



MATHEUS DE OLIVEIRA REIS

***Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DE MINAS GERAIS:
ACHADOS EPIDEMIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES**

**LAVRAS – MG
2017**

MATHEUS DE OLIVEIRA REIS

***Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DE MINAS GERAIS: ACHADOS
EPIDEMIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Patologia Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora
Prof^a. Dra. Ana Paula Peconick
Co-orientadora

**LAVRAS – MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Reis, Matheus de Oliveira.

Trypanosoma vivax em bovinos de Minas Gerais: achados
epidemiológicos, morfológicos e moleculares / Matheus de Oliveira
Reis. - 2017.

40 p.

Orientador(a): Mary Suzan Varaschin.

Coorientador(a): Ana Paula Peconick.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Doenças parasitárias. 2. Tripanossomíase. 3.
Tripanossomose. I. Varaschin, Mary Suzan. II. Peconick, Ana
Paula. III. Título.

MATHEUS DE OLIVEIRA REIS

***Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DE MINAS GERAIS: ACHADOS
EPIDEMIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

***Trypanosoma vivax* IN CATTLE FROM MINAS GERAIS STATE:
EPIDEMIOLOGICAL, MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR FINDINGS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Patologia Animal, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 17 de agosto de 2017

Dra. Mary Suzan Varaschin UFLA
Dra. Ana Paula Peconick UFLA
Dra. Angélica Terezinha Barth Wouters UFLA
Dr. Felipe Pierezan UFMG

Prof^a. Dra. Mary Suzan Varaschin
Orientadora

Prof^a. Dra. Ana Paula Peconick
Co-orientadora

LAVRAS – MG

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear a cada dia com o dom da vida, saúde e luz em meu caminho.

À minha mãe, por ser um lindo exemplo de pessoa, na qual me espelho desde sempre. Você é uma pessoa incrível, rica em empatia. O mundo necessita disso e eu sou eternamente grato por ser seu filho. Agradeço o apoio em todos os momentos.

A meus avós, sou imensamente grato a vocês por mostrarem como a vida é boa sendo simples, por mostrarem que quem batalha alcança seus sonhos, mesmo que eles pareçam inatingíveis.

A Universidade Federal de Lavras, por fazer parte da minha história desde o ano de 2009. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A Mary Suzan Varaschin, minha orientadora, que vai ser para sempre meu exemplo de que orientar é conduzir, mostrar o melhor caminho para que adquiramos conhecimento o suficiente para caminhar, um dia, por nossa própria conta.

Aos demais professores da Patologia, Angélica Wouters, Djeison Raymundo e Flademir Wouters, é um privilégio aprender com vocês a cada dia. Com certeza esse tempo de aprendizado foi de uma valia imensurável.

A Ana Paula Peconick, minha co-orientadora, que teve paciência de me ensinar sobre assuntos até então desconhecidos. Você é um exemplo de profissional e de pessoa. Você traz luz por onde passa.

A todos os pós-graduandos do Setor de Patologia Veterinária, obrigado pela ajuda na execução deste trabalho. Em especial a Adriana Albuquerque, Fernanda Souza e Paula Borges por serem amigas e um porto seguro.

Aos estagiários do Setor, obrigado por toda a ajuda de vocês, em especial, aos alunos de Iniciação Científica, Fernanda Monteiro e Luan Oliveira.

Muito obrigado!

“Deixe a sua alma em tudo o que fizer, para quando chegar o dia da despedida final, a vida fale de ti com os olhos marejados de saudade.” (Zack Magiese)

RESUMO

A tripanossomíase é uma doença causada por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma*, sendo *T. vivax* o agente etiológico mais importante para bovinos. O objetivo deste trabalho foi descrever a expansão da infecção por *T. vivax* em diferentes mesorregiões de Minas Gerais, os achados clinicopatológicos da tripanossomíase em bovinos e avaliar a eficiência do tratamento utilizado. Uma epizootia de tripanossomíase em bovinos ocorreu de 2015 a 2017 nas mesorregiões de Campo das Vertentes, Centro-Oeste e Sul e Sudoeste de Minas Gerais. Como formas de diagnóstico foram utilizados a visualização de formas tripomastigotas do parasito em esfregaços sanguíneos, PCR e sequenciamento de algumas amostras. Os principais sinais clínicos observados foram apatia, queda na produção de leite, emagrecimento progressivo e alterações reprodutivas. Foram acompanhados 11 rebanhos positivos para *Trypanosoma* sp.e destes (propriedades A, H e I) necropsiadas três vacas, com achado de baixo escore corporal, mucosas pálidas e baço com hiperplasia da polpa branca. Em cinco propriedades positivas para *T. vivax*, testadas após o tratamento com cloridrato de isometamidium, a PCR do sangue resultou negativa para o agente. O sequenciamento das amostras mostrou homologia quando comparado com sequências de *T. vivax*. Estes achados demonstram a expansão de *T. vivax* no estado de Minas Gerais, causando redução da produção leiteira, emagrecimento, apatia e alterações reprodutivas. O esfregaço associado à técnica da PCR permite maior precisão no diagnóstico. O medicamento à base de cloridrato de isometamidium se mostrou eficaz no tratamento da enfermidade.

Palavras-chave: Anemia. Doenças parasitárias. Doença neurológica. Ruminantes. Tripanossomíase.

ABSTRACT

Trypanosomiasis is a disease caused by a pathogenic protozoa of the genus *Trypanosoma*, and *T. vivax* is the most important etiologic agent for cattle. The aim of this work was to describe the expansion of *T. vivax* in different mesoregions of Minas Gerais State, the clinicopathological findings of trypanosomiasis in cattle and to evaluate the efficiency of the treatment used. The epizooty of trypanosomiasis in cattle occurred between 2015 and 2017 in the mesoregions of Campo das Verentes, Midwest and South and Southwest of Minas Gerais. As diagnostic forms, the visualization of trypomastigote forms in blood smears, PCR and DNA sequencing of some samples were used. The main clinical signs observed were apathy, drop in milk production, weight loss and reproductive failures. There were examined 11 herds and three cows were necropsied (Properties A, H and I). The most important macroscopic lesions were low corporal score, pale mucosa and spleen with white pulp hyperplasia. In five positive properties for *T. vivax*, tested after treatment with isometamidium hydrochloride, blood PCR was negative for the agent. The DNA sequencing showed 100% homology when compared to NCBI. These findings demonstrate the expansion of *T. vivax* in the state of Minas Gerais. The blood smears associated to PCR allows a better precision in the diagnosis. The isometamidium hydrochloride base has proved to be effective in treating the disease.

Keywords: Anemia. Parasitic diseases. Neurologic diseases. Ruminants. Trypanosomiasis.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1.INTRODUÇÃO.....	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1. Etiologia.....	9
2.2. Taxonomia.....	9
2.3. Ciclo biológico.....	9
2.4. Morfologia.....	13
2.5. Epidemiologia.....	14
2.6. Sinais clínicos.....	14
2.7. Aspectos imunológicos.....	15
2.8 Diagnóstico.....	15
2.8.1. Esfregaço sanguíneo.....	15
2.8.2. Lesão de necropsia e histopatologia.....	16
2.8.3. PCR.....	17
2.9. Tratamento.....	17
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPITULO 2	
ARTIGO – Infecção epizoótica por <i>Trypanosoma vivax</i> em bovinos de Minas Gerais, Brasil.....	22
ANEXO 1 – Sequências amostradas	40

INTRODUÇÃO

As mortes de bovinos associadas às várias espécies de *Trypanosoma* na África podem chegar a três milhões de mortes/ano, com um prejuízo econômico na pecuária de aproximadamente US\$ 1.2 bilhões (CHAMOND et al., 2010). Minas Gerais possui um rebanho bovino efetivo de 23.707.042 cabeças, bastante significativo na Região Sudeste, principalmente no que diz respeito à pecuária de leite. O estado é considerado o maior produtor de leite no Brasil, responsável pela produção de 9.367.470 de litros em 2015 (IBGE, 2015), desta forma, o impacto da tripanossomíase para a economia da região pode ser considerável.

O primeiro relato de infecção por *T. vivax* no Brasil ocorreu em búfalos no estado do Pará em 1972 (SHAW; LAINSON, 1972), porém a tripanossomíase bovina no Brasil é pouco investigada, apesar de relatos da doença em várias regiões do Brasil (SILVA et al., 1997, BATISTA et al., 2007, CARVALHO et al., 2008, CADIOLI et al., 2012).

Manifestações clínicas associadas à tripanossomíase são inespecíficas, de forma que ela pode ser confundida com outras doenças. A tripanossomíase em ruminantes tem sido relacionada com sinais clínicos de apatia, anorexia, febre, anemia severa, perda de peso (SILVA et al., 1997; BATISTA et al., 2007, GALIZA et al., 2011), alterações neurológicas como incoordenação, hipermetria, tremores musculares, fasciculações, opistótono, cegueira, estrabismo (SILVA et al., 1997; BATISTA et al., 2007) e pressão da cabeça contra obstáculos (GALIZA et al., 2011). Também são relatados abortos e mortes neonatais (GALIZA et al., 2011). Porém, em visitas a propriedades na área de estudo com tripanossomíase, a infecção foi identificada também em bovinos clinicamente normais, podendo estes animais estar numa fase inicial da doença ou convivendo com o parasito, sugerindo o aparecimento de cepas adaptadas ao hospedeiro vertebrado. A severidade da doença depende da cepa parasitária, se a ocorrência é endêmica e também da espécie hospedeira, porém aspectos importantes da interação de *T. vivax* e seus hospedeiros continuam desconhecidos (CHAMOND et al., 2010). Várias evidências fragmentadas apontam para a importância de fatores genéticos do hospedeiro vertebrado para determinar a suscetibilidade individual e/ou resistência à infecção (CHAMOND et al., 2010).

Lesões microscópicas podem ser um indicativo da doença, sendo descritas hiperplasia da polpa branca do baço e nefrite intersticial. Quando há acometimento do sistema nervoso central (SNC), podem ocorrer meningite, meningoencefalite e meningoencefalomielite

(BATISTA et al., 2008). Por não serem lesões características, outras doenças devem ser incluídas no diagnóstico diferencial. Sendo assim, para o diagnóstico conclusivo torna-se necessária a realização de esfregaços sanguíneos, necropsia, avaliação histopatológica e PCR. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais, em relação ao diagnóstico parasitológico, de necropsia, histopatológico e por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), visando contribuir para a ampliação do conhecimento sobre a biologia e a morfologia de *T. vivax*, para a melhoria dos métodos de diagnóstico, de medidas preventivas para essa parasitose, bem como para o aprimoramento e o crescimento da bovinocultura no estado de Minas Gerais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Etiologia

A tripanossomíase é uma doença causada por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma* (BATISTA et al., 2007), sendo as espécies *T. vivax* e *T. evansi* de importância para a pecuária brasileira (SILVA et al., 2002). *T. vivax* é considerado o agente mais importante da tripanossomíase em bovinos (BATISTA et al., 2007, BATISTA et al., 2008) e ovinos (GALIZA et al., 2011). *T. evansi* é considerado bastante patogênico para equinos, causando o “Mal das cadeiras”. Já em bovinos, asininos, caprinos e ovinos a doença causada por *T. evansi* ocorre de forma mais branda (CARNEIRO, 2010).

2.2. Taxonomia

Trypanosoma vivax pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, espécie *Trypanosoma vivax*, subgênero *Duttonellae* (CARNEIRO, 2010, SOULSBY, 1982).

2.3. Ciclo biológico

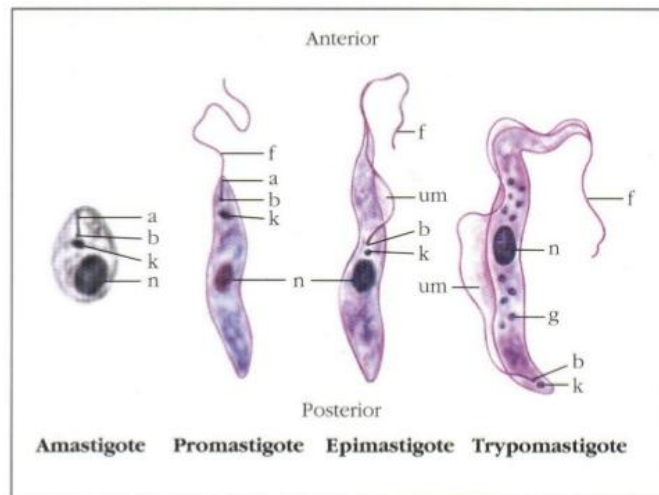
Os tripanossomas são divididos com base no modo de transmissão em Seção Stercoraria e Seção Salivaria. Na Stercoraria a transmissão é contaminativa, ou seja, o agente é transmitido através das fezes do hospedeiro invertebrado. Nesta seção está *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, que tem como hospedeiro vertebrado humanos, primatas, cães, gatos e reservatórios silvestres; e como hospedeiros invertebrados os hemípteros, conhecidos como “barbeiros” (CARNEIRO, 2010). Na seção Salivaria a transmissão ocorre pela picada do hospedeiro invertebrado ou por inoculação direta. Esta Seção inclui *T. vivax* e

T. evansi, os agentes mais importantes da tripanossomíase na América do Sul (SILVA et al., 2002).

Durante seu ciclo biológico os tripanossomas podem apresentar formas estruturalmente distintas, denominados estádios (Figura 1). Os estádios têm a seguinte terminologia: amastigota - corpo arredondado, sem flagelo livre; promastigota - corpo alongado, com flagelo na extremidade anterior, sem membrana ondulante; epimastigota - o cinetoplasto é próximo e anterior ao núcleo e o flagelo sai livremente, com membrana ondulante curta; tripomastigota metacíclico - nome dado para a forma infectante no hospedeiro vertebrado, possui as mesmas características dos tripomastigotas, porém são menores; tripomastigota - o blefaroplasto (estrutura onde se origina o flagelo) e o cinetoplasto (organela formada por um segmento de mitocôndria que contém um tipo especial de DNA, o kDNA, que nomeia a ordem Kinetoplastida) são posteriores ao núcleo e próximos à extremidade posterior, a membrana ondulante percorre todo o corpo do parasito e há flagelo livre na extremidade anterior (CARNEIRO, 2010; SOULSBY, 1982).

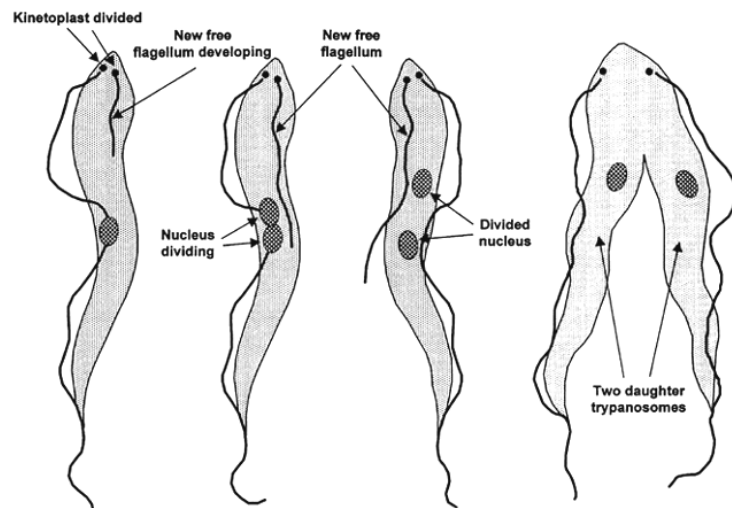
No hospedeiro vertebrado não se observa reprodução sexuada no ciclo de vida de *Trypanosoma* spp., todos se multiplicam por fissão binária (Figuras 2 e 3) ou múltipla (Figura 3). A divisão começa no cinetoplasto, seguido do núcleo e do citoplasma. Na Seção Salivaria, a divisão é principalmente no estágio tripomastigota e ocorre no sangue. Em poucas situações outros estágios de desenvolvimento têm sido detectados; por exemplo, formas intracelulares foram observadas em espécies do subgênero *Nannomonas* (inclui as espécies *T. congolense*, *T. dimorphon* e *T. simiae*, os quais podem infectar bovinos) e *Trypanozoon* (entre eles *T. brucei*, *T. evansi*, que podem infectar bovinos) (SOULSBY, 1982).

Figura 1. Estádios biológicos de *Trypanosoma* sp. a: axonema; b: blefaroplasto; f: flagelo; g: retículo granular; k: cinetoplasto; n: núcleo; um: membrana ondulante.



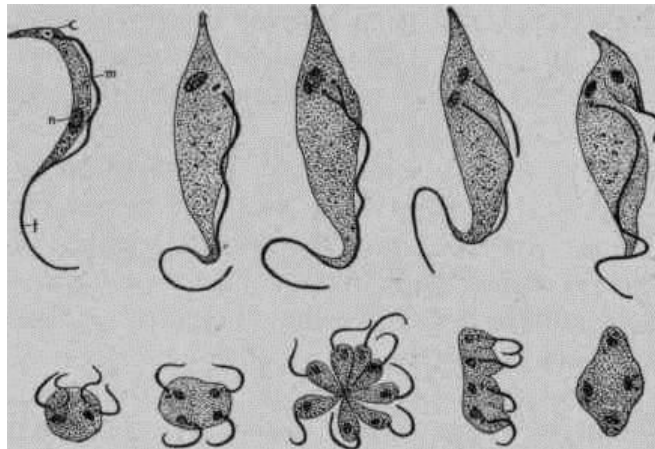
(Adaptado de: <http://image.slidesharecdn.com/trypanosomayleishmaniaclassmicro-130917085121-phpapp02/95/trypanosoma-y-leishmania-clase-micro-4-638.jpg?cb=1379408007>)

Figura2. Divisão de *Trypanosoma* sp. por fissão binária



(Adaptado de: <http://www.fao.org/docrep/006/x0413e/X0413E02.gif>)

Figura 3. Divisão de *Trypanosoma* sp. por fissão binária e múltipla. c: cinetoplasto; m: membrana ondulante; n: núcleo; f: flagelo

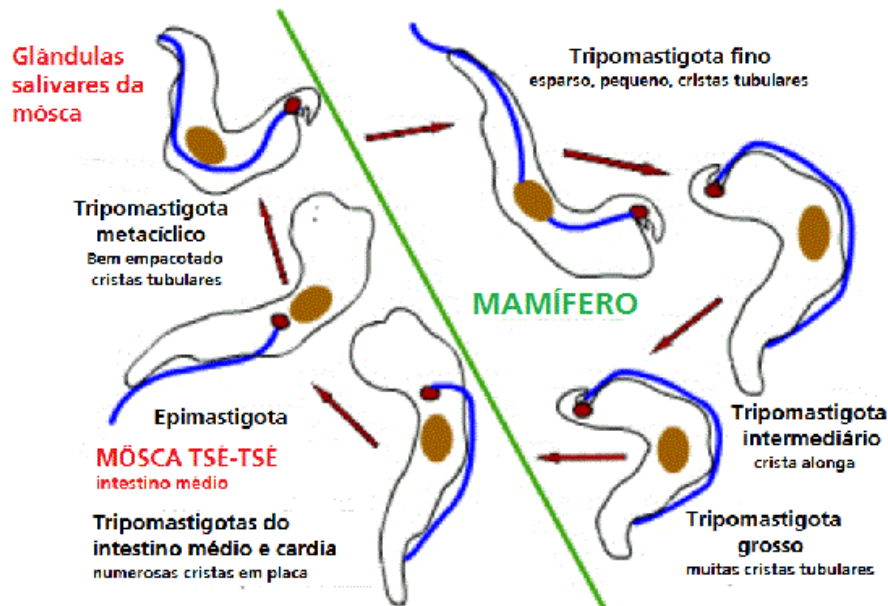


(Fonte <http://chestofbooks.com/health/disease/Pathology/images/Trypanosoma-showing-Multiplication-by-Division-fromLaveran.jpg>)

T. vivax tem como hospedeiro vertebrado animais ungulados domésticos e silvestres e como vetores *Stomoxys* sp. e tabanídeos (CARNEIRO, 2010), porém, pode ser transmitido artificialmente por agulhas compartilhadas durante aplicações de vacinas e medicamentos (SILVA et al., 1997). Esta adaptação à transmissão mecânica permitiu a disseminação da infecção por *T. vivax* para a América Central e do Sul (BATISTA et al., 2008). A transmissão cíclica de *T. vivax* só ocorre na mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.) na África (CARNEIRO, 2010). As moscas tsé-tsé se infectam com as formas tripomastigotas sanguíneas, que se transformam em formas epimastigotas no esôfago e na faringe do inseto. Essas formas migram para o canal alimentar do inseto-vetor, onde se multiplicam. Em seguida migram novamente em direção à hipofaringe para se desenvolverem em tripomastigotas, as quais se transformarão em tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes (SILVA et al., 2002). As tripomastigotas metacíclicas acumuladas em partes bucais e glândula salivar do artrópodo são transmitidas (Figura 4) quando este se alimenta de sangue de animais vertebrados (SOULSBY, 1982).

A mosca tsé-tsé pode transmitir o parasito de forma cíclica por toda sua vida, já a habilidade para transmissão mecânica dos tripanossomas é de curta duração (minutos), o que depende da sobrevivência dos parasitos nas peças bucais do inseto (SILVA et al., 2002).

Figura 4. Ciclo biológico de *Trypanosoma* sp. na mosca tsé-tsé.

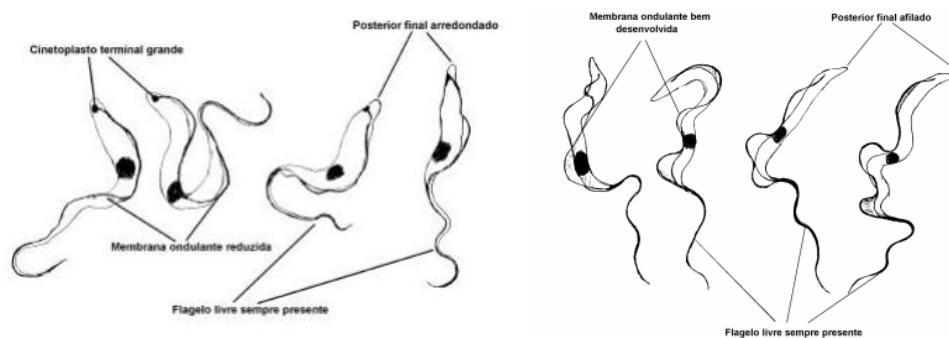


(Fonte: <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/CHAP%203%20fig5a.gif>)

2.4. Morfologia

T. vivax é achatado, tem forma de foice, núcleo grande e central, cinetoplasto grande, extremidade posterior arredondada e um flagelo livre (CARNEIRO, 2010). Ele deve ser diferenciado de *T. evansi*, que possui os mesmos vetores de *T. vivax* e, na sua forma tripomastigota, apresenta núcleo bem visível, cinetoplasto pequeno (praticamente invisível), membrana ondulante bem visível e grânulos no citoplasma (Figura 5) (CARNEIRO, 2010).

Figura 5. Morfologia de *Trypanosoma vivax* e *T. evansi* (Fonte: SILVA et al., 2002)



2.5. Epidemiologia

A tripanossomíase por *T. vivax* é uma doença que acomete bovinos (BATISTA et al., 2007), ovinos (GALIZA et al., 2011), caprinos, equinos, camelos, búfalos e antílopes (RIET-CORREA, 2007). O primeiro relato de infecção por *T. vivax* no Brasil ocorreu em búfalos no estado do Pará em 1972 (SHAW; LAINSON, 1972). Posteriormente, casos de tripanossomíase por *T. vivax* foram diagnosticados em bovinos nos estados do Amapá (SERRA-FREIRE, 1981), Mato Grosso (SILVA et al., 1996), Mato Grosso do Sul (PAIVA et al., 1997), Tocantins (LINHARES et al., 2006), Paraíba (BATISTA et al., 2008), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009), Maranhão (MELO et al., 2011) e São Paulo (CADIOLI et al., 2012, SALGADO et al., 2011). Também foram identificados caprinos infectados no estado de Santa Catarina (FÁVERO et al., 2016) e equinos no Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2011). Em Minas Gerais, o primeiro diagnóstico ocorreu na região de Igarapé, região metropolitana de Belo Horizonte (CARVALHO et al., 2008), porém, a doença tem se alastrado pelo estado, sendo diagnosticada na Região Sul e Sudoeste de Minas Gerais (REIS et al., 2016). Estes achados demonstram a disseminação da infecção pelo parasito no estado de Minas Gerais.

A doença apresenta alta morbidade e, geralmente, baixa mortalidade. Em um surto ocorrido no Semiárido Brasileiro, de 130 vacas da propriedade 64 (49.2%) tiveram manifestações clínicas e 11 (8.4%) vieram a óbito (BATISTA et al., 2007).

Casos de infecção por *T. evansi* foram diagnosticados em cavalos, cães, quatis, capivaras, bovinos, marsupiais, morcegos e tatus no Pantanal (HERRERA et al., 2004). Alguns fatores de risco possibilitam que os animais adquiram e transmitam o agente através de vetores, como o agrupamento de animais de diferentes propriedades em locais de descanso durante viagens longas e compartilhamento de agulhas (SILVA et al., 1997), sendo que o aumento da população de mutucas (*Tabanus* sp.) e moscas dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) pode predispor a ocorrência de surtos (BATISTA et al., 2008).

2.6. Sinais clínicos

Em bovinos são observadas apatia, anorexia, febre, anemia severa e perda de peso. Em alguns casos pode haver alterações neurológicas, como incoordenação, hipermetria, tremores musculares, fasciculações, opistótono, cegueira e estrabismo (SILVA et al., 1997; BATISTA et al., 2007).

Ovinos afetados apresentam mucosas pálidas, perda de apetite, perda de peso, pelos arrepiados, edema submandibular, diarreia e morte. Em casos de acometimento do SNC pode

haver apatia, tremores musculares e pressão da cabeça contra obstáculos. Também são relatados abortos e mortes neonatais (GALIZA et al., 2011).

No Rio Grande do Sul, cavalos que tinham manifestação de mucosas pálidas, febre, perda de peso e edema em região ventral do corpo, incluindo prepúcio ou vulva foram diagnosticados com *T. vivax* em esfregaços sanguíneos e PCR (SILVA et al., 2011).

2.7 Aspectos imunológicos

Um achado importante para os tripanossomas da seção Salivaria é a habilidade destes organismos de evadir (escapar) do sistema imune do hospedeiro vertebrado pela produção de cepas com diferentes características antigênicas, resultando em sucessivas ondas de parasitemia em intervalos de poucos dias; cada onda representa a multiplicação de uma população de um novo tipo antigênico. O decréscimo da parasitemia representa a destruição dessa determinada população por anticorpos. Sendo assim, a persistência da infecção ocorre por falhas da resposta imune às mudanças repetitivas nas suas características antigênicas (SOULSBY, 1982).

Desta forma, proteínas de superfície foram identificadas em *T. vivax*, sendo o antígeno GM6 de *Trypanosoma vivax* (TvGM6) associado ao flagelo (PILLAY et al., 2013), e a ILDat 2.1 expressa por tripanossomas da Uganda adaptados a passagens em camundongos (Gardiner et al., 1996). Essa variação antigênica é importante para a resposta imunológica contra o agente e para a cronicidade da infecção, possibilitando a transmissão do agente para outros animais suscetíveis (Gardiner et al., 1996). Sabe-se que em amostras de tripanossoma na África essas proteínas são encontradas, porém estudos são necessários para a identificação de proteínas de superfície expressas por tripanossomas no Brasil, já que neste país a doença não é transmitida de forma cíclica e sim por meios mecânicos, o que pode implicar em variações na expressão destas proteínas de superfície.

2.8 Diagnóstico:

2.8.1. Esfregaço sanguíneo:

Permite a visualização de estruturas parasitárias na forma de tripomastigotas. As características morfológicas desta forma de *T. vivax* são forma de foice e achatado, núcleo

grande e central, cinetoplasto grande, extremidade posterior arredondada e um flagelo livre (CARNEIRO, 2010).

Em um estudo experimental com caprinos foram observados tripanossomas nos esfregaços sanguíneos de todos os animais infectados no 3º dia após infecção. A parasitemia aumentou progressivamente, atingindo nível máximo entre 7º e 14º dia após infecção. Posteriormente, houve diminuição rápida para níveis baixos, alternados com períodos em que os parasitos não eram detectáveis por exame direto de esfregaços de sangue, o que evidencia a característica de intermitência desses parasitos no sangue (RODRIGUES et al., 2013).

2.8.2. Lesões de necropsia e histopatologia

Os achados de necropsia em bovinos incluem aumento de volume em linfonodos e baço, com polpa branca proeminente (BATISTA et al., 2007). Também são descritas petéquias e equimoses multifocais em pulmões, coração, baço, fígado, rins, vesícula urinária, vesícula biliar, trato gastrointestinal e nas superfícies serosas das cavidades pericárdica, torácica e abdominal (GARDINER et al., 1989). No exame histopatológico essas lesões se caracterizam por hiperplasia da polpa branca do baço, nefrite intersticial (BATISTA et al., 2007), congestão e hemorragia em vários órgãos (GARDINER et al., 1989).

Em ovinos são relatados perda da condição corporal, mucosas pálidas, sangue mais aquoso, linfonodos e baço discretamente aumentados de volume, atrofia da gordura pericárdica, líquido translúcido em cavidades torácica e abdominal e no saco pericárdico (GALIZA et al., 2011). Camundongos experimentalmente inoculados tiveram lesões semelhantes às dos ruminantes, com esplenomegalia acentuada por aumento de polpa branca. O fígado apresentava focos brancacentos discretos, variando de 0,05 a 0,2 cm (CHAMOND et al., 2010).

Em casos de acometimento do SNC em bovinos pode haver espessamento e amarelamento das meninges (BATISTA et al., 2007). Microscopicamente podem ser observadas meningite, meningoencefalite, meningoencefalomielite, com infiltrado de linfócitos, plasmócitos, células Mott e macrófagos, assim como áreas de malácia com vacuolização do neurópilo, células Gitter e linfócitos, além de esferoides axonais (BATISTA et al., 2007).

Alterações reprodutivas são frequentes. Em um estudo com infecção experimental em ovelhas gestantes foi demonstrada positividade na PCR em 100% dos fetos, além de lesões histológicas, como encefalite e miocardite, em alguns deles. Houve, ainda, necrose do epitélio

coriônico da placenta de algumas ovelhas, o que demonstra que há passagem transplacentária do agente (SILVA et al., 2013).

Cabras infectadas experimentalmente, quando comparadas aos animais controles, apresentaram ovários reduzidos de tamanho, com superfície lisa, sem folículos ou corpo lúteo, demonstrando inatividade ovariana, com anestro (RODRIGUES et al., 2013). Na avaliação histológica houve redução significativa no número de folículos primordiais e primários nas cabras infectadas, enquanto o número de folículos no grupo controle permaneceu normal, evidenciando desenvolvimento folicular inicial anormal (RODRIGUES et al., 2013).

Em um estudo com infecção experimental de ovinos machos foram observadas flacidez e palidez testicular. Na avaliação histopatológica houve degeneração testicular, caracterizada por diminuição de células da linhagem germinativa e diminuição da altura do epitélio seminífero (BEZERRA et al., 2008). A patogenia envolvida nas lesões reprodutivas não está bem elucidada. Algumas hipóteses são relacionadas, como a hipertermia, que pode atuar no processo degenerativo testicular, além da possibilidade do próprio parasito ser causador direto da lesão nos tecidos, já que houve detecção do seu DNA pela técnica da PCR nos órgãos reprodutivos (RODRIGUES et al., 2013).

2.8.3. PCR

A PCR tem sido descrita como uma técnica bastante sensível para a detecção de *T. vivax*, sendo utilizadas algumas sequências de genes que codificam proteases de cisteína (Cathepsina L) e utilizam como primers os oligonucleotídeos Tvi2 (forward: 5' GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA 3') e DTO156 (reverse: 5' TTAGAATTCCCAGGAGTTCTTGATGATCCAGTA 3'), que amplificam 177 pares de base (CORTEZ et al., 2009, SILVA et al., 2013, CADIOLI et al., 2015).

2.9 Tratamento

Para o tratamento eficaz é necessário levar em conta vários parâmetros, como a gravidade da doença, os vetores associados, a severidade da anemia, o estado nutricional do animal e a prescrição de um fármaco apropriado (CHAMOND et al., 2010). Atualmente no Brasil utiliza-se no tratamento um tripanocida injetável à base de cloreto de isometamidium.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estes achados demonstram uma expansão da infecção por *T. vivax* no estado de Minas Gerais, sendo responsável por grandes perdas econômicas quando o diagnóstico não é realizado rapidamente. O esfregaço sanguíneo associado à técnica da PCR permite a confirmação diagnóstica. O tratamento com fármaco à base de cloridrato de isometamidium foi eficaz nos casos tratados.

REFERÊNCIAS

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

BATISTA, J.S. et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 63–69, 2008.

BEZERRA, F.S.B. et al. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p.575-582, 2008.

CADIOLI, F.A. et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 118-124. 2012.

CADIOLI, F.A. et al. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during a parasitemic periods. **Veterinary Parasitology**,v. 214, p. 174-177, 2015.

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

CARVALHO, A.U. et al. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**,v. 60, p. 769-771, 2008.

CHAMOND, N. et al. P. *Trypanosoma vivax* infections: pushing ahead with mouse models for the study of *Nagana*. I. Parasitological, hematological and pathological parameters. **Plos Neglected Tropical Diseases**,v. 4, n.8, p. 792, 2010.

CORTEZ, A.P. et al. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - characterization, relationships and diagnostic implications. **Molecular and Cellular Probes**,v. 23, p. 44-51, 2009.

CUGLOVICI, D.A. et al. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 320-326, 2010.

FÁVERO, J.F. et al. *Trypanosoma vivax* infection in goat in west of Santa Catarina state, Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, p. 497-499. 2016.

GALIZA, G. J. N. et al. High mortality and lesions of the central nervous system in Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 359–363, 2011.

GARDINER, P.R. et al. Characterization of a small variable surface glycoprotein from *Trypanosoma vivax*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82. p. 1-11, 1996.

GARDINER, P.R. et al. Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection in Ayrshire cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 31, p. 187-197, 1989.

HERRERA, H.M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125 p. 263-275. 2004.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção pecuária municipal. [S.l.]: IBGE, 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mg&tema=pecuaria2015>. Acesso em: 6 jun. 2015.

LINHARES, G.F.C. et al. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins: relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, p. 455-460, 2006.

MELO, S.A. et al. Bovine Trypanosomiasis an emerging disease in Maranhão State–Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 7, p. 853-856, 2011.

PAIVA, F. et al. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, Suplemento 1, p. 349, 1997.

PILLAY, D. et al. *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A candidate antigen for diagnosis of African animal Trypanosomosis in cattle. **PlosOne**, v. 8. n. 10. p. 1-10. 2013.

REIS, M.O. et al. Tripanossomíase em bovinos em Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36 (Supl. 2), p.141-143, 2016.

RIET-CORREA, F. Tripanossomíase em bovinos. In: RIET-CORREA et al. Doenças de ruminantes e eqüídeos. 3 ed. Santa Maria: Palotti, 2007. p. 696-701.

RODRIGUES, C.M.F. et al. Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. **Veterinary Parasitology**, v. 191. p. 146–153, 2013.

SALGADO, B.S. et al. What is your diagnosis? Lymphadenopathy in a cow with severe anemia. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 103-104, 2011.

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

- SERRA-FREIRE, N.M. Oiapoque – outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 4, p. 30-31. 1981.
- SILVA, A.S. et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2550-2554. 2009.
- SILVA, A.S. et al. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in Southern Brazil. **Parasitology Research**, v.108, p.23–30, 2011.
- SILVA, R.A.M.S. et al. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovine of the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 52. p. 561-562, 1996.
- SILVA, R.A.M.S. et al. Tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax* no Brasil e Bolívia: sintomas clínicos, diagnósticos e dados epizootiológicos. **Embrapa**, 1997. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37449/1/BP08.pdf>>.
- SILVA, R.A.M.S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*– Biologia, diagnóstico e controle. **EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)**, Corumbá, Brasil, 2002. 140 p.
- SILVA, T.M.F. et al. Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. **Veterinary Research**, v. 44, p. 1-9, 2013.
- SOULSBY, E.J.L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**. 7 ed. London: Baillière Tindall, 1982. 809p.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

(Formatação de acordo com as normas da revista *Veterinary Parasitology*, Qualis A2 para Medicina Veterinária)

**Infecção epizoótica por *Trypanosoma vivax* em bovinos de Minas Gerais,
Brasil**

Matheus de Oliveira Reis¹, Fernanda Rezende Souza¹, Paula Caixeta Borges¹,
Fernanda Monteiro¹, Flademir Wouters¹, Angélica Terezinha Barth Wouters¹,
DjeisonLutier Raymundo¹, Ana Paula Peconick¹, Mary SuzanVaraschin¹

¹From Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Autor para correspondência:

M.S. Varaschin, Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, UFLA, Caixa Postal 3037; CEP 37200-000; Telefone: (35) 3829-1732; Fax (35) 3829 – 1715; Brasil.

E-mail: msvaraschin@dmv.ufla.br

Resumo

A tripanossomíase é uma doença causada por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma*, sendo *Trypanosoma vivax* o agente etiológico mais importante para bovinos. O objetivo deste trabalho foi descrever a expansão da infecção por *T. vivax* em diferentes mesorregiões de Minas Gerais, Brasil, os achados clinicopatológicos da tripanossomíase em bovinos e a eficácia do tratamento utilizado. A epizootia de tripanossomíase em bovinos ocorreu de 2015 a 2017 nas mesorregiões de Campo das Vertentes, Centro-Oeste e Sul e Sudoeste de Minas Gerais. A forma de diagnóstico utilizada foi a visualização do parasito em esfregaços sanguíneos e a detecção do DNA de *T. vivax* no sangue pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Foram acompanhados 30 rebanhos suspeitos, sendo destes 11 positivos para *T. vivax*, cujos sinais clínicos mais frequentemente observados foram apatia, queda na produção de leite, emagrecimento e alterações reprodutivas. Doenças concomitantes também foram observadas durante a infecção por *T. vivax*, como o aumento do número de casos de mastite, edema maligno e pneumonia. Três vacas foram necropsiadas e os achados mais significativos foram baixo escore corporal, mucosas pálidas e baço com hiperplasia da polpa branca. Amostras positivas na PCR foram confirmadas por sequenciamento. Em cinco propriedades positivas para *T. vivax*, testadas após o tratamento com cloridrato de isometamidium, a PCR do sangue resultou negativa para o agente. Os achados demonstram a expansão da infecção por *T. vivax* no estado de Minas Gerais. Os resultados encontrados permitem concluir que esfregaços sanguíneos associados a PCR são promissoras para o diagnóstico e que a ocorrência de outras doenças não excluem a infecção por *T. vivax* em regiões com tripanossomíase. O tratamento com cloridrato de isometamidium se mostrou eficaz nos casos acompanhados.

Key words: anemia, doenças parasitárias, ruminantes, tripanossomíase.

Introdução

A tripanossomíase é uma doença causada por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma*, sendo *T. vivax* o agente etiológico mais importante para bovinos (Batista et al., 2008). Este parasito se caracteriza por apresentar forma de

foice, extremidade posterior arredondada, membrana ondulante pouco desenvolvida, núcleo grande central, cinetoplasto terminal e flagelo livre (Carneiro, 2010). Tem ampla distribuição e importância econômica em países da África, principalmente em regiões onde ocorre seu vetor biológico, a mosca tsé-tsé (Gardiner et al., 1989). A adaptação à transmissão mecânica por tabanídeos e *Stomoxys* sp., permitiu a expansão de *T. vivax* para a América Central e do Sul (Batista et al., 2008).

A tripanossomíase tem tido um papel importante como doença causadora de anemia profunda, emagrecimento, queda em produção de leite, além de outras manifestações clínicas que podem levar à morte de bovinos em algumas regiões do Brasil. Alguns fatores de risco contribuem para que os bovinos adquiram e transmitam o agente através de vetores, como o agrupamento de animais de diferentes propriedades em locais de descanso durante viagens longas (Silva et al., 2013) e o aumento da população de mutucas (*Tabanus* sp.) e moscas dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) predispondo à ocorrência de surtos (Batista et al., 2008).

O objetivo deste trabalho é descrever a expansão da infecção por *T. vivax* em diferentes mesorregiões de Minas Gerais, os achados clinicopatológicos da tripanossomíase em bovinos e a eficácia de um protocolo de tratamento utilizado.

Material e métodos

A epizootia de tripanossomíase em bovinos ocorreu de 2015 a 2017 nas mesorregiões de Campo das Vertentes, Centro-oeste e Sul e Sudoeste de Minas Gerais (Tabela 1, Figura 1). Foram visitadas 30 propriedades leiteiras com suspeita de tripanossomíase, onde os dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos com os veterinários e/ou proprietários (Tabelas 1 e 2). Coletou-se sangue da veia caudal mediana, jugular ou epigástrica cranial superficial para a confecção de esfregaços sanguíneos e sangue em EDTA para a PCR. A pesquisa do parasito foi realizada mediante esfregaços sanguíneos em bovinos doentes e sadios totalizando 25 a 100% dos animais por propriedade. Algumas propriedades foram feitas recoletas para confecções de novos esfregaços sanguíneos para verificação da parasitemia. Três vacas foram necropsiadas (Propriedades A, H e I) e fragmentos de sistema nervoso central (SNC), coração, pulmão, linfonodo, fígado, baço, rim, intestinos, útero, rúmen e proventrículos foram coletados e fixados em formol 10%, incluídos em parafina, cortados a três µm e corados com hematoxilina e eosina. Também foi coletado sangue em EDTA, para a caracterização molecular de *T. vivax*.

O Mini Kit Blood & Tissue DNA (Meep Bioscience, Shenzhen, China) foi usado para a extração do DNA (lise com proteinase K) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração (ng/ μ l) e a qualidade deste DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose a 1% e NanoVueTMPlus. As amostras de DNA foram estocadas a -20°C . Amostras de animais livres de *T. vivax* foram usadas como controle negativo e água ultra-pura Milli-Q como controle branco. O controle positivo foi obtido de amostras de vacas positivas nos esfregaços sanguíneos e comprovadas pelo sequenciamento, sendo utilizadas aquelas com alta carga parasitária e sinais clínicos associados. Foram utilizados como primers os oligonucleotídeos Tvi2 (forward: 5' GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA 3') e DTO156 (reverse: 5' TTAGAATTCCCAGGAGTTCTTGATGATCCAGTA 3'), que amplifica 177 pares de base (pb), como descrito por Cortez et al (2009). A PCR foi realizada utilizando GoTaq® Flexi DNA Polymerase e um set de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega, Madison, USA). O volume final de cada reação foi ajustado para 20 μ L com água ultrapura Milli-Q®. As condições definidas para a PCR em cada reação foram: 1 x Tampão da Taq-polymerase (GoTaq DNA Polymerase-Promega), 1.5mM MgCl_2 , 200 μ M de cada dNTP, 2,5U Taq DNA Polymerase, 100p molde de cada iniciador e 100ng da amostra de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação a 94°C por 5 min; 35 ciclos a 94°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min. O produto da PCR foi separado utilizando um gel de agarose a 2 % de alta resolução misturado com Gel RedTM IX em cuba de eletroforese horizontal contendo TBE (Tris-borato 0.09M e EDTA 0.002M) em voltagem de 100 V. O tamanho da banda de amplificação foi identificada com um marcador de peso molecular padrão (Ladder, Sigma® 50pb 500 μ l). Em cinco propriedades uma nova PCR foi realizada após o tratamento com tripanocida (1 mL para 20 Kg de peso vivo por via intramuscular; repetição da dose após quatro meses da primeira aplicação).

O sequenciamento foi realizado pelo método enzimático descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977), por meio do equipamento ABI 3730, com capilar de 50 cm.

3- Resultados

Foram avaliados 401 animais por meio de esfregaço sanguíneo nas 30 propriedades visitadas na área de estudo, sendo que destas, 11 propriedades (Figura 1) tiveram bovinos infectados por protozoários flagelados na forma de tripomastigota, compatíveis com *Trypanosoma vivax* (Figura 2), totalizando 110 animais. Esses apresentavam citoplasma alongado, núcleo central, flagelo livre, kinetoplasto e membrana ondulante. Alguns bovinos foram positivos no primeiro esfregaço e negativos no esfregaço consecutivo ou vice-versa. Houve diferenças também na quantidade de parasitos observada nos esfregaços nas diferentes coletas. Dados epidemiológicos e clínicos estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Os três animais (Bovinos 1, 2 e 3) necropsiados apresentaram mau estado corporal (Figura 3), mucosas pálidas, baço com aumento de volume e evidenciação da polpa branca (Figura 4). O Bovino 1 foi eutanasiado devido ao mau prognóstico e os outros achados macroscópicos foram rins acobreados com pontos brancos disseminados na cortical; coração com discreta dilatação do ventrículo direito; e fígado com evidenciação do padrão lobular. No exame microscópico havia hiperplasia multifocal moderada de folículos linfóides em baço e linfonodos, nefrite intersticial linfoplasmocitária multifocal moderada, glomerulonefrite membranosa e material proteico na luz tubular; congestão hepática moderada, predominantemente na região centrolobular, e infiltrado periportal linfoplasmocitário. O Bovino 2 foi eutanasiado devido a diagnóstico de Edema maligno, com lesões macroscópicas em região toracoabdominal ventral secundárias ao uso de agulhas contaminadas durante tratamento suporte. Na necropsia observaram-se musculatura da região esternal e abdominal acinzentada com áreas amareladas, fétida, edemaciada e com bolhas de gás. Na microscopia havia vacuolização hepatocelular difusa; linfonodo com infiltrado histiocítico e dilatação de vasos linfáticos; nefrite intersticial linfoplasmocitária discreta, além das lesões de Edema maligno; necrose muscular extensa associado a edema, infiltrado neutrofílico abundante e cavitações correspondentes a bolhas de gás. No bovino 3 foi observado coração com dilatação dos ventrículos e pulmões com consolidação cranioventral atingindo cerca de 50% do lado direito e 80% do lado esquerdo, além de bronquiectasia com abundante exsudato mucopurulento, que se estendia até a traqueia. Na microscopia havia baço congesto, nefrite intersticial linfocítica discreta; miocardite linfoplasmocítica multifocal discreta. Colículo rostral com gliose multifocal discreta; óbex, cerebelo e telencéfalo com manguitos perivasculares linfoplasmocitários multifocais discretos,

principalmente em vasos da meninge; atrofia centro lobular de cordões de hepatócitos, fibrose periportal moderada associada a infiltrado linfoplasmocítico moderado; broncopneumonia supurativa crônica com bronquiectasia.

Os resultados da PCR e dos esfregaços sanguíneos estão demonstrados na Tabela 1. O resultado da PCR foi confirmado por seqüenciamento.

Em todas as propriedades visitadas foi recomendado o tratamento com cloridrato de isometamidium. Em cinco propriedades, escolhidas aleatoriamente, uma nova PCR foi realizada, onde os bovinos testados resultaram negativos para *T. vivax* após a realização do tratamento.

4- Discussão

O diagnóstico de tripanossomíase foi baseado em achados epidemiológicos, clínicos e patológicos associados a esfregaços sanguíneos contendo protozoários compatíveis com *Trypanosoma* sp., além de positividade na PCR para *T. vivax*. O primeiro relato da infecção no Brasil ocorreu em búfalos no estado do Pará em 1972 (Shaw and Lainson, 1972). Posteriormente, casos de tripanossomíase por *T. vivax* foram diagnosticados em bovinos nos estados do Amapá (Serra-Freire, 1981), Mato Grosso (Silva et al., 1996), Mato Grosso do Sul (Paiva et al., 1997), Tocantins (Linhares et al., 2006), Paraíba (Batista et al., 2008), Rio Grande do Sul (Silva et al., 2009), São Paulo (Salgado et al., 2011; Cadioli et al., 2012) e Maranhão (Melo et al., 2011). Também foram identificados caprinos infectados no estado de Santa Catarina (Fávero et al., 2016) e equinos no Rio Grande do Sul (Silva et al., 2011). Em Minas Gerais, o primeiro diagnóstico ocorreu na região de Igarapé, mesorregião metropolitana de Belo Horizonte (Carvalho et al., 2008). Geralmente, os relatos descrevem poucas propriedades acometidas, sendo a doença considerada rara no Brasil (Riet-Correa, 2007). Porém, a doença tem se expandido pelo estado de Minas Gerais e foi diagnosticada neste estudo nas Mesorregiões Sul e Sudoeste, Centro Oeste e Campo das Vertentes, consideradas livres da infecção até então.

Não há evidências que indicam possível origem desta epizootia nas regiões estudadas, porém alguns proprietários relatam compra de animais, sendo provável que um animal com infecção subclínica tenha sido introduzido em alguma propriedade, com disseminação para outras áreas. Por outro lado, a doença expandiu dentro das propriedades pelo uso de agulhas compartilhadas, principalmente pela aplicação de ocitocina para auxiliar na ejeção do leite de vacas

azebuadas. Na propriedade que não utilizava ocitocina, a suspeita era de que moscas eram transportadas junto a caminhões que fazem o transporte leiteiro de propriedade em propriedade (Tabela 1).

A quantidade de parasito observados nos esfregaços foi variável, assim como alguns bovinos foram positivos no primeiro esfregaço e negativos no esfregaço consecutivo ou vice-versa. Um achado importante para os tripanossomas da seção Salivaria é a sua habilidade em escapar do sistema imune do hospedeiro vertebrado, pela produção de cepas com diferentes características antigênicas, resultando em sucessivas ondas de parasitemia em intervalos de poucos dias; cada onda representa a multiplicação de uma população de um novo tipo antigênico (Soulsby, 1982). Desta forma, proteínas de superfície foram identificadas em *T. vivax*, sendo o antígeno GM6 de *Trypanosoma vivax* (TvGM6) associado ao flagelo (PILLAY et al., 2013), e a ILDat 2.1 expressa por tripanossomas da Uganda adaptados a passagens em camundongos (Gardiner et al., 1996). Essa variação antigênica é importante para a resposta imunológica contra o agente e para a cronicidade da infecção (Gardiner et al., 1996).

Em todas as propriedades positivas deste estudo foram observados sinais clínicos associados à morte de bovinos. Os sinais clínicos mais frequentes foram apatia, anorexia, anemia severa, emagrecimento e queda abrupta da produção de leite. Estes sinais foram descritos também por outros autores (Batista et al., 2007; Galiza et al., 2011). Alterações neurológicas, como cegueira e ataxia, foram relatadas, porém com menor frequência. Outras alterações neurológicas, como tremores musculares, fasciculações, opistótono e estrabismo podem ocorrer (Batista et al., 2007; Silva et al., 2013).

Alterações reprodutivas, como partos prematuros, abortamento e repetição de cio, foram observações constantes neste estudo. Meléndez et al. (1993) relataram o caso de um bezerro com esfregaço positivo para *T. vivax* cinco horas após o nascimento, além da elevação dos níveis de anticorpos testados até 80 dias após o nascimento. Um estudo com infecção experimental em ovelhas prenhes demonstrou PCR positiva para *T. vivax* em 100% dos fetos, além de lesões histológicas, como encefalite e miocardite, em alguns deles. Houve, ainda, necrose do epitélio coriônico da placenta de algumas ovelhas, o que demonstra que há passagem transplacentária do agente sendo esta uma importante causa de alterações reprodutivas (Silva et al., 2013). Neste estudo não foi possível a avaliação de fetos

ou da placenta, porém deve ser considerado que os casos de aborto estejam associados ao mau estado corporal das vacas, que estavam com emagrecimento acentuado e anemia profunda, bem como pela elevação da temperatura corporal.

Nos animais necropsiados havia, isoladamente ou em conjunto, aumento do baço por hiperplasia linfoide, nefrite intersticial linfoplasmocítica, meningite ou meningoencefalite com infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, como descrito em casos de tripanossomíase por Batista et al. (2007), no entanto, essas lesões são inespecíficas, fazendo-se necessária a utilização de técnicas de diagnóstico parasitológico ou molecular.

Outras doenças com sinais clínicos semelhantes, como babesiose por *Babesia bovis*, que cursam com anemia severa além de alterações neurológicas, foram descartadas pelas lesões observadas e ausência do agente em esfregaços sanguíneos e do SNC. O SNC do bovino 3, que tinha lesões de encefalite, foi submetido à técnica de IHQ anti-vírus rábico, já que a raiva é frequente na região, porém resultou negativo.

Doenças concomitantes também foram observadas, com aumento do número de casos de mastite no período (Propriedade I), um caso de Edema maligno (Propriedade H) e um caso de pneumonia (Propriedade I). Animais com anemia severa, como na tripanossomíase, são mais suscetíveis à infecção secundária por bactérias e vírus por haver concorrência entre as células precursoras para a diferenciação eritróide e granulocítica (Valli et al.).

Vacas tratadas com medicamentos à base de cloridrato de isometamidium foram negativas para *T. vivax* na PCR numa segunda análise realizada seis meses após o primeiro tratamento e dois meses após o segundo tratamento. Somado a isso foram realizados esfregaços sanguíneos de 66 vacas após a segunda dose do tratamento e todos resultaram negativos. Este achado demonstra a eficiência do tratamento no combate ao agente. Em um surto do semiárido da Paraíba, no qual 26 de 130 vacas acometidas, testes sorológicos realizados dois anos após o surto evidenciaram que em quase todos os bovinos os títulos de anticorpos anti-*T. vivax* foram negativados (Batista et al., 2007).

Conclusão

Os resultados demonstraram uma expansão da infecção por *T. vivax* no estado de Minas Gerais, com perdas econômicas significativas. O esfregaço sanguíneo associado à técnica da PCR foi promissor para a confirmação diagnóstica. Doenças concomitantes não devem ser excluídas para a infecção por *T. vivax*. O tratamento com fármaco à base de cloridrato de isometamidium se mostrou eficaz no tratamento da enfermidade.

Agradecimentos – Os autores agradecem a todos os veterinários e proprietários de bovinos que contribuíram para este estudo, a empresa Myleus Biotechnology que fez o sequenciamento das amostras, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

Declaração de conflito de interesse – Os autores declaram que não há conflito de interesses com respeito ao artigo, autores e publicação.

Referências

Batista, J.S., Riet-Correa, F., Teixeira, M.M., Madruga, C.R., Simões, S.D., Maia T.F., 2007. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet. Parasitol.* 143(2),174–181.

Batista, J.S., Bezerra, F.S.B., Lira, R.A., Carvalho, J.R.G., Rosado Neto, A.M., Petri, A.A., Teixeira, M.M.G., 2008. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 28 (1), 63–69.

Cadioli, F.A., Barnabé, P.A, Machado, R.Z., Teixeira, M.C.A., André, M.R., Sampaio, P.H., Fidélis Junior, O.L., Teixeira, M.M.G., Marques, L.C., 2012. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21 (2),118–124.

Carneiro, M.E., 2011. Protozoários flagelados. In: Monteiro, S.G. Parasitologia na Medicina Veterinária. Roca, São Paulo, pp. 131–140.

Carvalho, A.U., Abrão, D.C., Facury Filho, E.J., Paes, P.R.O., Ribeiro, M.F.B., 2008. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. Arq. Bras. Med.Vet. Zoot. 60, 769–771.

Cortez, A.P. Rodrigues, A.C., Garcia, H.A., Neves, L., Batista, J.S., Bengaly, Z., Paiva, F., Teixeira, M.M., 2009. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - Characterization, relationships and diagnostic implications. Mol. Cell. Probes 23, 44–51.

Fávero, J.F., Silva, A.S., Biazus, A.H., Volpato, A., 2016. *Trypanosoma vivax* infection In goat in west of Santa Catarina State, Brazil. Comp. Clin. Pathol. 25, 497–499.

Gardiner, P.R. Assoku, R.K., Whitelaw, D.D., Murray, M., 1989. Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection In Ayrshire cattle. Vet. Parasitol. 31, 187–197.

Linhares, G.F.C., Dias Filho, F.C., Fernandes, P.R., Duarte, S.C., 2006. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins: Relato de caso. Cienc. Anim. Bras. 7, 455–460.

Melo, S.A., Barros, A.C., Costa, F.B., Carvalho Neta, A.V., Guerra R.M.C., Abreu-Silva, A.L., 2011. Bovine trypanosomiasis an emerging disease in Maranhão State–Brazil. Vector-Borne Zoonotic Dis. 11(7), 853–856.

Meléndez, R.D., Forlano, M., Figueiroa, W., 1993. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. J. Parasitol. 79, 293–294.

Paiva, F., Lemos, R.A.A., Oshiro, E.T., Salvador, S.C., Nakazato, L., 1997. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Mato Grosso do Sul. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 6(1), 349.

Riet-Correa, F., 2007. Tripanossomíase em bovinos. In: Riet-Correa, F., Schild, A.L., Lemos, R.A.A., Borges, J.R.J. (Eds.), Doenças de Ruminantes e Equídeos. 3 Ed. Palotti, Santa Maria, pp. 696–701.

Salgado, B.S. Battaglia, C.T., Stuchi, R.S., Cadioli, F.A., Rozza, D.B., 2011. What is your diagnosis? Lymphadenopathy in a cow with severe anemia. *Vet. Clin. Pathol.* 40 (1), 103–104.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74 (12), 5463-7.

Shaw, J.J., Lainson, R., 1972. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals Trop. Med. Parasitol.* 66, 25–32.

Serra-Freire, N.M., 1981. Oiapoque – Outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.* 4, 30–31.

Silva, R.A.M.S. Silva, J.A., Schneider, R.C., Freitas, J., Mesquita, D., Mesquita, T., Ramirez, L., Dávila, A.M.R., Pereira, M.E.B., 1996. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovine of the Pantanal, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91(5), 561–562.

Silva, A.S. Costa, M.M., Polenz, M.F., Polenz, C.H., Teixeira, M.M.G., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2009. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc. Rural* 39 (8), 2550–2554.

Silva, A.S., Garcia Perez, H.A., Costa, M.M., França, R.T., Gasperi, D., Zanette, R.A., Amado, J.A., Lopes, S.T., Teixeira, M.M., Monteiro, S.G., 2011. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in Southern Brazil. *Parasitol. Res.* 108, 23–30.

Silva, T.M.F. Olinda, R.G., Rodrigues, C.M.F., Câmara, A.C.L., Lopes, F.C., Coelho, A.C., Ribeiro, M.F.B., Freitas, C.I.A., Teixeira, M.M.G., Batista, J.S., 2013.

Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. Vet. Res. 44, 1–9.

Soulsby, E.J.L., 1982. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7 ed. Baillière Tindall, London, pp. 809.

Tabela 1- Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. Achados referentes aos dados epidemiológicos, diagnóstico e tratamento.

Propriedade	Município	Raça	Rebanho total	Esfregaços (positivos)	PCR**	PCR***	N°. Mortes	Necropsia	Fatores predisponentes	Tratamento
A	Bom Jesus da Penha	Holandesa	350	139 (5)	P	NR	1	Sim	Infestação de moscas	Sim
B	São João Batista do Glória	Girolando	100	30 (10)	P	NR	30	Não	Agulhas compartilhadas	NI*
C	São João Batista do Glória	Holandesa	200	20 (10)	P	Negativo	70	Não	Agulhas compartilhadas	Sim
D	Passos	Girolando	120	30 (17)	P	Negativo	50	Não	Agulhas compartilhadas	Sim
E	Passos	Girolando	900	20 (6)	P	Negativo	5	Não	Agulhas compartilhadas	Sim
F	Passos	Girolando	300	21 (13)	P	Negativo	15	Não	Agulhas compartilhadas	Sim
G	Passos	Girolando	160	5 (4)	P	NR	2	Não	Agulhas compartilhadas	Sim
H	Lavras	Holandesa	124	102 (28)	P	Negativo	1	Sim	Agulhas compartilhadas	Sim
I	Bom Sucesso	Holandesa	3	21 (9)	P	NR	5	Sim	Agulhas compartilhadas	Sim
J	Ijaci	NI	NI	4 (3)	P	NR	26	Não	Agulhas compartilhadas	NI
K	Araújos	Girolando	30	9 (5)	NR	NR	4	Não	Agulhas compartilhadas	NI

*NI: Não informado ** PCR antes tratamento ***PCR após o tratamento NR: não realizado; P= positivo; N= negativo

Tabela 2- Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. Sinais clínicos apresentados.

Sinais Clínicos / Propriedades	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Anemia acentuada (Mucosas pálidas/sangue ralo)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Apatia/Anorexia/ Emagrecimento acentuado	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Queda acentuada na produção de leite	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Edema submandibular								x	x		x
Pulso jugular positivo		x									
Ingestão compulsiva de terra			x	x			x				
Partos prematuros	x										
Abortos (qualquer fase gestacional)		x			x		x		x		
Queda na fertilidade				x			x	x			
Dificuldade de locomoção/bambeira			x								
Cegueira			x				x		x		
Aagitada/investindo contra pessoas						x					
Hipermetria									x		
Andar em círculos				x							

Figura 1: Meso-regiões do Estado de Minas Gerais. Mapa evidenciando mesorregião 4 do primeiro diagnóstico da ocorrência de *T. vivax* em bovinos no estado e a expansão da doença para as demais mesoregiões 1, 7 e 8 (fonte:www.baixarmapas.com.br)

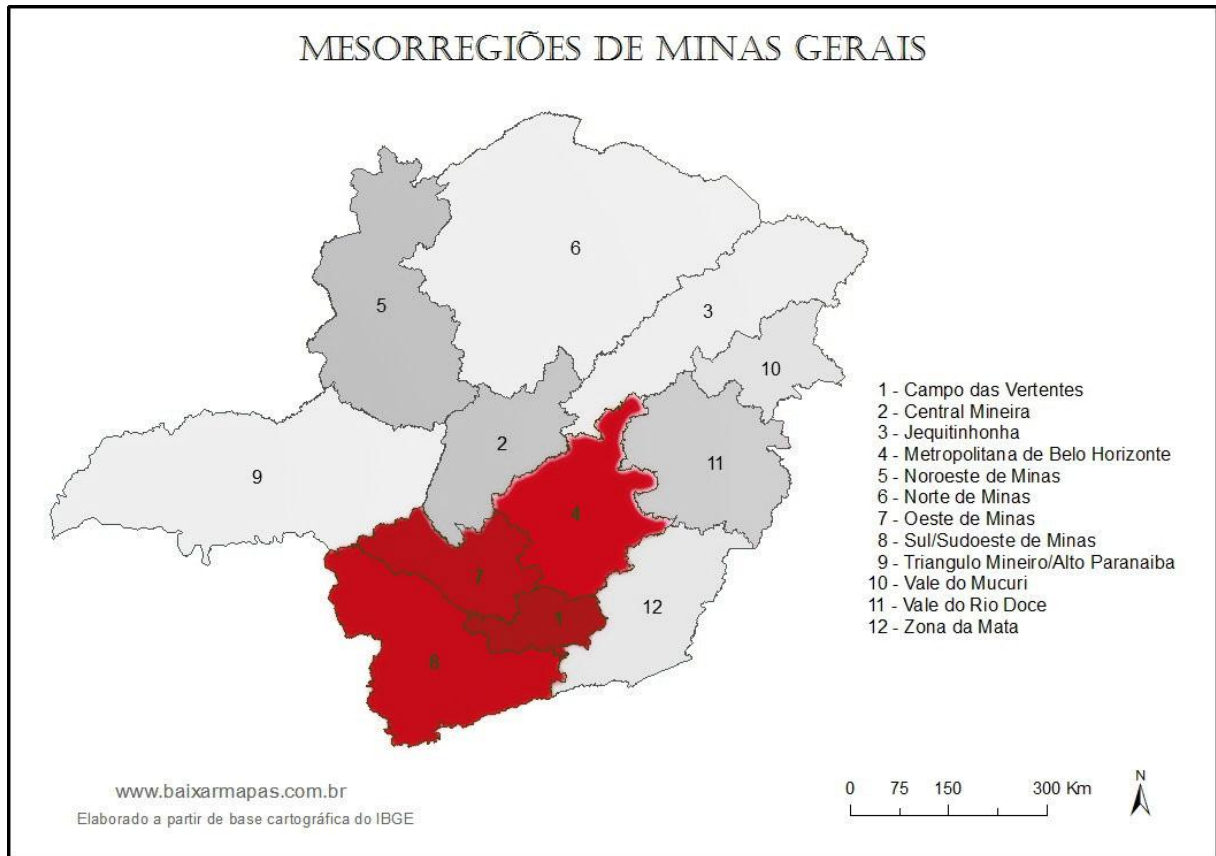


Figura 2: Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. *Trypanosomavivax* na forma tripomastigota em esfregaço sanguíneo. Observem no canto inferior da figura, parasitos em divisão. Panótico Rápido. 100x.



Figura3:Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. Vaca em baixo escore corporal.



Figura 4: Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. Baço com hiperplasia de polpa branca.



Anexo. Amostras sequenciadas

Amostra1

CCGTACTTATCATCATGTCTCGTGGGCGCTCTCTCCATTCATGTCGTACAGTGGCG
GTGTGGTGACGTCCTGCACCTCCGAGGCGCTGAACCACGGCGTGCTCCTCGTCGG
CTACAACGACAGCAGCAAGCCGCCGTACTGGATCATCAAGAACTCCTGGGAATTC
TAAAAA

Amostra2

CCGGGCTGGTCCATCATGTGTCGTGGGCGCTCATCAACCTTCATGTCGTACAGTG
GCGGTGTGGTGACGTCCTGCACCTCCGAGGCGCTGAACCACGGCGTGCTCCTCGT
CGGCTACAACGACATCAGCAAGCCGCCGTACTGGATCATCAAGAACTCCTGGAA
ATTCTAAAAA

Amostra3

GCGGGCGTGGTTTTTCATGACTCTTGAGGCATTCTCTCCATTCATGTCGTACAGTGG
CGGTGTGGTGACGTCCTGCACCTCGAGGGGCTGAACCACGGCGTGCTCCTCGTCG
GCTACAACGACAGCAGCAAGCCGCCGTACTGGATCATCAAGAACTCCTGGGAAT
TCTAAA

Amostra4

CGAATTGGAGACACGGATTATCATGACTCTTGTGTATACTCTGCATTCATGAGTC
ATACGCATGGGATCGTCATGAACCTAAGAGGAGAGGTGCCACGTCGTGCATCCCC
GGCGGCTACTACAACAGCGGCAAGCGCGCCGTACTGGATCATCAAGAACTCCTG
GGAATTCTAAAA