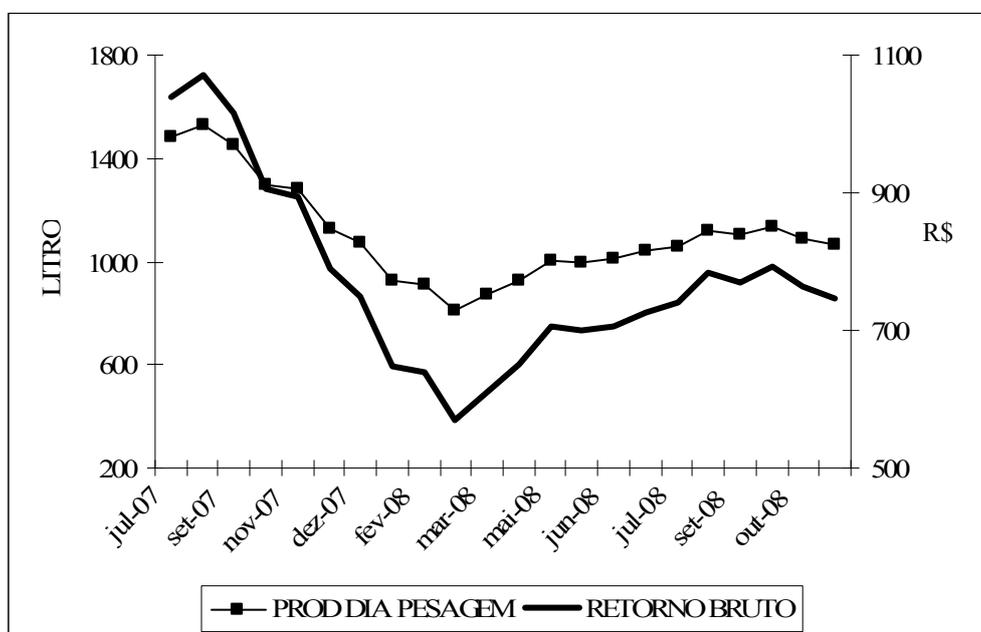


Figura 9. Produção de leite (L/ d) e retorno bruto/ dia (R\$) no rebanho bovino leiteiro de Igarapé, MG (preço por litro de leite de R\$ 0,70).

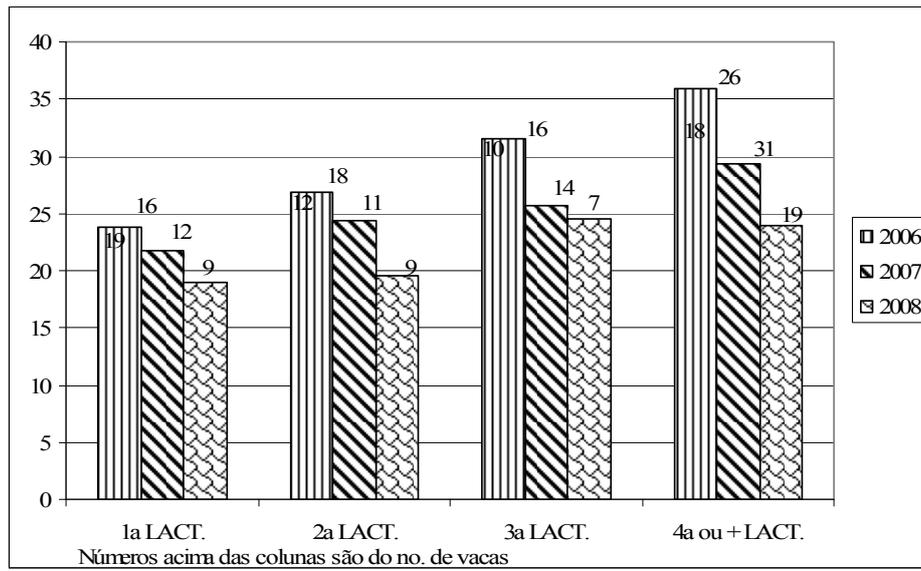


Figura 10. Pico de produção de leite (Kg) conforme a ordem e ano de início das lactações.

### 5.7. ACHADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS & DE NECROPSIA

Considerando-se uma média de 70 animais avaliados em cada coleta realizada, durante o período experimental, a morbidade causada por *T. vivax* no rebanho foi de 65,7% (46 vacas com sintomatologia clínica em 70 avaliadas), letalidade de 30,43% (14 óbitos em 46 doentes), e mortalidade de 20% (14 mortes em 70 vacas avaliadas).

Apesar da infecção não gerar sinais patognomônicos, de modo geral, os animais apresentaram febre, mucosas pálidas, anorexia, linfonodos palpáveis aumentados, frequências respiratória e cardíaca aumentadas, apatia e emagrecimento progressivo. Neste mesmo período, quatorze vacas abortaram e dois bezerros nasceram mortos (Figura 11). Entre quatro e cinco dias após o início dos sintomas, alguns animais permaneciam em decúbito esternal e vinham a óbito. Uma vaca apresentou sintomatologia nervosa (salivação excessiva, incoordenação motora e tremores musculares), permaneceu em decúbito lateral e teve que ser sacrificada.

Ao exame das lâminas de esfregaço sanguíneo dos animais positivos no teste de Woo, observaram-se formas tripomastigotas de *T. vivax* características. Em diversas lâminas, também pôde ser verificada anisocitose, policromasia e presença de corpos de Howell-Jolly.

Das quatorze vacas que vieram a óbito, quatro foram necropsiadas. Os principais achados macroscópicos observados foram: palidez de carcaça, líquido ascítico, linfonodos e hemolinfóides aumentados e edematosos com múltiplos pontos brancacentos circulares na região cortical (hiperplasia de folículo linfóide), hemorragias multifocais em diversos órgãos, tais como coração, fígado, baço e bexiga. Hepato e esplenomegalia, fígado com áreas de necrose em aspecto de “noz moscada” e vesícula biliar de tamanho aumentado também puderam ser observados. Um animal apresentou, ainda, edema alveolar com áreas de aderência do pulmão na cavidade torácica, possivelmente devido ao distúrbio hemodinâmico decorrente da anemia hemolítica (Figura 12). Miocardite e pericardite foram os principais achados histológicos, tendo sido encontrados intensos infiltrados multifocais de células mononucleares no interstício e no pericárdio.

De modo geral, os achados microscópicos foram linfonodos com hiperplasia moderada a intensa dos folículos linfóides e aumento da celularidade da região medular por linfócitos e histiócitos. Também se observou fígado com áreas multifocais aleatórias de

necrose e infiltrado inflamatório moderado constituído por linfócitos, histiócitos, neutrófilos e raras células gigantes multifocais. Presença de trombos e marginação de linfócitos e histiócitos, dilatação de sinusóides e arteríola centro-lobular. No interior de alguns vasos foram encontradas algumas estruturas filiformes fragmentadas, sugestivas do parasito. Os hepatócitos apresentavam degeneração vacuolar multifocal moderada. No baço, observou-se hiperplasia de polpa branca e áreas multifocais de necrose e, no coração, foram encontradas áreas multifocais de hemorragias discretas. Um animal apresentou rim com congestão difusa moderada mais intensa na região medular, com infiltrado inflamatório linfo-histiocitário multifocal moderado, principalmente perivascular e peri-glomerular, e presença de trombos multifocais discretos, sugestivo de um quadro de nefrite intersticial multifocal moderada.

Dos exames histopatológicos, pôde-se concluir que os animais sofreram de hepatite piogranulomatosa necrotizante multifocal, hiperplasia de foliculo linfóide intensa e baço com hiperplasia de polpa branca com necroses multifocais.



Figura 11. Sintomatologia clínica em vacas positivas parasitologicamente para *T. vivax*, acometidas por surto agudo em fazenda de exploração leiteira no município de Igarapé, MG. A: aborto; B: natimorto; C: intensa palidez de mucosa vaginal; D: vaca com baixa condição corporal.

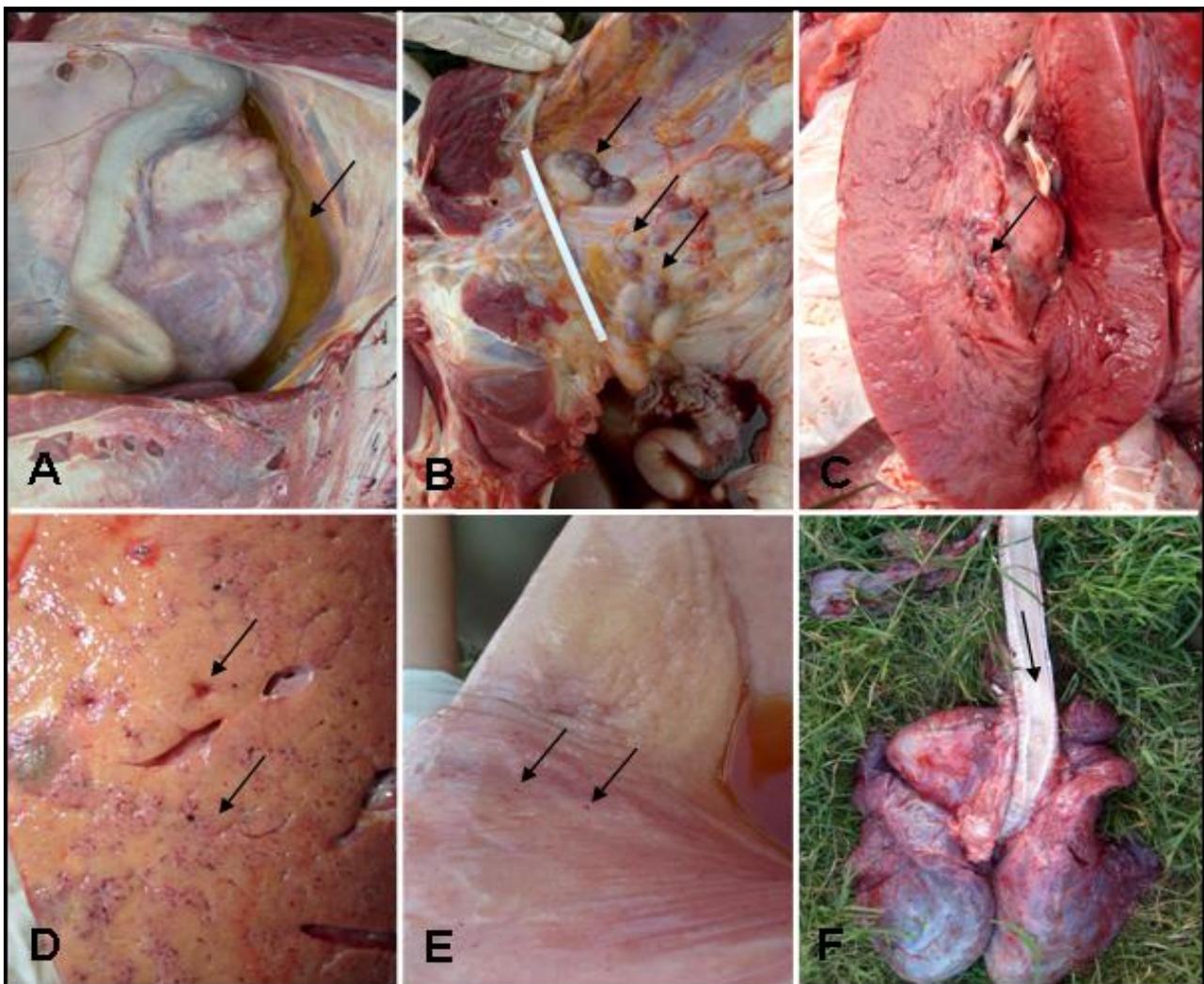


Figura 12. Achados macroscópicos em necropsias de vacas com infecção por *Trypanosoma vivax* em Igarapé, MG. A: líquido em cavidade abdominal (seta); B: hemolinfóides de tamanho aumentado (setas); C: pontos de hemorragia no coração (seta); D: áreas hemorrágicas e necróticas no fígado (setas); E: petéquias na bexiga (setas); F: edema traqueal (seta).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS

Os tripanosomas do subgênero *Duttonella* apresentam o cinetoplasto arredondado, de formato circular a elíptico e geralmente posicionado terminalmente (Hoare, 1972). *T. vivax* possui cinetoplasto maior que qualquer outra espécie patogênica, sendo esta uma característica distintiva (Uilenberg e Boyt, 1998). Os resultados obtidos da mensuração dos parasitos isolados de bovinos no município de Igarapé - MG assemelham-se a de outros isolados de *T. vivax* descritos em outros estados brasileiros (Tabela 5), confirmando-se o diagnóstico morfométrico. O *T. vivax* apresentou comprimento de  $19,89 \pm 2,15 \mu\text{m}$ , concordando com os dados de Hoare (1972), que afirma que as formas tripomastigotas podem variar de 18 a 31  $\mu\text{m}$  (incluindo o flagelo livre). Para Fairbairn (1953) (citado por Hoare, 1972), a média do comprimento total das formas tripomastigotas de *T. vivax* varia de 21,4 a 24,6  $\mu\text{m}$  para formas curtas e de 23,6 a 27  $\mu\text{m}$  para formas longas, sendo estas diferenças influenciadas pelo hospedeiro mamífero. Shaw e Lainson (1972) afirmam ainda que estas diferenças estejam associadas com a patogenicidade do isolado. Na África, o *T. vivax* é dividido em dois grupos conforme o seu comprimento: as formas mais curtas, de maior potencial patogênico, são encontradas na costa Oeste e causam a forma aguda da doença; e as formas longas, que causam um quadro crônico, estão presentes no Leste do continente (Fairbairn, 1953). Medidas obtidas de diversos isolados da América do Sul mostram que estes estão morfologicamente próximos às formas do oeste da África (Shaw e Lainson, 1972), apesar de diferirem antigenicamente das amostras africanas – devido a sua adaptação à transmissão mecânica e perda da capacidade de infectar moscas tsé-tsé (Woo, 1970; Dirie *et al.*, 1993). Segundo Uilenberg e Boyt (1998), as formas encontradas na América Latina geralmente são mais finas que as formas típicas africanas.

Durante o curso da infecção, as formas sanguíneas apresentam padrões morfológicos distintos (Osório *et al.*, 2008). Diversas formas podem ser vistas quando o parasito está sofrendo divisão no sangue de seu hospedeiro (Uilenberg e Boyt, 1998). Entretanto, Linhares *et al.* (2006) ressaltam a necessidade de estudos que esclareçam melhor as

variações morfométricas dos isolados brasileiros e sua relação com infecciosidade e virulência.

## 6.2. INFECÇÃO PATENTE

Nas quarenta e seis vacas diagnosticadas clinicamente com infecção por *T. vivax*, a anemia foi uma manifestação freqüente. A anemia é considerada a alteração mais freqüentemente observada em animais infectados natural ou experimentalmente por *T. vivax* em diversos trabalhos (Silva *et al.*, 1999; Paiva *et al.*, 2000a; Batista *et al.*, 2006), fato que corrobora com os achados do presente estudo. Segundo Jain (1986), os valores de volume globular normais para bovinos variam de 24 a 46% (média 35%). No presente estudo, constatou-se que os animais parasitologicamente positivos (tanto pela técnica de Woo, quanto pela PCR) apresentaram valores de VG significativamente mais baixos quando comparados com os não infectados. A maioria dos abortos e natimortos ocorridos na propriedade esteve associada com animais parasitologicamente positivos. Tais achados também foram verificados por Silva *et al.* (1999), no Pantanal, e Linhares *et al.* (2006), no estado do Tocantins. Entretanto, Davila *et al.* (2003), no Mato Grosso do Sul e Gonzáles *et al.* (2007), no Pantanal boliviano não encontraram diferenças entre os valores de VG dos animais positivos e negativos na PCR.

Murray *et al.* (1982) observaram que quedas de VG durante a fase patente da infecção estão associadas com perdas de peso dos animais. Portanto, a mensuração dos valores de VG pode ser utilizada como parâmetro indicativo para avaliar os impactos da tripanossomíase na produtividade dos animais, desde que outros fatores que também afetam tal parâmetro sejam excluídos.

No presente estudo, os animais com infecção patente não apresentaram VG correlacionado com a intensidade da parasitemia, o que discorda dos achados de García *et al.* (2006), que encontraram correlação negativa entre o VG e o escore de parasitemia de búfalos na Venezuela.

Desquesnes *et al.* (2008) verificaram que durante uma situação de surto pode-se considerar que o número de animais positivos no teste de Woo é igual ao número de animais

verdadeiramente infectados. Porém, em áreas enzoóticas, onde a maioria dos bovinos apresenta infecção crônica, o número de positivos ao exame parasitológico pode ser menor que o número de verdadeiramente infectados. Desquesnes e Tresse (1996) afirmam que a sensibilidade do teste de Woo é de 100% quando a parasitemia é acima de 700 tripanosomas/ ml de sangue, 80% entre 300 e 700 parasitos, 50% entre 60 e 300 parasitos, e muito baixa quando se tem menos de 60 tripanosomas/ ml de sangue. No presente estudo, a técnica de Woo apresentou sensibilidade de 75% e especificidade de 94% quando comparado com a PCR (padrão ouro). Este resultado sugere que o teste de Woo deva ser utilizado para detectar animais com infecções recentes no rebanho, ou mesmo os animais que estejam na fase aguda da doença.

### 6.3. SOROLOGIA

A maior sensibilidade dos testes sorológicos quando comparados com testes parasitológicos (Mattioli *et al.*, 2001) sugerem sua utilização em estudos epidemiológicos. A diferença entre as frequências de animais detectados pelo teste de Woo (7%) e pela RIFI (32%) pode estar relacionada à baixa sensibilidade que a primeira técnica possui. Além disso, a persistência dos anticorpos pode ocorrer por vários meses, mesmo após o tratamento curativo dos animais (Delafosse *et al.*, 2006).

Quando não é feito tratamento do rebanho, os soropositivos são considerados portadores do parasito ou animais que tiveram uma experiência recente com a infecção (Mattioli *et al.*, 2001). Uma vez estabelecido o tratamento com drogas tripanocidas, observa-se constante redução nos níveis de anticorpos. Além disso, existe a possibilidade de autocura em alguns animais, denominados tripanotolerantes (Wilson e Cunningham, 1971; Luckins, 1977).

O aumento da incidência no período chuvoso do ano (fevereiro de 2008) pode ser atribuído ao aumento da população de moscas *Stomoxys calcitrans*, o que corrobora com os resultados verificados nos mais diversos ecossistemas por outros autores (Martins *et al.*, 2008; Enwezor *et al.*, 2008). Entretanto, nas épocas mais secas do ano – junho e outubro de 2008 –, apesar da população de moscas ter diminuído drasticamente devido às baixas temperaturas e medidas sanitárias adotadas, notou-se uma elevação da incidência da infecção, assim como reações sorológicas com maiores títulos de anticorpos. Neste período,

os animais não apresentaram parasitemia ou sintomas clínicos da doença, dado também encontrado por Madruga (2004) no estado do MS. Altos níveis de anticorpos têm sido descritos como mecanismo eficiente para manter baixos níveis de parasitemia (Mattioli e Wilson, 1996), o que pode explicar tais achados. Além disso, este aumento observado no mês de outubro demonstra a ineficácia do tratamento com aceturato de diminazene. No presente estudo também se observou que os maiores títulos de anticorpos ocorreram no período em que todos os animais estavam negativos tanto parasitologicamente quanto pela PCR, discordando de Wilson e Cunningham (1971), que atribuem altos níveis de anticorpos à presença de parasitos circulantes. O que pode ter ocorrido é que mesmo após o parasito ter sido eliminado pelo tratamento ou pela resposta do hospedeiro, os animais continuaram a apresentar altos títulos de anticorpos devido ao estímulo ocorrido anteriormente.

Considerando-se a capacidade de controlar a parasitemia que os animais freqüentemente expostos ao parasito podem adquirir e que a fase crônica da doença está associada com parasitemias baixas e flutuantes, o estudo sorológico é importante na complementação dos exames parasitológicos. Além disso, a triagem sorológica possibilita estimar os riscos aos quais os animais estão expostos e avaliar os efeitos da infecção sobre a saúde dos mesmos. A presença de anticorpos contra *T. vivax* em animais que não apresentaram sintomatologia clínica e/ou negativos ao exame parasitológico sugere a ocorrência de doença subclínica. Isto pode estar ligado à capacidade de resposta do sistema imunológico de alguns animais (resistência inata ou adquirida) ou mesmo à baixa virulência do isolado de *T. vivax*. A virulência de tal amostra pôde ser observada após inoculação do caprino esplenectomizado que, apesar de ter apresentado alta parasitemia, não demonstrou doença clínica. Além disso, conforme demonstrado pelo seqüenciamento da amostra, sua similaridade com isolados do oeste da África comprova que podem ocorrer diferentes formas de manifestação clínica – de assintomática à síndrome hemorrágica aguda –, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro e da imunidade do animal infectado. Devido ao fato de que no Novo Mundo *T. vivax* é transmitido apenas mecanicamente, este apresenta um pequeno número de serodemas, que possibilita gerar um equilíbrio da doença mais rapidamente dentro do rebanho (Uzoigwe, 1986).

#### 6.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Durante a fase aguda da infecção, tanto a PCR quanto as técnicas parasitológicas possuem sensibilidades semelhantes, mas na fase crônica da doença a PCR pode ser de três a quatro vezes mais sensível (Desquesnes, 1997; Clausen *et al.*, 1998). No presente estudo, quando comparada ao teste de Woo, a PCR mostrou maior sensibilidade, fato que corrobora com diversos estudos (Desquesnes, 1997; Masake, 1997; Bengaly *et al.*, 2001; Gonzáles *et al.*, 2006; Gonzáles *et al.*, 2007). Assim, a PCR permite o diagnóstico de animais cronicamente infectados, os quais abrigam o parasito sem apresentarem altas parasitemias. Bengaly *et al.* (2001) encontraram sensibilidade de 40% na PCR na detecção de infecções em ovelhas experimentalmente infectadas por *T. vivax*, quando comparada com observações microscópicas. Entretanto, no presente estudo, quatro amostras positivas ao exame parasitológico estavam negativas na PCR, demonstrando que a PCR pode apresentar falso resultado negativo. Relatos de deficiência nesta técnica têm sido descritos na literatura (Gonzáles *et al.*, 2003; Gonzáles *et al.*, 2007). Com o objetivo de melhorar a sensibilidade deste teste, o volume das amostras foi aumentado, testando-se diferentes quantidades de DNA na reação de PCR: um, cinco e dez microlitros de DNA em 30µl de reação. Porém, não foram observadas diferenças nos resultados da PCR. Desquesnes e Dávila (2002) afirmam que parasitemias abaixo de 1 tripanosoma por litro de sangue (0,000001 tripanosoma/µl sangue) são responsáveis por resultados falso negativos na PCR. Segundo estes mesmos autores, a sensibilidade desta técnica só é confiável quando há entre 1 e 20 tripomastigotas por mililitro de sangue (0,001 a 0,02 tripanosoma/µl sangue) e, abaixo disto, a técnica falha em detectar a infecção. Ainda, existem os fatores de inibição da PCR que podem estar presentes nas amostras, como hemoglobina, EDTA ou mesmo DNAases, causando a destruição do DNA e da sequência específica investigada.

Em relação à presença de bandas de maiores pesos moleculares verificadas nos géis de agarose, Desquesnes *et al.* (2001) explicam que quando há excesso de DNA, produtos não específicos de tamanhos maiores do que os esperados são observados na maioria das amostras. A presença destes produtos pode, ainda, significar infecções mistas por mais de uma espécie de tripanosoma (Desquesnes *et al.*, 2002). Para comprovar tal hipótese, o seqüenciamento de tais produtos deve ser feito futuramente.

## 6.5. SEQÜENCIAMENTO

Os iniciadores utilizados neste estudo, descritos por Ventura *et al.* em 2001, amplificam o DNA de isolados de *T. vivax* do Brasil, Colômbia, Bolívia e do oeste da África. A identidade verificada de 97% entre a seqüência do isolado de *T. vivax* do presente estudo com a amostra isolada no município de Miranda, no Pantanal (MS) – a qual apresenta alta similaridade com amostras oriundas da Nigéria – corrobora com a afirmação de que as amostras brasileiras foram introduzidas neste continente por bovinos trazidos do oeste da África (Hoare, 1972; Dirie *et al.*, 1993). No trabalho desenvolvido por Ventura *et al.* (2001), foi encontrada similaridade de 100% no tamanho das repetições dos genes SL dos isolados do Brasil e do oeste da África. Dendogramas baseados no alinhamento das seqüências das unidades repetidas éxon e intron demonstraram a alta relação genética entre estas populações e definiram a posição taxonômica do *T. vivax* do Brasil. Este fato também confirma a hipótese de que a população inicial de *T. vivax* da América do Sul é originária do oeste da África (Madruga *et al.*, 1999; Ventura *et al.*, 2001). Outros estudos baseados em análises de isoenzimas, hibridação com DNA satélite e cinetoplástico e cariotipagem agruparam estas duas populações e as diferiram dos isolados do leste da África (Dirie *et al.*, 1993). Em estudos recentes, realizando-se análises filogenéticas baseadas em seqüências ribossomais conservadas (5.8S) e variáveis (regiões V7-V8 do rRNA SSU), mais uma vez as populações de *T. vivax* originárias da América do Sul e do oeste da África foram relacionadas taxonomicamente, além de ter sido encontrado alto polimorfismo (33%) destas com amostras do leste da África (Cortez *et al.*, 2006). Segundo Desquesnes e Dia (2004), a população de *T. vivax* existente na América Latina possui diversidade genética muito menor quando comparada às amostras africanas. Provavelmente este fato se explica devido à ausência de recombinação genética que ocorre em áreas onde não há transmissão cíclica do parasito. Apesar de geneticamente homogêneas, as populações brasileiras desencadeiam diferentes patologias, demonstrando que bovinos infectados com isolados de *T. vivax* muito semelhantes podem apresentar vários graus da doença ou mesmo se tornarem totalmente assintomáticos (Cortez *et al.*, 2006).

## 6.6. TRATAMENTO COM ACETURATO DE DIMINAZENE

Aceturato diminazene constitui a única droga com ação tripanocida liberada pelo Ministério da Agricultura para uso no território brasileiro. No intuito de controlar a infecção no rebanho, todos os animais da propriedade foram tratados com esta droga em abril de 2008. Entretanto, quando comparados os resultados das PCR's realizadas nas amostras colhidas em fevereiro (dois meses antes do tratamento) com as amostras de junho (dois meses após o tratamento), verifica-se que o tratamento não foi eficaz a ponto de eliminar a doença do rebanho e, tampouco, de impedir que novos animais se infectassem. Adicionalmente, a ausência de queda no título de anticorpos após o tratamento, que pode ser visualizada na Figura 5, reforça tal achado. Bengaly *et al.* (2001) demonstraram que a queda dos títulos de anticorpos ocorre dentro de 60 a 100 dias após tratamento com aceturato de diminazene. No entanto, em seu estudo, um animal teve aumento nos títulos de anticorpos – bem como a presença do DNA do tripanosoma confirmada pela PCR 40 dias após o tratamento – e teve que ser novamente tratado, desta vez com cloreto de isometamidium, ficando negativo somente oitenta e cinco dias após o tratamento.

Portanto, a susceptibilidade do *T. vivax* ao aceturato de diminazene deve ser avaliada futuramente, já que diversos casos de resistência a esta droga têm sido relatados em experimentos controlados e em campo (Betancourt, 1979; Peregrine e Mamman, 1994; Desquesnes *et al.*, 1995). Em estudo feito por Batista *et al.* (2008) em fazenda de um município da Paraíba, mesmo após seis aplicações de aceturato de diminazene em intervalos semanais, uma vaca apresentou recidiva clínica da enfermidade. Como forma de prevenir o estabelecimento de resistência do parasito à droga, alguns autores sugerem que a administração destes medicamentos seja feita somente em animais parasitados, evitando-se o tratamento em massa (Vargas e Arellano, 1997).

Vale ressaltar que o tratamento precoce, quando a parasitemia ainda está alta, além de evitar que os animais sofram com os sinais clínicos, contribui cessando a transmissão mecânica por moscas hematófagas.

## 6.7. EPIDEMIOLOGIA DO *T. vivax* NA PROPRIEDADE

Apesar de não estar clara a origem do surto ocorrido na propriedade, provavelmente foi em decorrência da introdução de animais no rebanho que apresentavam infecção subclínica. Linhares *et al.* (2006) ressaltam que há risco de ocorrência de surtos quando se movimentam rebanhos bovinos de áreas enzoóticas para áreas livres e vice-versa. Com o aumento da população de moscas *Stomoxys calcitrans* na propriedade, ocorrido no verão de 2007/2008, *T. vivax* encontrou meios de se dispersar pela categoria mais susceptível do rebanho: as vacas leiteiras. Estes animais ficam agrupados em currais onde, segundo Rodríguez-Batista *et al.* (2005), se concentra maior população de moscas. Batista *et al.* (2007; 2008), estudando a ocorrência de surtos por *T. vivax* na Paraíba, atribuíram a presença de vetores mecânicos, como tabanídeos e *Stomoxys* sp., como sendo um dos principais fatores responsáveis pela ocorrência desta enfermidade. *Stomoxys calcitrans*, que possui hábito hematófago, destaca-se como inseto veiculador de protozoários, helmintos, riquetsias, bactérias, fungos e vírus (Berberian, 1938; Foil *et al.*, 1983; Mattos Jr., 1986). Em Minas Gerais, *S. calcitrans* tem comportamento sazonal de seis meses, com pico populacional durante os meses mais chuvosos do ano (novembro a janeiro). Há uma forte correlação positiva entre a população desta mosca e temperatura e pluviosidade, ocorrendo drástica diminuição da população durante o período seco (julho a agosto) (Rodríguez-Batista *et al.*, 2005). Em um levantamento populacional de dípteros muscóides feito por Borges (2006) na região de Igarapé, notou-se que as populações de moscas flutuam de acordo com as condições climáticas, com picos nos meses mais quentes e úmidos.

Dávila *et al.* (2003) encontraram alta prevalência de tripanossomíase por *T. vivax* no período chuvoso, quando a população de moscas aumenta na região do Pantanal, confirmando tal observação. Assim como na África, nas Américas há uma associação temporal entre a estação das chuvas – quando moscas hematófagas são abundantes – e um aumento na prevalência do *T. vivax* no gado bovino (Silva *et al.*, 2004a). A transmissão mecânica é um fenômeno ocasional, com frequência e impacto muito variáveis. Para que haja transmissão mecânica de *T. vivax*, diversos fatores devem estar ocorrendo sincronizados, tais como altas parasitemias nos reservatórios, alta densidade de moscas, alta

susceptibilidade da maioria dos receptores e contato próximo entre receptores e doadores do parasito (Desquesnes *et al.*, 2008).

O local estudado trata-se de uma área livre da doença, já que os bovinos nunca haviam sido infectados por este parasito e, portanto, aqueles não possuíam imunidade ativa, o que desencadeou um surto agudo. Além disso, fatores predisponentes como manejo nutricional e estresse térmico podem ter contribuído para o estabelecimento do surto.

Búfalos e cervídeos, que também são apontados como reservatórios de *T. vivax* (Ventura *et al.*, 2001; Dávila *et al.*, 2003), não são encontrados nesta região. Entretanto, caprinos e ovinos estavam presentes na propriedade, apesar de não ter sido encontrado nenhum destes parasitologicamente positivo. Porém, este fato não descarta a possibilidade destes terem contribuído como reservatórios do parasito.

Apesar de as perdas econômicas causadas por *T. vivax* na América Latina – e principalmente no Brasil – ainda não terem sido bem estimadas até a presente data, sabe-se que esta tripanossomíase é a terceira doença parasitária mais importante economicamente neste continente, só ficando atrás das doenças causadas por carrapatos e fasciolose (Wells *et al.*, 1982). No presente estudo, as perdas econômicas no rebanho causadas por este parasito foram significativas, verificando-se aumento na mortalidade de animais adultos, bem como abortos e natimortos, além de quedas na produção. No ano de 2007, 85% das mortes de vacas leiteiras ocorreram no 2º semestre de 2007, época na qual se iniciou o surto. Verifica-se, ainda, um aumento da mortalidade no 1º semestre de 2008 em relação ao 2º semestre de 2007, que só teve uma diminuição no 2º semestre de 2008, quando o surto de tripanossomíase já havia sido controlado (Tabela 4). Seidl *et al.* (1999) afirmam que quando uma vaca morre antes do final de sua vida produtiva, o prejuízo do proprietário engloba tanto o valor do animal, quanto os futuros bezerros que ela viria a ter.

No Brasil, o custo anual estimado do tratamento preventivo de tripanossomíase bovina com cloreto de isometamidium é de até US\$ 37,80 por animal (Osório *et al.*, 2008). Seidl *et al.* (1999) calcularam que o custo do tratamento com aceturato de diminazene no Pantanal brasileiro, incluindo coleta de material, agulhas e seringas, é de US\$ 5,38 por cabeça. No presente estudo, foram gastos com tratamento curativo R\$ 800,00 em 2007 e R\$ 5.600,00

em 2008 utilizando-se o aceturato de diminazene (Tabela 4), o que totaliza R\$ 6.400,00 e 322 tratamentos realizados, chegando a um custo de R\$ 19,87 por tratamento.

A produção média de leite, retorno bruto por dia e os picos de produção de leite nos anos que antecederam o surto, quando comparadas aos anos nos quais ocorreu o surto, são boas representações dos impactos financeiros causados pela doença no rebanho.

A produção média de leite, que teve pesagem mínima de 17,55 Kg e máxima de 23,59 Kg em 2006, sofreu brusca queda em 2007, quando foi diagnosticado o surto de *T. vivax* na propriedade, variando de 14,53 a 19,62 Kg e queda ainda maior em 2008 (mínima de 12,7 Kg e máxima de 17,6 Kg), não tendo havido recuperação da produção inicial até o final do experimento (Figura 8 e Tabela 4). Como resultado desta queda, o retorno bruto financeiro, que era de R\$ 1.071,56 por dia antes do início do surto, a partir de setembro de 2007 sofreu queda de 47%, chegando a R\$ 569,31/dia em março de 2008, com ligeira recuperação, mas não ultrapassando o valor de R\$ 793,73 ao final do experimento, em outubro de 2008 (Figura 9). Na Figura 10 verifica-se grande queda no pico de produção das vacas que iniciaram a lactação em 2007 e 2008 em relação a 2006. Em 2006 as vacas tinham pico de produção de leite de 23,8 Kg na primeira lactação e chegavam a 35,9 Kg até a quarta lactação. Porém, em 2007 este pico caiu para 21,7 Kg na primeira lactação e 29,3 Kg na quarta lactação. Em 2008 esta queda foi ainda maior, variando de 19 Kg na primeira e não ultrapassando a marca dos 23,9 Kg na quarta lactação.

Vale destacar que nos anos estudados não houve alterações nutricionais, bem como mudanças na genética dos animais, ou nas instalações e manejo sanitário dos animais. Portanto, pode-se associar tais quedas de produção à doença.

## 6.8. SINTOMATOLOGIA CLÍNICA & ACHADOS DE NECROPSIA

Os sinais clínicos de febre, emagrecimento progressivo, mucosas pálidas, e aumento das frequências cardíaca e respiratória, apresentados pelos animais positivos para *T. vivax* no presente estudo, estão de acordo com os descritos na literatura (Laú, 1988; Silva *et al.*, 1999; Paiva *et al.*, 2000; Linhares *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2008). A sintomatologia nervosa descrita em uma vaca assemelha-se com os achados de Batista *et al.* (2007), que encontraram nove vacas com sinais nervosos decorrentes de infecção por *T. vivax* na Paraíba. No estudo citado, seis dos nove animais tiveram sintomatologia nervosa transitória e se recuperaram após o tratamento com aceturato de diminazene. Porém, alguns dias após, estes animais tiveram uma recaída e morreram. No presente estudo, o tratamento com aceturato de diminazene não foi eficaz, e a vaca teve que ser sacrificada depois de permanecer por vários dias em decúbito esternal e apresentando anorexia. As lesões nervosas causadas durante a infecção por tripanosomas têm sido associadas à presença destes parasitos em tecidos e fluidos cerebrospinais (Tuntasuvan *et al.*, 1997), às alterações circulatórias provocadas pela formação de êmbolos, à reações auto-imunes ocorridas no cérebro e apoptose de células endoteliais dos vasos do cérebro e cerebelo (Stiles *et al.*, 2004). Segundo Batista *et al.* (2007), além da grande mortalidade dos animais observada, as recaídas após o tratamento e a localização extra-vascular do tripanosoma no sistema nervoso central – que o protege das drogas tripanocidas – torna o prognóstico da doença desfavorável, já que estes animais poderão contribuir para a manutenção da doença no rebanho.

Na África, as tripanossomíases são consideradas as enfermidades de maior impacto sobre a reprodução e produtividade dos rebanhos (Silva *et al.*, 2004a). Os casos de abortos e natimortos ocorridos durante este estudo reforçam a hipótese de que *T. vivax* seja um importante agente etiológico das alterações reprodutivas em rebanhos bovinos. No Brasil, casos de desordens reprodutivas como estas também foram relatadas no Pantanal do Mato Grosso (Silva *et al.*, 2004a) e na Paraíba (Batista *et al.*, 2007). Silva *et al.* (2004a) relatam, ainda, que anemia acompanhada de aborto no terço final da gestação é um sinal clínico característico da tripanossomíase bovina no Pantanal e na Bolívia.

Anisocitose, policromasia e corpos de Howell-Jolly, observados ao exame dos esfregaços sanguíneos dos animais, são resultantes de mudanças regenerativas que ocorrem para compensar a perda de eritrócitos durante a infecção. Tais achados, indicativos de anemia, também foram observados por outros autores (Silva *et al.*, 1999; Paiva *et al.*, 2000a; Batista *et al.*, 2007).

Os achados de necropsia, de modo geral, assemelham-se aos encontrados por Batista *et al.* (2006) em infecção experimental de ovinos e Batista *et al.* (2008), em bovinos naturalmente infectados por *T. vivax*, tendo sido a miocardite e linfadenopatia os principais achados destes estudos. Segundo Kimeto *et al.* (1990), a severidade das lesões inflamatórias no coração está relacionada com a localização extravascular do parasito. As alterações clínicas, hematológicas e anatomopatológicas encontradas nos bovinos naturalmente infectados por *T. vivax* confirmam a patogenicidade do isolado de Igarapé, MG.

## 7. CONCLUSÕES

- Este é o primeiro relato da ocorrência do *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais, tendo sido feitas as confirmações morfológicas e moleculares;
- A técnica de Woo e a determinação do VG podem ser utilizadas na identificação de animais durante a fase aguda da infecção em casos de surto de *T. vivax*;
- A PCR é mais sensível que as técnicas de detecção parasitológicas, embora seja passível de apresentar resultados falso negativos quando a parasitemia por *T. vivax* é muito baixa;
- Surtos de *T. vivax* causam perdas econômicas expressivas em rebanhos bovinos leiteiros, relacionadas principalmente com a mortalidade de animais adultos, abortos e redução de produção de leite.

## REFERÊNCIAS

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

ALICE-WEB: Sistema de análise das informações de comércio exterior via internet. Brasília, DF: Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Secretaria de Comércio Exterior, 2007. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em: dez. 2007.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

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

ASHCROFT, M.T. The polymorphism of *Trypanosoma brucei* and *T. rhodesiense*, its relation to relapses and remissions of infections in with rats, and the effect of cortisone. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.51, p.301-311, 1957.

ASHCROFT, M.T.; BURTT, E.; FAIRBAIRN, H., The experimental infection of some African wild animals with *Trypanosoma rhodesiense*, *T. brucei* and *T. congolense*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 53, p. 147–161, 1959.

BARBOSA JR, N.S.; MADRUGA, C.R.; OSÓRIO, A.L.A.R.; RIBEIRO, L.R.R.; ALMEIDA, R.F.C. Descrição de surto de tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax*, com morte perinatal no Pantanal de Aquidauana, MS. **Anais...** IV Congresso Brasileiro de Buiatria, Campo Grande, MS, p. 135, 2001.

BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA, R.C.; GUERRA, J.L. Infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 26, n. 1, p. 31-37, 2006.

BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M.M.G.; MADRUGA, C.R.; SIMÕES, S.D.V.; MAIA, T.F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet. Parasitol.*, v. 143, p. 174-181, 2007.

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

BENGALY, Z.; KASBARI, M.; DESQUESNES, M.; SIDIBE, I. Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. *Vet. Parasitol.*, v. 96, n. 2, p. 101-113, 2001.

- BERBERIAN, D.A. Sucessfull transmission of cutaneous leishmaniosis by the bites of *Stomoxys calcitrans*. Proceedings of Society. *Exp. Biol. Med.*, v.38, p. 254–256, 1938.
- BETANCOURT, A.; WELLS, E.A. Pérdidas económicas en un brote de tripanosomiasis bovina causada por *Trypanosoma vivax*. *Revta Asoc. Colomb. Med. Vet. Zoot.*, v. 3, p. 6-9, 1979.
- BITTENCOURT, A.J. *Aspectos clínico-epidemiológicos de Stomoxys calcitrans (Linnaeus, 1758) em bovinos e eqüinos em Espírito Santo do Pinhal, SP*. 120 p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.
- BORGES, M.A.Z. *Flutuação populacional de dípteros muscóides (Diptera: Muscomorpha), parasitóides e foréticos predadores, Igarapé, MG*. 103 p. Tese de Doutorado em Ciência Animal – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- BOULHOSA, J. Informação Científica, Boletim Técnico Ministério da Agricultura, p. 21-26, 1946.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, v. 4, p. 389-396, 1962.
- BURGDORFER, W.; SCHMIDT, M.L.; HOOGSTRAAL, H. Detection of *Trypanosoma theileri* in Etipian Cattle Ticks. *Acta Trop.*, v. 30, p. 340-346, 1973.
- CARINI, A. Présence de trypanosomes chez bovidés, à São Paulo. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, v. 4, p. 191-192, 1911.
- CARVALHO, A.U.; ABRÃO, D.C.; FACURY FILHO, E.J.; PAES, P.R.O.; RIBEIRO, M.F.B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.3, p.769-771, 2008.
- CLARKSON, M.J. Trypanosomiasis of domesticated animals of South America. Seminar on Trypanosomiasis – Species of the subgenus and their potential usefulness. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; v. 70, n. 2, p.125-126, 1976.
- CLAUSEN, P.H.; WIEMANN, A.; PATZELT, R.; KAKAIRE, D.; OESTZSCH, C.; PEREGRINE, A.; MEHLITZ, D. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. in naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 29, p. 21–31, 1998.
- CORDOVES, C.O.; FERNANDES, C.; GARCIA-AVILA, I.; BROCHE, G.R. *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905). Lista de transmissores mecânicos em Cuba. *Revta Cubana Cienc. Vet.*, v.13, n.2, p.219-221, 1982.
- CORTEZ, A.P.; VENTURA, R.M.; RODRIGUES, A.C.; BATISTA, J.S.; PAIVA, F.; AÑEZ, N.; MACHADO, R.Z.; GIBSON, W.C.; TEIXEIRA, M.M.G. The taxonomic and

philogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*, v. 133, p. 159-169, 2006.

DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A.M.S. Animal Trypanosomiasis in South America - Current status, partnership and information technology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 916, p. 199-212 2000.

DÁVILA, A.M.; 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. *Braz. Vet. Parasitol.*, v. 117, p. 1–13, 2003.

DE ALMEIDA, P.P.; NDAO, M.; MEIRVENNE, N.V.; GEERTS, S. Diagnostic evaluation of PCR on dried blood samples from goats experimentally infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Trop.*, v. 70, p. 269-276, 1998.

DELAFOSSÉ, A.; THE'BAUD, E.; DESQUESNES, M.; MICHAUX, Y. Epidemiology of *Trypanosoma vivax* infection in cattle in the tse-tse free area of Lake Chad. *Prev. Vet. Med.*, v. 74, p. 108–119, 2006.

DESQUESNES, M.; DE LA ROQUE S.; PEREGRINE A. S. French Guyanan stock of *Trypanosoma vivax* resistant to diminazene aceturate. *Acta Trop.*, v. 60, p. 133-136, 1995.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation of the sensitivity of the Woo test for the detection of *Trypanosoma vivax*. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.*, v. 49, p. 315-321, 1996.

DESQUESNES, M. Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen–enzyme-linked immuno sorbent assay. *Acta Trop.*, v. 65, p. 139–148, 1997.

DESQUESNES, M.; MCLAUGHLIN, G.; ZOUNGRANA, A.; DÁVILA, A.M.R.. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int. J. Parasitol.* v. 31 p. 610-614, 2001.

DESQUESNES, M.; BITEAU-COROLLER, F.; BOUYER, J.; DIA, M.L. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *Int. J. Parasitol.* (2008), doi:10.1016/j.ijpara.2008.07.004

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

DIA, M.L. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Vet. Parasitol.*, v. 119, n. 1, p. 9-19, 2004.

DIRIE, M.F.; OTTE, M.J.; HATTHI, R.; GARDINER, P.R. Comparative studies of *Trypanosoma vivax* isolates from Colombia. *Parasitol.*, v.106, n.1, p.21-29, 1993.

- ENWEZOR, F.N.C.; UMOH, J.U.; ESIEVO, K.A.N.; HALID, I.; ZARIA, L.T.; ANERE, J.I. Survey of bovine trypanosomosis in the Kachia Grazing Reserve, Kaduna State, Nigeria, *Vet. Parasitol.* (2008), doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.032
- ESIEVO, K.A.N.; SAROR, D.I.; ILEMOBADE, A.A.; HALLAWAY, M.H. Variation in erythrocyte surface and free serum sialic acid concentrations during experimental *T.vivax* infection in cattle. *Res. Vet. Sci.*, v. 32, p. 1-5, 1982.
- ESIEVO, K.A.N.; JAYE, A.; ANDREWS, J.N. Electrophoresis of bovine erythrocyte sialic acids: existence of additional bands in trypanotolerant N'Dama cattle. *J. Comp. Pathol.*, v.102, p.357-361, 1990.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. *Genome Res.*, v. 8, p. 186-194, 1998.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. African animal trypanosomiasis selected articles from the World Animal Review. Rome, 1983. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/010/ah809e/AH809E05.htm>> Acesso em: Jan. 2008.
- FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations.. Faostat. Rome, 2006. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569>>. Acesso em: 20 Dez. 2007.
- FERRANTE, A. Trypanolytic activity, agglutinins, and opsonins in sera from animals refractory to *Trypanosoma lewisi*. *Infect. Immun.*, v.49, p.378-382, 1985.
- FERRAZ, J.V.; FIGUEIREDO JR, G.A. 2003. SIC - Serviço de Informação da Carne. Disponível em <<http://www.sic.org.br/producao.asp#numeros>>. Acesso em: 21 Dez. 2007.
- FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W. *Epidemiologia Clínica*. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1989. 312 p.
- FOIL, L.D.; MEEK, C.L.; ADAMS, W.V.; ISSEL, C.J. Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Crysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, n. 1, p.155- 156, 1983.
- GARCÍA, H.; GARCÍA, M.E.; PÉREZ, G.; BETHENCOURT, A.; ZERPA, É.; PÉREZ, H.; MENDONZA-LEÓN, A. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 100, n. 4, p. 297-305, 2006.
- GONZÁLEZ, L.E.; GARCÍA, J.A.; NÚÑEZ, C.; PERRONE, T.M.; GONZÁLEZ-BARADAT, B.; GONZATTI, M.I.; REYNA-BELLO, A. *Trypanosoma vivax*: A novel method for purification from experimentally infected sheep blood. *Exp. Parasitol.*, v. 111, p. 126-129, 2005.

- GONZALES, J.L., JONES, T.W., PICOZZY, K., CUELLAR, R.H. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of bovine tripanosomiasis and epidemiological surveillance in Bolivia. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, v. 2, n. 8, 2003. Disponível em <<http://www.kinetoplastids.com/content/2/1/8>>. Acesso em: Dez. 2007.
- GONZALES, J.L.; LOZA, A.; CHACON, E. Sensitivity of different *Trypanosoma vivax* specific primers for the diagnosis of livestock trypanosomosis using different DNA extraction methods. *Vet. Parasitol.*, v. 136, p. 119–126, 2006.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.*, v. 8, p. 195-202, 1998.
- GUERRA, R.M.S.N.C.; JUNIOR, A.B.F.; SANTOS, H.P.; ABREU-SILVA, A.L.; SANTOS, A.C.G. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in state of Maranhão, Brasil. *Ciênc. Rural*, v.38, n.3, p.833-835, 2008.
- HERBERT, I.V. *Trypanosoma theileri* Laveran 1902, a cosmopolitan parasite of cattle. *Vet. Bull.*, v. 34, n. 10, p. 563, 1964.
- HERRERA, H.M.; DÁVILA, A.M.R.; NOREK, A.; ABREU, U.G.; SOUZA, S.S.; D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.125, p.263-275, 2004.
- HERRERA, H.M.; RADEMAKER, V.; ABREU, U.G.P.; D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. Variables that modulate the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Acta Trop.*, v. 102, n.1, p. 55-62, 2007.
- HOARE, C.A. The Classification of Trypanosomes of Veterinary and Medical Importance. *Veterinary Reviews and Annotations*, v.3, n.1, p.1-13, 1957.
- HOARE, C.A. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. Revision of the systematics. *J. Protozool.*, v. 11, p. 200- 207, 1964.
- HOARE, C.A. The trypanosomes of mammals, In: HOARE, C.A. *A zoological Monograph Classification*.(Ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. p. 60-80.
- HORN, S.C. As tripanossomoses no Brasil. Boletim de Defesa Sanitária Animal, Ministério da Agricultura – Secretaria Nacional de Defesa Sanitária Animal. Brasília, DF, 1984.
- IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal – Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, Brasil, v. 34, p.1-62, 2006. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2006/default.shtm>> Acesso em: Dez. 2007.
- ILRAD. Trypanosomiasis. Annual Report of the International Laboratory for Research on Animal Diseases, p. 24-43, 1983.

- JAIN, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. 4 ed. Philadelphia: Lea and Febinger, 1986. 1221 p.
- JONES, T.; DÁVILA, A.M.R. *Trypanosoma vivax* out of África. *Trends Parasitol.*, v.2, n.17, p.99-101, 2001.
- KALU, A.U.; EDEGHERE, H.U.; LAWANI, F.A. Comparison of diagnostic techniques during subclinical single infections of trypanosomiasis in goats. *Vet. Parasitol.* v. 22, n. 2, p. 37-47, 1986.
- KIMETO, B.A.; MUGERA, G.M.; NYAGA, P.N. Haemorrhagic pancarditis in cattle infected with *Trypanosoma vivax*. *Vet. Parasitol.*, v. 34, p. 295-301, 1990.
- LÁU, D.H. Sintomas e Tratamento da Tripanossomíase (*T. vivax*) em búfalos. EMBRAPA/CPATU, Boletim de Pesquisa, n. 90, p. 13, 1988.
- LAFFERTY, K. D. Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment? *Parasitol. Today*, n. 13, p. 251–255, 1997.
- LEGER, M.; VIENNE, M. Epizootie à trypanosomes chez les Bovidés de la Guyane française. *Bull. Soc. Path. Exot.*, v. 12, p. 258- 266, 1919.
- LEJON, V.; REBESKI, D.E.; NDAO, M.; BAELMANS, R.; WINGER, E.M.; FAYE, D.; GEERTS, S.; BUSCHER, P. Performance of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies against *T. congolense* and *T. vivax* in goats. *Vet. Parasitol.*, v. 116, n. 2, p. 87- 95, 2003.
- LEVINE, N.D. *Protozoan parasites of Domestic Animals and of Man*. 2 ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1973., 406p.
- LINHARES, G.F.C.; FILHO, F.C.D.; FERNANDES, P.R.; DUARTE, S.C. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins: relato de caso. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 7, n. 4, p. 455-460, 2006.
- LÓPEZ, G.; THOMPSON, K.C.; BAZALAR, H. Transmisión experimental de *Trypanosoma vivax* por la garrapata *Boophilus microplus*. *Rev. Inst. Colomb. Agropec.*, n. 14, p. 96, 1979.
- LOSOS, G.J. Infectious tropical diseases of domestic animals. Harlow Essex: Longman Scientific and Technical, 1986. 938 p.
- LUCKINS, A.G. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 9, p. 53–62, 1977.
- 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. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v. 10, p. 149-159, 1978.

- LUN, Z.R.; DESSER, S.S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? *Parasitol. Today*, v.11, p.131-133, 1995.
- MADRUGA, C.R. Frequência de anticorpos para *Trypanosoma vivax* no cerrado sul do Estado do Mato Grosso. *Vet. Bull.*, v. 34, n. 563, p. 1-7, 1964.
- MADRUGA, C.R.; MORZARIA, S.; MAJIWA, P. 1999. Caracterização genética do *Trypanosoma vivax* no Pantanal do estado de Mato Grosso e o diagnóstico diferencial da infecção por *Trypanosoma evansi* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Pesquisa em Andamento. *Embrapa Gado de Corte* 49: 1-5. Disponível em <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/pa/pa49.html>. Acesso em: Jun. 2008.
- MADRUGA, C.R. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanosoma (Duttonella) vivax* no Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, n. 1, p.46-47, 2004.
- MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER, I.B.; RIBEIRO, L.R.; KESSLER, R.H.; SOARES, C.O.; MIGUITA, M.; MELO, E.P.S.; ALMEIDA, R.F.C.; LIMA JR, M.M.S.C. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 7, 2006.
- MAGONA, J.W.; MAYEND, D.J.S.; OLAHO-MUKANI, W.; COLEMAN, P.G.; JONSON, N.N.; WELBURN, S.C.; EISLER, M.C. A comparative study on the clinical, parasitological and molecular diagnosis of bovine trypanosomosis in Uganda. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 70, p. 213-218, 2003.
- MARTINS, C.F.; MADRUGA, C.R.; KOLLER, W.W.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O.; KESSLER, R.H.; MELO, E.S.P.; RIOS, L.R.; ALMEIDA, R.C.F.; LIMA JR, M.S.C.; BARROS, A.T.M.; MARQUES, L.C. *Trypanosoma vivax* infection dynamics in a cattle herd maintained in a transition area between Pantanal lowlands and highlands of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 28, n. 1, p. 51-56, 2008.
- MASAKE, R.A. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. *Vet. Rec.*, v. 13, p. 551-557, 1980.
- MASAKE, R.A.; NANTULYA, V.M.; PELLÉ, R.; MAKAU, J.M.; GATHUO, ONESMO, K.; OLE-MOIYOI, K. A specie specific antigen of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* detectable in the course of infection is encoded by a differentially tandemly-reiterated gene. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 64, p. 207-218, 1994.
- MASAKE, R.A.; MAJIWA, P.A.O.; MOLOO, S.K.; MAKAU, J.M.; NJUGUNA, J.T.; MAINA, M.; KABATA, J.; OLE LOI YOI, O.K.; NANTULYA, V.M. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Exp. Parasitol.*, v. 85, p. 193-205, 1997.

MASIGA, D.K.; SMYTH, A.J.; HAYES, P.; BROMIDGE, T.J.; GIBSON, W.C. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.*, v. 22, p. 909-918, 1992.

MATTOS JUNIOR, D.G. O impacto econômico causado pela ação das principais moscas que atacam o gado bovino brasileiro. *Hora Veterinária*, v. 6, n. 34, p. 55-60, 1986.

MATTIOLI, R.C.; FAYE, J.A.; JAITNER, J. Estimation of trypanosomal status by the buffy coat technique and an antibody ELISA for assessment of the impact of trypanosomosis on health and productivity of N'Dama cattle in The Gambia. *Vet. Parasitol.*, v. 95, n. 1, p. 25-35, 2001.

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

MELÉNDEZ, R.D., FORLANO, M., FIGUEROA, W. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. *J. Parasitol.*, v. 79, p. 293-294, 1993.

MORZARIA, S.P.; LATIF, A.A.; JONGEJAN, F.; WALKER, A.R. Transmission of a *Trypanosoma* sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Vet. Parasitol.*, v. 19, p. 13-21, 1986.

MURRAY, M.; MURRAY, P.K.; McINTYRE, W.I.M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 71, p. 317-318, 1977.

MURRAY, M.; MORRISON, W.L.; WHITELAW, D.D. Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance. *Adv. Parasitol.*, v. 21, p. 1-68, 1982.

NAESSENS, J.; TEALE, A.J.; SILEGHEM, M. Identification of mechanisms of natural resistance to African trypanosomiasis in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.87, p.187-194, 2002.

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

NIELSEN, K.; SHEPPARD, J.; HOLMES, W.; TIZARD, I. Experimental bovine trypanosomiasis: Changes in serum immunoglobulins, complement and complement components in infected animals. *Immunol.*, v.35, p.817-826, 1978.

**Normas Climatológicas 1961-1990.** Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Brasília: MARA, 1992, 84 p.

OKECH, G.; DOLAN, R.B.; STEVENSON P.; ALUSHULA, H.; WATSON, E.D.; LUCKINS, A.G.; OMUSE, J.K. The effect of trypanosomosis on pregnancy in trypanotolerant Orma Boran cattle. *Theriogenology*, v. 46, n. 3, p. 441-447, 1996.

- OSÓRIO, A.L.A.R.; MADRUGA, C.R.; DESQUESNES, M.; SOARES, C.O.; RIBEIRO, L.R.R.; COSTA, S.C.G. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis and introduction in the New World – A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.103, n.1, p. 1-13, 2008.
- OTTE, M.J.; ABAUBARA, J.Y.; WELLS, E.A. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v.26, p.146-156, 1994.
- PAIVA, F.; LEMOS, R.A.A.; OSHIRO, E.T.; SALVADOR, S.C.; NAKAZATO L. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 6, n. 2, supl.1, p. 349, 1997.
- PAIVA, F.; LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO L.; MORI, A.E.; BRUM, K.B.; BERNARDO, K.C. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: I- Acompanhamento clínico, laboratorial e anátomopatológico de rebanhos infectados. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.9, n.2, p.135-141, 2000a.
- PAIVA, F.; NAKAZATO L.; BERNARDO, K.C.; BRUM, K.B. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: III- Teste comparativo entre drogas comerciais. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.9, n.2, p.149-151, 2000b.
- PALING, R.W.; MOLOO, S.K.; SCOTT, J.R.; MCODIMBA, F.A.; LOGAN-HENFREY, L.L.; MURRAY, M.; WILLIAMS, D.J.L. Susceptibility of N'Dama and Boran cattle to tsetse-transmitted primary and rechallenge infections with a homologous serodeme of *Trypanosoma congolense*. *Parasit. Immunol.*, v.13, n.4, p.413-425, 1991.
- PEREGRINE, A.S. Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. *Vet. Parasitol.*, v. 54, n. 1-3, p. 223-48, 1994.
- PEREGRINE, A.S.; MAMMAN, M. Pharmacology of diminazene: a review. *Acta Trop.*, v. 54, p. 185-203, 1994.
- PERRY, B.D.; RANDOLPH, T.F.; MCDERMOTT, K.R.; SONES, K.R.; THORNTON, P.K. Investing in animal health research to alleviate poverty. ILRI (International Livestock Research Institute), Nairobi, Quênia, 2002. 148 p.
- PLATT, K.B.; ADAMS, L.G. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for detecting *Trypanosoma vivax* in South America cattle. *Res. Vet. Sci.*, v. 21, p. 53-58, 1976.
- REBESKI, D.E.; WINGER, E.M.; ROGOVIC, B.; ROBINSON, M.M.; CROWTHER, J.R.; DWINGER, R.H. Improved Methods for the Diagnosis of African Trypanosomosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 2, p. 249-253, 1999.
- RODRÍGUEZ-BATISTA, Z.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R.; LOPES, C.M.L.; BORGES, L.M.F. Populational dynamics of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae) in three biocenosis, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 130, p. 343–346, 2005.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSEN, A.R.. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SAROR, D.I. Classification of the anaemia of bovine trypanosomosis. *Vet. Rec.*, v. 105, p. 95–98, 1979.
- SCHENK, M.A.M.; MENDONÇA, C.L.; MADRUGA, C.R.; KOHAYAGAWA, A.; ARAÚJO, F.R. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 21, n. 4, p. 157-161, 2001.
- SEIDL, A.; MORAES, A.S.; SILVA, R.A.M.S. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Prev. Vet. Med.*, v. 33, p. 219-234, 1998.
- SEIDL, A.; DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A.M.S. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian lowlands. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 269–272, 1999.
- SHAW, J.J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 66, n. 1, p. 25-32, 1972.
- SILVA, R.A.M.S.; AROSEMENA, N.A.E.; HERRERA, H.M.; SAHIB, C.A.; FERREIRA, M.S. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal matogrossense, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.60, p.167-171, 1995.
- SILVA, R.A.M.S.; DA SILVA, J.A.; SCHNEIDER, R.C.; DE FREITAS, J.; MESQUITA, D.P.; MESQUITA, T.C.; RAMIREZ, L.; DA VILA, A.M.R.; PEREIRA, M.E.B. Outbreak of Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal. Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 52, p. 561–562, 1996.
- SILVA, R.A.M.S.; MORALES, G.; EULERT, E.; MONTENEGRO, A.; YBAÑEZ, R. Outbreaks of trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in bovines of Bolivia. *Vet. Parasitol.*, v. 76, p. 153–157, 1998.
- SILVA, R.A.M.S.; RAMIREZ, L.; SOUZA, S.S.; ORTIZ, A.G.; PEREIRA, S.R.; DÁVILA, A.M.R. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. *Vet. Parasitol.*, v. 85, p. 87–93, 1999.
- SILVA, R.A.M.S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A.M.R. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia, Diagnóstico e Controle. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Corumbá, Brasil, 2002. 140 p.
- SILVA, R.A.M.S.; PELLEGRIM, A.O.; LIMA, E.S.S.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, AM.R. Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia., EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Corumbá, Brasil, Dez. 2004a. ISSN 1517-1981.

- SILVA, R.A.M.S.; LIMA, E.S.S.; RAMIREZ, L. Quimioterapia das Tripanossomoses ocorrentes no Pantanal. Documentos 65, EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Corumbá, Brasil, 2004b. 26 p.
- SIMO, G.; ASONGANYI, T.; NKININ, S.W.; NJIOKOU, F.; HERDER, S. High prevalence of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon. *Vet. Parasitol.*, v. 139, n. 1-3, p. 57-66, 2006.
- SNOW, W.F.; RAWLINGS, P. Methods for the rapid appraisal of African animal trypanosomosis in the Gâmbia. *Prev. Vet. Med.*, v. 42, p. 67-86, 1999.
- SOLTYS, M. A.; WOO, P.T.K. African trypanosomes in livestock. In: KREIER, J.P. *Parasitic Protozoa.*, ed. 2. London: Academic press., 1978. v. 2, p. 241.
- STILES, J.K.; WHITTAKER, J.; SARFO, Y.B.; THOMPSON, W.E.; POWELL, M.D.; BOND, V.C. Trypanosome apoptotic factor mediates apoptosis in human brain vascular endothelial cells. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 133, p. 229–240, 2004.
- TAYLOR, K.A. Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic. *Int. J. Parasitol.*, v.31, p.219-240, 1998.
- TAYLOR, K.A.; MERTENS, B. Immune Response of Cattle Infected with African Trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 2, p. 239-244, 1999.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TUNTASUVAN, D.; SARATAPHAN, N.; NISHIKAWA, H. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. *Vet. Parasitol.*, v. 73, p. 357–363, 1997.
- UILENBERG, G.; BOYT, W.P. A Field Guide for the Diagnosis, Treatment and Prevention of African Animal Trypanosomosis. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1998. 158 p.
- USDA: United States Department of Agriculture. Production, supply and distribution online. Reports. Livestock. Cattle selected countries summary. Washington, D.C., 2007. Disponível em <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: Dez. 2007.
- UZOIGWE, N.R. Self-cure in Zebu calves experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Vet. Parasitol.*, v. 22, p. 141– 146, 1986.
- VAN DEN BOSSCHE, P.; ROWLANDS, G.J. The relationship between the parasitological prevalence of trypanosomal infections in cattle and herd average packed cell volume. *Acta Trop.*, v. 78, n. 2, p.163-70, 2001.

VARGAS T.M.; ARELLANO S.C. La tripanosomiasis bovina en América Latina y el Caribe. *Veterinaria (Montevideo)*, v. 33, p. 17-21, 1997.

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

WELLDE, B.T.; CHUMO, D.A.; ONYANGO, F.K.; REARDON, M.J.; ROBERTS, L.M.; NJOGU, A.R.; OPIYO, E.A. *Trypanosoma vivax*: disseminated intravascular coagulation in cattle. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 83, supl. 1, p. 177-183, 1989.

WELLS, E.A.; BETANCOURT, A.; RAMIREZ, L.E. *Trypanosoma vivax* in Colombia epidemiology and impact. *FAO-World Animal*, v. 43, p. 17-23, 1982.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Technical Report Series, n. 529, p. 30, 1973.

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

**ANEXOS**