

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

DETECÇÃO DE *Trypanosoma* sp. EM BOVINOS
NATURALMENTE INFECTADOS DE DIFERENTES
MUNICÍPIOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Karoline Alves Machado

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Detecção de *Trypanosoma* sp. em bovinos naturalmente infectados
em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro**

KAROLINE ALVES MACHADO

Sob a orientação da Professora Doutora

Bruna de Azevedo Baêta

Seropédica, RJ

Abril de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M149d MACHADO, Karoline Alves, 1993-
Detecção de Trypanosoma sp. em bovinos naturalmente infectados de diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro. / Karoline Alves MACHADO. - Queimados, 2025.
46 f.: il.

Orientadora: Bruna de Azevedo BAÊTA.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias., 2025.

1. tripanossomose bovina. 2. Trypanosoma vivax. 3. PCR. 4. diagnóstico molecular. 5. epidemiologia. I. BAÊTA, Bruna de Azevedo, 1984-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**



ATA Nº 1860 / 2025 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.025622/2025-30

Seropédica-RJ, 20 de maio de 2025.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

KAROLINE ALVES MACHADO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a)** em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/04/2025

(Assinado digitalmente em 21/05/2025 09:20)

BRUNA DE AZEVEDO BAETA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: 3247559

(Assinado digitalmente em 21/05/2025 15:10)

MARISTELA PECKLE PEIXOTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: 3103478

(Assinado digitalmente em 01/07/2025 20:03)

JENEVALDO BARBOSA DA SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 064.653.506-45

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1860**, ano: **2025**, tipo: **ATA**, data de emissão: **20/05/2025** e o código de verificação: **71ce6d9a82**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me dar força nos momentos difíceis e iluminar meu caminho até aqui.

À minha mãe, família e amigos, pelo amor incondicional, apoio diário e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu mesma duvidava.

À minha orientadora Professora Bruna Baêta pela paciência, orientação e por compartilhar seus conhecimentos com generosidade ao longo dessa jornada.

A todos os colegas e amigos do LEIPH que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, com palavras de incentivo, trocas de ideias e apoio nos momentos de cansaço. Em especial ao Jonathan, Diogo e Olívia, que dedicaram grande parte e atenção de suas vidas a este trabalho.

Agradeço especialmente aos amigos Diogo, Lívia, Olívia e Carol que estiveram comigo ao longo dessa caminhada acadêmica e vida pessoal.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço a CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro concedido, essencial para a realização desta pesquisa. O incentivo à ciência e à formação acadêmica proporcionada por estas instituições foi fundamental para a concretização deste trabalho.

A todos os professores do PPGCV que compartilham um pouco de seus conhecimentos com os alunos de maneira formidável. Em especial ao professor Dr. Douglas MacIntosh e a Dra. Tassia Furtado por nos auxiliarem em nossas pesquisas sempre de bom grado.

Por fim, a todos que fizeram parte desta caminhada, direta ou indiretamente, deixo a minha sincera gratidão.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

KAROLINE ALVES MACHADO, filha de Simone da Silva Alves e Genair Machado, nasceu em Queimados – RJ, em 30 de outubro de 1993. Concluiu o ensino médio no Colégio Souza Duarte, situado na Cidade de Nova Iguaçu– RJ em 2011. Em 2017 iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade de Vassouras, que ainda possuía o nome de Universidade Severino Sombra, localizada na Cidade de Vassouras. Durante a graduação, foi monitora de Anatomia dos Animais Domésticos II durante o terceiro e quarto semestre, participou da fundação e diretoria do projeto de extensão da Liga Acadêmica de Medicina Integrativa (LAMI) onde organizou eventos, semanas acadêmicas e palestras individuais. Formou-se em 2021 e desde então atua na clínica médica de pequenos animais e terapias integrativas de ozônio e laser, sendo convidada para palestrar sobre o tema em universidades. Em 2023 iniciou a pós-graduação em Dermatologia de Pequenos Animais, tendo sua conclusão em 2025. No ano de 2023 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), a nível de mestrado, sob orientação da Professora Dra. Bruna de Azevedo Baêta. Foi bolsista CAPES de setembro de 2023 a março de 2024, onde foi contemplada com a bolsa “Aluno nota 10” da FAPERJ. Participou da organização do IX Simpósio Internacional em Ciências Veterinárias (SINCVET), submetendo-se a defesa de Dissertação em Abril de 2025.

RESUMO

MACHADO, Karoline Alves. **Deteção de *Trypanosoma* sp. em bovinos naturalmente infectados em diferentes municípios de estado do Rio de Janeiro** . 2025. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

As enfermidades causadas por hemoprotozoários representam um importante desafio à pecuária brasileira, tanto pela dificuldade no diagnóstico quanto pelos prejuízos econômicos decorrentes da redução da produtividade dos rebanhos. Entre esses agentes, destacam-se os protozoários do gênero *Trypanosoma*, responsáveis pela tripanossomose, uma doença que pode se manifestar com sinais clínicos inespecíficos, como anemia, perda de peso, diminuição na produção de leite e abortos. Essas características clínicas favorecem o subdiagnóstico e a subnotificação da enfermidade nos rebanhos. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de *Trypanosoma* spp. em bovinos de diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como principal ferramenta diagnóstica. Foram analisadas 398 amostras sanguíneas de bovinos provenientes de propriedades rurais localizadas nos municípios de Vassouras, Miguel Pereira, Seropédica, Teresópolis, Piraí e Volta Redonda, entre 2022 e 2025. As amostras foram submetidas à PCR utilizando primers específicos para os genes 18S rDNA e Catepsina L (*CatL*), marcadores amplamente empregados na triagem e diferenciação de espécies do gênero *Trypanosoma*. Dos animais avaliados, 13 amostras (3,27%) foram positivas para *Trypanosoma* spp., todas oriundas de uma única propriedade no município de Volta Redonda. O sequenciamento genético das amostras confirmou a presença de *Trypanosoma vivax*, com 100% de similaridade em relação a cepas previamente descritas no Brasil e na África Ocidental. A análise filogenética demonstrou que as sequências obtidas se agruparam com linhagens já circulantes na região Sudeste do país. Os achados reforçam a importância do uso da PCR como método sensível e específico para a detecção de tripanossomose bovina, especialmente em infecções subclínicas ou de baixa parasitemia, nas quais os métodos convencionais apresentam baixa eficiência. O estudo destaca ainda a relevância do monitoramento epidemiológico com base em ferramentas moleculares, contribuindo para o diagnóstico precoce, o controle sanitário e a prevenção da disseminação da doença nos rebanhos do estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: tripanossomose bovina; *Trypanosoma vivax*; PCR; diagnóstico molecular; epidemiologia.

ABSTRACT

MACHADO, Karoline Alves. **Detection of *Trypanosoma* sp. in naturally infected cattle from different municipalities in the state of Rio de Janeiro.** 2025. 46 p. Dissertation (Master's in Veterinary Sciences) – Institute of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil, 2025.

Hemoprotozoan diseases represent a significant challenge to Brazilian cattle farming, mainly due to diagnostic difficulties and the economic losses associated with decreased herd productivity. Among these pathogens, protozoa of the genus *Trypanosoma* are noteworthy as the causative agents of trypanosomosis, a disease that may present with nonspecific clinical signs such as anemia, weight loss, reduced milk production, and abortions. These manifestations often lead to underdiagnosis and underreporting of the disease in cattle herds. This study aimed to investigate the occurrence of *Trypanosoma* spp. in cattle from different municipalities in the state of Rio de Janeiro, using Polymerase Chain Reaction (PCR) as the main diagnostic tool. A total of 398 blood samples were collected between 2022 and 2025 from cattle raised on farms located in the municipalities of Vassouras, Miguel Pereira, Seropédica, Teresópolis, Piraí and Volta Redonda. All samples were subjected to PCR using primers targeting the 18S rDNA and cathepsin L (*CatL*) genes, both widely used markers for the screening and differentiation of *Trypanosoma* species. Of the animals tested, 13 samples (3.27%) were positive for *Trypanosoma* spp., all of which originated from a single farm in Volta Redonda. Genetic sequencing confirmed 100% similarity with *Trypanosoma vivax* strains previously described in Brazil and West Africa. Phylogenetic analysis showed that the sequences clustered with lineages already circulating in the southeastern region of the country. These findings highlight the relevance of PCR as a highly sensitive and specific technique for the detection of bovine trypanosomosis, especially in subclinical infections or cases of low parasitemia where conventional methods tend to fail. Furthermore, the study underscores the importance of incorporating molecular-based epidemiological monitoring strategies to support early diagnosis, sanitary control, and prevention of disease spread in cattle herds across the state of Rio de Janeiro.

Keywords: bovine trypanosomiasis; *Trypanosoma vivax*; PCR; molecular diagnosis; epidemiology.

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABI	Applied Biosystems Incorporated
AChE	Acetilcolinesterase
Ae. aegypti	<i>Aedes aegypti</i> (espécie de mosquito)
bp / pb	<i>Base pairs</i> / pares de base
<i>CatL</i>	Gene codificante da enzima catepsina L
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Exo-Sap-IT	Kit de purificação enzimática para produtos de PCR
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ILPF	Integração Lavoura-Pecuária-Floresta
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
LDP	Laboratório de Doenças Parasitárias
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rDNA	DNA ribossomal
TAE	Tris-acetato-EDTA (tampão usado em eletroforese)
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos municípios amostrados no estado do Rio de Janeiro (IBGE, 2022).....	14
Tabela 2 – Distribuição das amostras por município, ano de coleta, número de positivos e percentual de positividade para <i>Trypanosoma vivax</i> no estado do Rio de Janeiro (2022–2025).	18
Tabela 3 – Distância Evolutiva Média entre grupos geográficos de <i>T. vivax</i> (catL).....	20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Imagem mostrando a diversidade morfológica das diferentes fases evolutivas dos tripanossomatídeos. Fonte: Souza & Vidal, 2017. 3
- Figura 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma evansi*. Fonte: Elaborado pela autora (2025) com elementos gráficos da imagem obtidos no Canva.com, conforme licenciamento em 2025. 5
- Figura 3: Ciclo biológico de *Trypanosoma vivax*. Fonte: Elaborado pela autora (2025) com elementos gráficos da imagem obtidos no Canva.com, conforme licenciamento em 2025. 8
- Figura 4. Ciclo biológico de *Trypanosoma theileri*. Fonte: Elaborado pela autora (2025) com elementos gráficos da imagem obtidos no Canva.com, conforme licenciamento em 2025. 9
- Figura 5. Mapa das cidades fonte de coleta do experimento. Fonte: IBGE, 2022. 15
- Figura 6. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *catL* de *Trypanosoma* de bovinos com a probabilidade mais alta, inferida usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Tamura 3 parâmetros com distribuição Gama (G). Esta análise envolveu 31 sequências de nucleotídeos, com um dataset final de 449 posições. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X. 19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 A Criação de Gado no Brasil.....	2
2.2. Família Trypanosomatidae	3
2.2.1 Posição taxonômica	4
2.3. Tripanosomatídeos de importância para o gado bovino brasileiro.....	4
2.3.1 <i>Trypanosoma evansi</i>	5
2.3.2. <i>Trypanosoma vivax</i>	6
2.3.3. <i>Trypanosoma theileri</i>	8
2.4. Diagnóstico de <i>Trypanosoma</i> spp.	10
2.4.1. Diagnóstico Parasitológico	10
2.4.2. Diagnóstico Sorológico	11
2.4.3. Diagnóstico Molecular	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Local do estudo e coleta das amostras.....	14
3.2. Extração de DNA e verificação de gene endógeno	16
3.3. Verificação do gene endógeno	16
3.4 Detecção molecular de <i>Trypanosoma</i> spp.	16
3.5. Eletroforese e Análise dos Resultados.....	17
3.6. Sequenciamento genético e análise filogenética	17
4 RESULTADOS	18
5 DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÃO.....	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXO I.....	34
.....	34

1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por parasitos são de grande desafio para a pecuária mundial e especialmente no Brasil, país conhecido por possuir um dos maiores rebanhos do mundo, com aproximadamente 234 milhões de cabeça de gado em 2023, também possuindo o título de maior exportador de carne bovina de todo o globo (IBGE, 2023). Muitos agentes parasitários causam problemas dentro da criação de gado e entre aqueles de maior importância sanitária e econômica estão os protozoários da família Trypanosomatidae, ocasionadores de patologias de diagnóstico e controle complicados, como a tripanossomose (Giordani *et al.*, 2016; Castillo-Castañeda *et al.*, 2022).

Esses parasitos possuem ciclos complexos, com fase em hospedeiros vertebrados e invertebrados, com mais de um tipo de vetor e forma de transmissão, o que dificulta muito a erradicação das doenças e facilita sua disseminação (Riana *et al.*, 2022; Peña-Callejas *et al.*, 2022). Em bovinos, a infecção por tripanossomos de importância como *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma theileri* são capazes de apresentar sintomatologia inespecífica como febre, anemia, perda de peso, distúrbios neurológicos e abortos, acarretando perdas significativas à pecuária bovina (Giordani *et al.*, 2016; Bonilla *et al.*, 2021; Kaliner, 1972). Outro grande desafio encontrado é o subdiagnóstico dessas doenças e falta da inclusão delas como triagem para diagnóstico diferencial de outras enfermidades comum em rebanhos (Radostits *et al.*, 2000; Caramori *et al.*, 2022).

Algumas formas para realizar o diagnóstico laboratorial de tripanossomatídeos podem ser encontradas como métodos parasitológicos, sorológicos e principalmente moleculares. O desafio maior é na fase crônica da infecção, onde ocorre uma queda da parasitemia, dificultando a visualização direta do agente. Diante disso, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo vastamente utilizada por sua alta sensibilidade e especificidade na detecção de DNA parasitário, sendo possível sua realização mesmo em estágios subclínicos (Silva, 2017; González *et al.*, 2006).

A existência de surtos de tripanossomose registrados em estados do Brasil (Bastos *et al.*, 2017; Abrão *et al.*, 2009) reforçam a necessidade de mais estudos voltados para a presença destes parasitos em rebanhos brasileiros. Neste trabalho, optou-se pela utilização da biologia molecular, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como ferramenta diagnóstica. Essa escolha se deve às limitações apresentadas pelos métodos parasitológicos e sorológicos, que, embora amplamente utilizados, podem falhar na detecção de infecções crônicas ou de baixa parasitemia, além de não diferenciarem infecções ativas de exposições anteriores (Connor & Bossche, 2004; Madruga *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2002; Osório *et al.*, 2008). A PCR, por sua vez, oferece maior sensibilidade e especificidade, permitindo uma detecção mais precisa e confiável do agente (D'Ávila *et al.*, 1997; Cortez *et al.*, 2009). Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo realizar a detecção molecular de *Trypanosoma* spp. em amostras sanguíneas de bovinos em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Criação de Gado no Brasil

A bovinocultura representa uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro, não apenas pelo seu expressivo valor econômico, mas também pelo impacto social e ambiental que exerce em diversos territórios do país. O Brasil lidera o ranking mundial de rebanho bovino comercial, com cerca de 234 milhões de cabeças registradas em 2023, sendo também o maior exportador global de carne bovina (IBGE, 2023). Essa atividade ocupa uma significativa parcela do território nacional, estendendo-se por diferentes biomas e regiões, com maior destaque para o Centro-Oeste, Sudeste e Norte (EMBRAPA, 2017).

A intensificação da bovinocultura teve seu marco na segunda metade do século XX, quando foram introduzidas tecnologias voltadas ao melhoramento genético, manejo de pastagens, suplementação alimentar e estratégias sanitárias mais eficazes (IPEA, 2020). Atualmente, a atividade se divide em dois segmentos principais: a pecuária de corte e a pecuária leiteira. A primeira concentrada, sobretudo nas regiões Centro-Oeste e Norte, ainda se baseia em sistemas de produção extensivos, embora venha crescendo o uso de confinamentos e modelos semi-intensivos (MAPA, 2023). Por sua vez, a pecuária leiteira predomina no Sul e Sudeste, principalmente em Minas Gerais, e caracteriza-se por maior tecnificação e controle zootécnico (EMBRAPA, 2017).

Os sistemas de produção bovina variam de acordo com fatores regionais, o produto final desejado e o nível tecnológico empregado pelos produtores. O modelo extensivo, ainda hegemônico no país, utiliza grandes áreas de pastagem com baixa densidade animal. Já os sistemas semi-intensivo e intensivo incorporam práticas como o confinamento (feedlot), suplementação nutricional estratégica, manejo reprodutivo controlado e programas de melhoramento genético (Cezar *et al.*, 2005). Em paralelo, destaca-se a expansão dos sistemas de Integração Lavoura-Pecuária-Floresta (ILPF), que promovem ganhos em produtividade e sustentabilidade por meio do uso diversificado da terra e da sinergia entre atividades agrícolas e pecuárias (Bungenstab *et al.*, 2019; EMBRAPA, 2022).

A modernização da pecuária tem sido impulsionada por inovações tecnológicas que resultam em maior produtividade, melhor bem-estar animal e menor impacto ambiental. Entre as principais inovações, destacam-se os softwares de gestão, ferramentas de rastreabilidade animal, sensores fisiológicos e ambientais e a adoção de práticas de manejo racional (MAPA, 2023). No entanto, persistem desafios importantes, como os efeitos ambientais da pecuária extensiva — que incluem o desmatamento, a degradação de pastagens e a emissão de gases de efeito estufa (Neto & Orlandini, 2020; Silva *et al.*, 2020).

Adicionalmente, a sanidade dos rebanhos continua sendo uma preocupação constante, dada a presença de enfermidades infecciosas como a Tristeza Parasitária Bovina, brucelose, tuberculose e tripanossomose, que comprometem a produtividade e a qualidade dos produtos de origem animal (Alfieri & Alfieri, 2017; Germano *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2019; MAPA, 2023).

Nesse contexto, a adoção de práticas sustentáveis de manejo, associadas ao monitoramento constante das hemoparasitoses, verminoses e demais doenças infecciosas, bem como ao controle eficaz de ectoparasitos como moscas e carrapatos, torna-se essencial para garantir a sanidade dos rebanhos e a qualidade dos produtos pecuários. A integração entre inovação tecnológica, vigilância sanitária e responsabilidade ambiental é, portanto, o caminho para o fortalecimento da bovinocultura brasileira frente às exigências dos mercados nacional e internacional (EMBRAPA, 2017; Silva *et al.*, 2020; MAPA, 2023).

2.2. Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae compreende um grupo de protozoários flagelados unicelulares, pertencentes à ordem Kinetoplastida, de subordem Trypanosomatida (Kostygov; Yurchenko, 2017). É caracterizada por um único flagelo e um cinetoplasto proeminente, uma organela que contém DNA mitocondrial especializada.

Essa família engloba diversos gêneros, dos quais são de grande importância para a saúde pública devido a sua alta capacidade de causar doenças em humanos, animais e plantas. Onde principalmente estão os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (Castillo-Castañeda *et al.*, 2022).

Devido à ampla diversidade biológica dos tripanossomatídeos, suas formas evolutivas variam entre as diferentes espécies e se desenvolvem ao longo do ciclo biológico tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado. Essas formas são classificadas com base na morfologia celular, levando em consideração o formato do corpo, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e o ponto de inserção do flagelo (Hoare, 1972; Vickerman, 1976), como ilustrado na Figura 1.

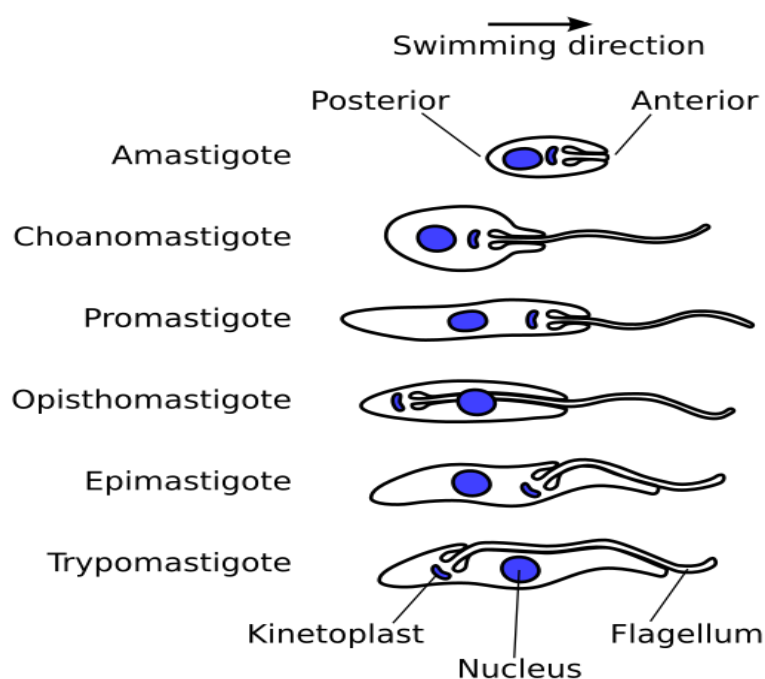


Figura 1. Imagem mostrando a diversidade morfológica das diferentes fases evolutivas dos tripanossomatídeos. Fonte: Souza & Vidal, 2017.

Os tripanossomatídeos compreendem, em sua maioria, protozoários que apresentam ciclos de vida distintos: monoxênos, que completam seu desenvolvimento em um único hospedeiro invertebrado, e heteroxênos, que requerem dois hospedeiros distintos, geralmente um vertebrado e um invertebrado, para completar seu ciclo biológico (Votýpka *et al.*, 2015). Dentre os representantes heteroxênos de relevância para a Medicina Veterinária destacam-se os gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*, cujas espécies são associadas a doenças de importância médica veterinária (Hoare & Wallace, 1966; Merzlyak *et al.*, 2001; Svobodová *et al.*, 2007; Wallace *et al.*, 1983; Wallace, 1966).

Devido aos elevados prejuízos e à dificuldade no manejo, a presença de Trypanosomatidae em animais de rebanho é um desafio significativo dentro do sistema da pecuária mundial. Consequentemente, estudos sobre métodos de diagnóstico precisos e desenvolvimento de controle dessas enfermidades se tornam cada vez mais necessário (Giordani *et al.*, 2016).

2.2.1 Posição taxonômica

A família Trypanosomatidae pertence ao reino *Animalia*, filo *Euglenozoa*, classe *Kinetoplastea* e ordem *Trypanosomatida*. Dentro dessa família, destacam-se os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, ambos com importância médico-veterinária. O gênero *Trypanosoma*, em especial, abriga espécies de relevância para a pecuária brasileira, como *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma theileri* e principalmente *Trypanosoma vivax*. (Hoare, 1972).

O gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843 (*Euglenozoa: Kinetoplastea: Trypanosomatidae*) é capaz de infectar todas as classes de vertebrados. Esses protozoários apresentam um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, requerem a participação obrigatória de pelo menos dois hospedeiros distintos — um vertebrado e um invertebrado — para completar seu desenvolvimento (Riana *et al.*, 2022). Uma exceção notável é *Trypanosoma equiperdum*, cuja transmissão ocorre diretamente por via sexual, dispensando o vetor (Fisher *et al.*, 2013).

Durante a infecção de hospedeiros vertebrados, como os bovinos, os tripanossomas podem ser encontrados no sangue e em diversos tecidos. Já nos hospedeiros invertebrados, ocorre a conclusão das fases de desenvolvimento do parasito, o que torna o controle e a prevenção dessas infecções particularmente desafiadores (Peña-callejas *et al.*, 2022).

O gênero *Trypanosoma* pode ser classificado de acordo com o tipo de contaminação em que estão envolvidos, que ocorre por meio da saliva ou das fezes do artrópode vetor. Quando o hemoflagelado é encontrado na saliva, ele é classificado na Secção Salivaria; por outro lado, quando a contaminação ocorre pelas fezes do vetor, a classificação é na Secção Stercoraria. Os hemoflagelados da Secção Salivaria são os que mais apresentam caráter patogênico, enquanto os da Secção Stercoraria são, em sua maioria, não patogênicos, com exceção do *Trypanosoma cruzi*, responsável pela “doença de Chagas” em humanos (Matthews, 2005; Roque & Jasen, 2014).

Algumas espécies são altamente patogênicas para seus hospedeiros vertebrados, os quais podem incluir o ser humano, como na doença de Chagas causada pelo parasito *T. cruzi* e *Trypanosoma brucei*, causador da “Doença do sono” (HOARE, 1972). Outras são apatogênicas, pouco patogênicas ou ainda de patogenicidade desconhecida como no caso de *T. theileri*, *Trypanosoma cervi*, *Trypanosoma melophagium*, *Trypanosoma stefanskii* e *Trypanosoma theodori* e outras espécies (membros do subgênero *Megatrypanum*) (HOARE, 1972).

Dentre as espécies mais relevantes associados à tripanossomose bovina no Brasil, podemos destacar três principais espécies: *T. evansi*, *T. vivax* e *T. theileri* (Silva *et al.*, 2002).

2.3. Tripanosomatídeos de importância para o gado bovino brasileiro

No cenário da pecuária brasileira, a presença de tripanossomatídeos em rebanhos simboliza um risco significativo tanto no aspecto sanitário quanto econômico (Abraao *et al.*, 2009; Caramori *et al.*, 2022).

As infecções causadas por espécies do gênero *Trypanosoma* comprometem a produtividade dos rebanhos, podendo ocasionar anemia, perda de peso, abortos, diminuição na produção de leite e carne e, em casos mais graves, surtos severos com mortalidade de animais. (Giordani *et al.*, 2016).

Grande parte dessas doenças é subnotificada em diversas regiões do país, devido à ausência da tripanossomose como hipótese no diagnóstico diferencial de outras enfermidades, o que compromete significativamente os rebanhos (Radostits *et al.*, 2000). Além disso, o impacto da tripanossomose não se restringe aos prejuízos individuais de um animal, mas afeta todo o rebanho, podendo acarretar problemas sanitários relevantes. (Guerra *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o reconhecimento dos tripanossomastídeos como agentes de relevância pecuária nacional é essencial para a redução de perdas econômicas e a melhoria da saúde dos rebanhos (Caramori *et al.*, 2022).

2.3.1 *Trypanosoma evansi*

Trypanosoma evansi é um hemoparasito protozoário flagelado (Shorba *et al.*, 2024). Agente etiológico da “surra” ou “mal as cadeiras”, uma enfermidade de grande impacto econômico e sanitário em diversas regiões do mundo (Rodrigues *et al.*, 2016). Inicialmente descrito em 1880 na Índia, *T. evansi* se disseminou para diversas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, América do Sul e Oriente Médio (Hoare, 1972), e no Brasil se tornou endêmico em áreas como o Pantanal Mato-grossense (Desquesnes *et al.*, 2013). Afeta principalmente equinos, bovinos e outros mamíferos, incluindo humanos (Desquesnes *et al.*, 2013; Brandão *et al.*, 2002). Diferindo de outros tripanosomas, *T. evansi* não possui um vetor biológico e ciclo complexo, não apresenta fase epimastigota, permanecendo apenas em sua forma tripomastigota tanto na fase de multiplicação quando infectante. Sua transmissão acontece de forma mecânica através de vetores hematófagos como morcegos (Rodrigues *et al.*, 2005), moscas Tabanídeos e *Stomoxys*, ou até por fômites contaminados (Fiorin *et al.*, 2023).

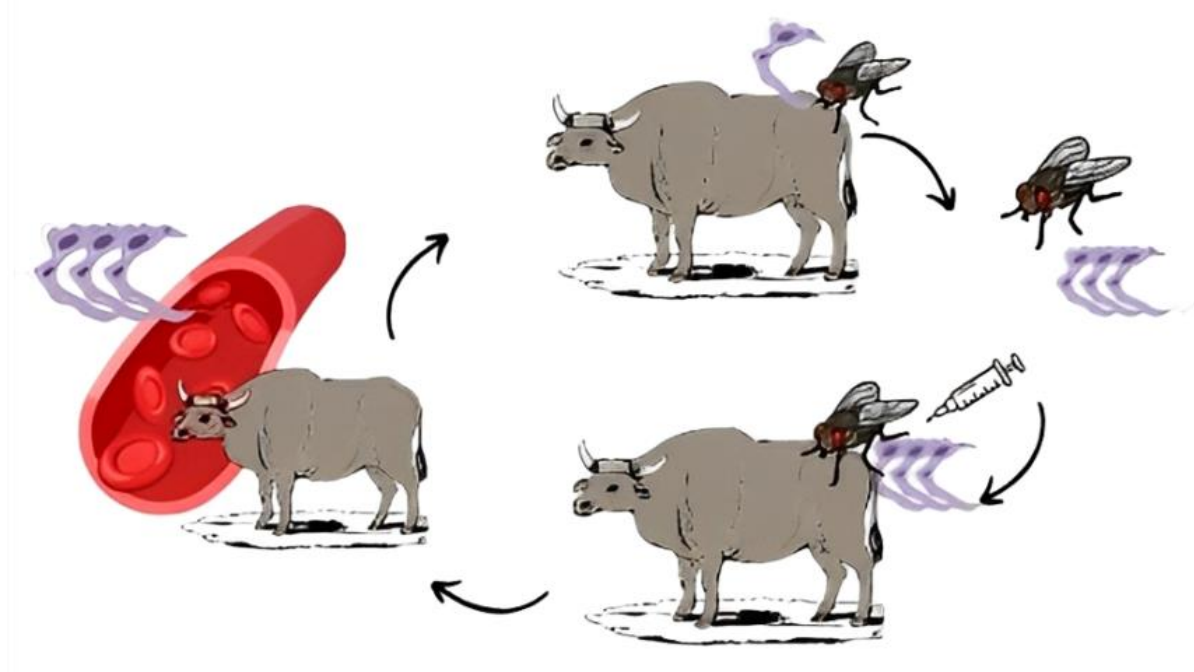


Figura 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma evansi*. Fonte: Elaborado pela autora (2025) com elementos gráficos da imagem obtidos no Canva.com, conforme licenciamento em 2025.

A infecção por *T. evansi* pode se apresentar de forma aguda ou crônica, dependendo da espécie hospedeira e da carga parasitária. No Brasil Herrera *et al.* (2004) descreveu a doença em sua forma aguda, responsável por causar morte em equinos; onde os sintomas se manifestam em forma de elevação da temperatura corporal, desenvolvimento de anemia progressiva, edema de região posterior do corpo ocasionando perda da condição física e levando os animais a morte em meses ou semanas (Silva *et al.*, 2003; Neves *et al.*, 2011). Herrera *et al.* (2004) também descreve a doença em sua forma crônica que acomete principalmente capivaras, sendo estas uma espécie de sentinela para infecções posteriores em equinos. Um estudo realizado por Silva *et al.* (2009) investigou os efeitos de infecção por *T. evansi* em gatos domésticos infectados de forma experimental. Os animais apresentaram mucosas hipocoradas, hidropericárdio,

hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia e alterações histológicas nos órgãos mencionados. Após as análises clínicas, os animais apresentaram anemia regenerativa, redução dos níveis de ferro, atividade da AChE (acetilcolinesterase) no sangue e aumento de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), que são subprodutos da peroxidação lipídica e indicam o grau de estresse oxidativo, estabilizando-se após os sete primeiros dias de infecção.

O trabalho concluiu que os sintomas causados pela infecção por *T. evansi* podem estar relacionados à combinação de fatores, podendo ser explicados por diversos mecanismos, que incluem a destruição das células vermelhas pelos agentes, efeitos imunológicos e a peroxidação lipídica.

Dentro do cenário brasileiro, a prevalência do *T. evansi* varia entre as regiões. Um estudo realizado por Silva *et al.* (2007) detectaram através de esfregaço sanguíneo periférico pela primeira vez a presença de *T. evansi* em bovino da região Sul do Brasil. Silva relata que dez bovinos de uma propriedade em Videira, RS, apresentaram sintomas como anorexia, apatia, emagrecimento progressivo, entre outros. Todos os animais doentes foram tratados para anaplasmose e babesiose, após a morte de quatro animais, uma novilha que estava prenha de oito meses, foi recolhida para a realização do esfregaço sanguíneo. Foi possível visualizar a presença do parasito.

Também no Rio grande do Sul, foi relatado um surto em uma propriedade de equinos, onde dos 125 animais doentes, 52 vieram a óbito. Os animais apresentavam os sinais clássicos e também sinais neurológicos. O diagnóstico foi obtido por meio de observação do parasito em lâmina de esfregaço sanguíneo e imunohistoquímica (Rodrigues *et al.*, 2005).

Na região de Pantanal mato-grossense o *T. evansi* é bastante disseminado, a região apresenta alta diversidade de hospedeiros, incluindo mamíferos domésticos e silvestres, como cavalos, cães, capivaras, quatis, jaguatiricas e onças-pintadas (Martins, 2010).

2.3.2. *Trypanosoma vivax*

Trata-se de um protozoário hemoparasito originário do continente africano capaz de infectar ruminantes em geral e causador da tripanossomose bovina (Souza; Pereira; Silenciato, 2024). É uma das mais importantes espécies, conhecida por infectar animais domésticos e selvagens (Bezerra *et al.*, 2008).

Acredita-se que sua chegada às Américas do Sul e Central aconteceu por volta de 1830 por meio de um rebanho bovino trazido do Senegal (Wells, 1984). No Brasil, o primeiro relato veio de bovinos no estado do Pará em 1946 e posteriormente em búfalos do mesmo estado (Shaw; Lainson, 1972). Nas Américas, sua transmissão ocorre principalmente de forma mecânica pela picada de dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus* sp. e *Stomoxys* sp. (Lopes *et al.*, 2018). Também foi detectada a presença do parasita na probóscide e tórax-abdômen da mosca *Haematobia irritans* (Sales *et al.*, 2017). Outras formas de transmissão descritas forma através de fômites contaminados e compartilhados entre os animais do rebanho (Bezerra *et al.*, 2023) e por via transplacentária (Silva *et al.*, 2013).

No continente africano, seu ciclo biológico começa com o vetor (*Glossina* sp.) ingerindo a forma tripomastigota do parasito (Jones; Dávila, 2001; Batista *et al.*, 2007.). No esôfago e faringe da mosca, o parasito assume a forma de epimastigota, retorna para o aparelho bucal multiplicando-se de maneira vigorosa. Após a multiplicação, transforma-se em tripomastigota e torna-se infectante. Ao se alimentar, a mosca inocula o parasito na pele do hospedeiro definitivo (vertebrado) que se multiplica por divisão binária na corrente sanguínea desses animais, invade os tecidos e causam dano tecidual em vários órgãos (Silva *et al.*, 2002; Jansen *et al.*, 2024). Mesmo com a produção de anticorpos do bovino, o parasito possui a alta capacidade genética de codificar diferentes proteínas de superfície. Tal processo é denominado “variação antigênica”, ou seja, ele substitui a sua proteína de superfície por uma nova que o hospedeiro não tenha anticorpos, o que auxilia na proteção e permanência do parasito dentro

do organismo do hospedeiro vertebrado. Esse processo persiste até que não seja mais possível que aconteça essa troca de proteína ou que o hospedeiro não resista (Cavalcanti *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2020).

No Brasil, como não há a presença da mosca tsé tsé (*Glossina* sp.) o parasito é transmitido de forma mecânica entre os animais. O hospedeiro invertebrado (tabanídeos, comumente moscas dos gêneros *Stomoxys* e *Haematobia*) se alimenta do sangue de animais que possuam alta parasitemia e transmitem o parasito a outros animais sadios sem que haja multiplicação desses parasitos dentro do hospedeiro invertebrado. Sua multiplicação também ocorre por fissão binária, porém o parasito se mantém na forma de tripomastigota durante todo o processo (Bastos *et al.*, 2017).

A transmissão iatrogênica do parasito acontece de forma parecida com a forma mecânica, mas ao invés de estar relacionada com um hospedeiro invertebrado, ela ocorre com a inoculação do parasito em sua forma tripomastigota através de superfícies perfuro cortantes, como seringas e agulhas, contaminados e compartilhados entre os animais do rebanho (Silva *et al.*, 2002; Caramori, 2022). Uma prática frequente em propriedades leiteiras, como a aplicação de ocitocina por via intravenosa antes da ordenha, pode favorecer essa via de disseminação, especialmente quando agulhas e seringas são reutilizadas entre animais. Em um surto documentado por Bastos *et al.* (2017) no estado de Goiás, a transmissão do *T. vivax* foi associada ao uso de uma única seringa e agulha para aplicação diária de ocitocina em vacas lactantes. Além disso, observou-se a presença de seringas contendo ocitocina misturada com sangue nos locais de manejo, evidenciando o risco da contaminação cruzada e reforçando a importância das boas práticas sanitárias na prevenção da tripanossomose.

Um estudo de Silva *et al.* (2013) mostrou um experimento onde ocorreu a infecção de ovelhas prenhes de forma iatrogênica para a observação do desenvolvimento gestacional e avaliação sobre a influência do *Trypanosoma vivax* durante a gestação. O estudo teve como resultado além da morte de algumas ovelhas, a morte de todos os fetos onde alguns foram abortados e outros nasceram e morreram após alguns dias. Durante a necropsia dos fetos, foi possível observar a presença de *T. vivax* em tecidos, o que confirma a contaminação via transplacentária, além de apresentar comprometimento reprodutivo significativo.

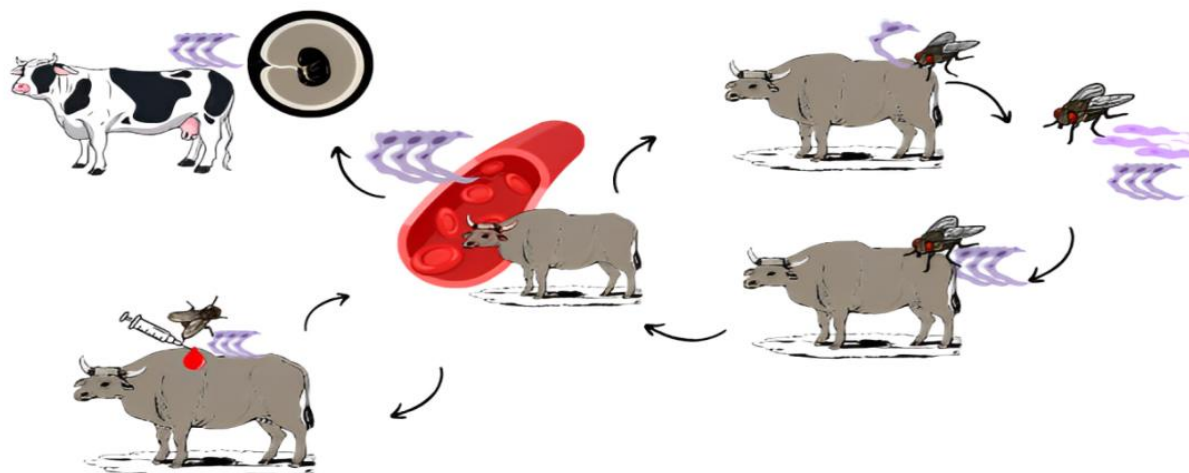


Figura 3: Ciclo biológico de *Trypanosoma vivax*. Fonte: Elaborado pela autora (2025) com elementos gráficos da imagem obtidos no Canva.com, conforme licenciamento em 2025.

Existe uma variância de sinais clínicos de acordo com diversos fatores, como fase da doença, por exemplo. Porém, os sinais e sintomas são semelhantes a variadas patologias comuns em rebanhos, como febre, apatia, hiporexia, anorexia, perda de peso, queda no ganho de peso, aborto, mucosas hipocoradas, linfadenomegalia, anemia e em casos mais graves, distúrbios neurológicos (Pandolfi *et al.*, 2024; Bonilla *et al.*, 2021).

A infecção por *T. vivax* em bovinos é endêmica em diversas regiões do mundo, especialmente na América do Sul e África. No Brasil, a prevalência de *T. vivax* tem sido amplamente documentada por estudos sorológicos e moleculares, evidenciando a disseminação da tripanossomose em diversas regiões do país. Por exemplo, no estado do Rio Grande do Sul, 44,5% dos bovinos examinados apresentaram soropositividade para *T. vivax*, evidenciando a disseminação do parasito na região (Pereira *et al.*, 2020). Além disso, na Baixada Maranhense, 79,3% dos búfalos testados apresentaram anticorpos contra *T. vivax*, embora a parasitemia tenha sido baixa (Silva *et al.*, 2023).

Um levantamento realizado entre 2020 e 2021, envolvendo 5.114 amostras de soro de 287 municípios de 14 estados brasileiros, incluindo o estado do Rio de Janeiro revelou uma soroprevalência de 56,5%, com 2.886 amostras positivas para *T. vivax* (Donadon, 2023). Estudos moleculares realizados em diversos municípios do estado do Rio de Janeiro detectaram o agente em focos/surtos da doença (Costa *et al.*, 2020; Abreu *et al.*, 2024).

2.3.3. *Trypanosoma theileri*

Trypanosoma theileri é um protozoário flagelado da espécie-tipo do subgênero *Megatrypanum*, um parasito relativamente grande (30-70 µm de comprimento), apresenta uma membrana ondulante bem definida (Hoare, 1964) extensivamente distribuído entre bovinos em todo o mundo (Villa *et al.*, 2008). Amplamente conhecido por infectar bovinos, este protozoário também é encontrado em outros animais como caprinos e ovinos (Chávez-Larrea *et al.*, 2023).

Na transmissão, os tabanídeos são considerados os principais vetores biológicos. A forma metacíclicas do parasito é desenvolvida no intestino dos insetos e posteriormente serão

eliminadas nas fezes desses vetores por via estercorária (pelas fezes) durante o repasto sanguíneo no hospedeiro. Os animais são infectados pela contaminação pelas fezes dos parasitos ou pela ingestão desses invertebrados (Böse, 1987; Böse & Heister, 1993). No entanto, alguns estudos apontam outros possíveis vetores de *T. theileri*, como descrevem Martins *et al.* (2008), onde o estudo relata a presença de formas epimastigota de um Trypanosomatídeo morfológicamente compatível com *T. theileri* na hemolinfa do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O estudo de Brotánková *et al.* (2022) também mostrou outro possível vetor para o *T. theileri*, onde teve como objetivo investigar a capacidade vetorial de mosquitos e outros dípteros. A partir de 4051 mosquitos capturados na República Tcheca entre 2017 e 2019, os autores descreveram a prevalência de *T. theileri* em espécies do gênero *Aedes* por meio de análise molecular. Além disso, foi possível confirmar a capacidade vetorial por infecções experimentais em *Aedes aegypti* usando isolados de mosquito, sendo observada a forma metacíclicas do *T. theileri* no intestino e urina dos vetores infectados.

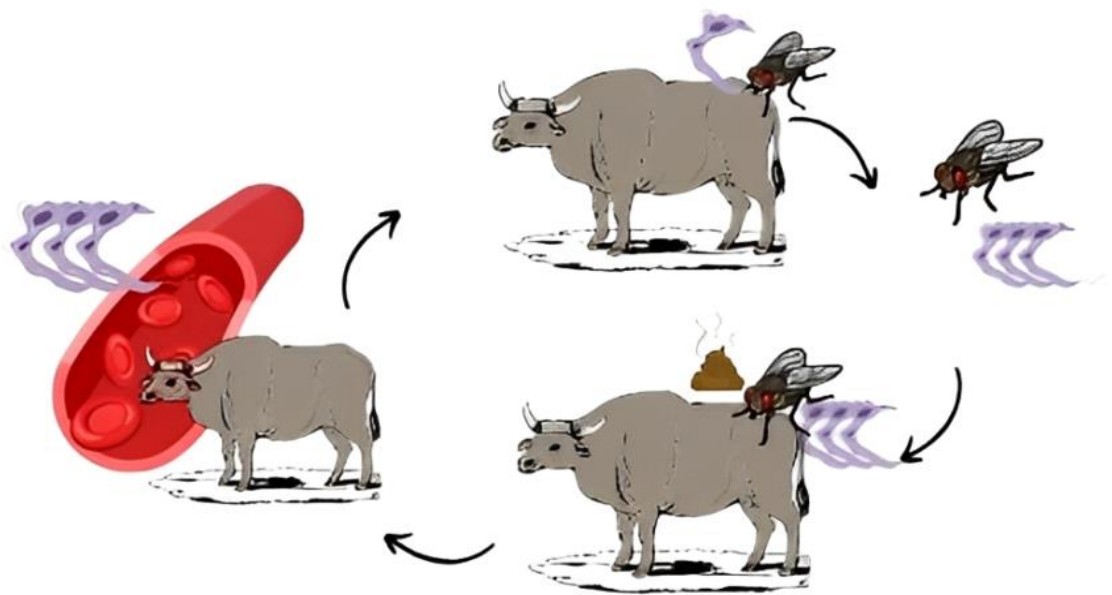


Figura 4. Ciclo biológico de *Trypanosoma theileri*. Fonte: Elaborado pela autora (2025) com elementos gráficos da imagem obtidos no Canva.com, conforme licenciamento em 2025.

Embora em muitos artigos seja considerado um parasito de baixo risco e de baixa patogenicidade, evidências atuais apontam que principalmente os animais coinfectados com outros agentes e parasitos gastrointestinais podem apresentar sinais clínicos inespecíficos como febre, anemia e perda de peso (Hajihassani *et al.*, 2020; Villa *et al.*, 2008). A infecção também pode ocorrer de forma subclínica, onde os sintomas podem levar anos para se apresentar. Nesses casos também pode ocorrer a queda de peso (Amato *et al.*, 2019). Casos de sintomas mais graves já foram descritos e incluem os sintomas de infecção cerebral, testicular, esplenomegalia, anemia hemolítica, febre, mucosas hipocoradas, linfadenomegalia e aborto (Kaliner, 1972; Mitchell & Long, 1980; Braun *et al.*, 2002; Hajihassani *et al.*, 2020). Tais achados confirmam que a negligência frente à presença de *T. theileri* nos rebanhos pode acarretar riscos sanitários consideráveis.

Em estudo realizado por Lee *et al.* (2010) revelam uma prevalência de *T. theileri* em bovinos variando de 10 a 90%. No entanto, estudo recente no estado do Rio de Janeiro, apresentou prevalência baixa de 0,88% (dados em fase de publicação), a qual pode estar relacionada a ausência de vetores biológicos, apesar de haver relatos de detecção deste agente

em carrapatos (Morzaria *et al.*, 1986; Latif *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2008; Burgdorfer *et al.*, 1973), e à baixa endemicidade do agente no estado do Rio de Janeiro (Abreu *et al.*, 2024). Em outros países como no México e Sri Lanka, a prevalência para este parasito foi de 26,6% e 7,6%, respectivamente (Flores, 2021; Yokoyama *et al.*, 2014). Pacheco *et al.* (2014) analisando sangue de bovinos da região amazônica ocidental do Brasil, encontraram um percentual de 42,9% entre os rebanhos.

2.4. Diagnóstico de *Trypanosoma* spp.

Para a realização de um diagnóstico definitivo das diferentes espécies de *Trypanosoma* se faz necessário uma análise laboratorial envolvendo técnicas de detecção molecular ou sorológica, demonstrando a presença do agente na amostra avaliada. Quando se trata de um hospedeiro na fase aguda, a qual se tem um alto nível de parasitemia, é possível realizar, inclusive, a detecção do agente por meio de métodos parasitológicos diretos (Silva, 2017). Por outro lado, na fase crônica da doença ocorre a redução da parasitemia, dificultando o diagnóstico direto do agente. Neste caso, opta-se por métodos sorológicos indiretos baseados na detecção de anticorpos específicos. No entanto, essa técnica não permite diferenciar infecções ativas daquelas já tratadas (González *et al.*, 2006; Cury *et al.*, 2010), o que torna essencial a avaliação do histórico clínico do paciente para a obtenção de um diagnóstico assertivo.

2.4.1. Diagnóstico Parasitológico

O diagnóstico direto, também denominado exame parasitológico de visualização, permite a observação do protozoário diretamente em amostras biológicas por meio da microscopia óptica. Este exame pode ser realizado a partir de materiais como sangue fresco, fluidos linfáticos, líquido, secreções genitais ou amostras de órgãos, obtidas por punção ou coleta convencional (Radostits *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003; Desquesnes, 2004).

A identificação do parasito baseia-se na análise de suas características morfológicas e dimensionais, que variam conforme o gênero, o que auxilia tanto no reconhecimento quanto na diferenciação entre espécies (Radostits *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003; Desquesnes, 2004).

Dentre as amostras disponíveis, o sangue é o material mais frequentemente utilizado devido à facilidade de obtenção, seja por punção de veias calibrosas como a jugular, ou por capilares periféricos, como os da extremidade da orelha (Desquesnes, 2004; Connor; Bossche, 2005). Entre as técnicas diretas mais empregadas estão: a gota espessa, que consiste na análise de uma amostra de sangue colocada entre lâmina e lamínula e visualizada sob objetiva de 100×; o esfregaço sanguíneo, corado com Giemsa, que proporciona uma camada fina ideal para leitura em grande aumento (Silva *et al.*, 2003; Desquesnes, 2004); e o método do micro-hematócrito (ou técnica de Woo), no qual a amostra é centrifugada para isolar a camada leucocitária, que posteriormente é utilizada para preparação de esfregaço, coloração e observação microscópica (Hoare, 1972; Silva *et al.*, 2003).

Além disso, o aspirado de linfonodo também é uma abordagem eficaz, assim como o exame da camada leucocitária, o qual se destaca por sua maior sensibilidade e confiabilidade, sendo amplamente recomendado para o diagnóstico em campo (Hoare, 1972; Silva *et al.*, 2003; Madruga, 2006; Abrão *et al.*, 2009).

Embora os exames parasitológicos sejam altamente específicos, estes apresentam limitações quanto à sensibilidade, especialmente em fases crônicas ou subclínicas da doença, nas quais a quantidade de parasitos circulantes no sangue é reduzida (Connor; Bossche, 2004; Madruga *et al.*, 2006), sendo mais indicados durante a fase aguda da enfermidade, período no qual ocorrem picos de parasitemia, geralmente coincidentes com episódios febris. À medida que a doença progride, esses picos tornam-se mais espaçados e menos intensos, dificultando a

detecção direta do agente e exigindo a complementação diagnóstica com outras técnicas (Radostits *et al.*, 2000).

2.4.2. Diagnóstico Sorológico

Os testes sorológicos têm como principal função a detecção de anticorpos contra tripanossomatídeos no soro sanguíneo ou em outros fluidos biológicos (Radostits *et al.*, 2000). São métodos de execução relativamente simples e rápida, com custo acessível e sensibilidade superior à dos exames parasitológicos tradicionais (Madrid, 2017). Entre os testes sorológicos mais utilizados destacam-se o ELISA indireto (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ou Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Germano *et al.*, 2018). O ELISA, por utilizar anticorpos monoclonais para identificação de antígenos circulantes do parasito, permite a detecção precoce da infecção, sendo mais sensível nas fases iniciais da doença em comparação à RIFI (Radostits *et al.*, 2000; Sampaio, 2013).

Apesar de sua eficácia, uma limitação importante das técnicas sorológicas indiretas está relacionada à sua incapacidade de diferenciar infecções ativas de exposições anteriores, uma vez que os anticorpos podem permanecer detectáveis mesmo após a resolução da infecção. Além disso, em fases muito iniciais, a soroconversão pode não ter ocorrido de forma suficiente para ser detectada, o que reduz a sensibilidade nesses casos (Radostits *et al.*, 2000; Madrid, 2017). Por essa razão, a aplicação desses testes é mais recomendada nas fases crônica e subclínica da tripanossomose, onde a parasitemia geralmente é baixa.

Além disso, esses testes possuem baixa especificidade, devido à semelhança antigênica entre diferentes espécies do gênero *Trypanosoma*, o que dificulta a identificação exata do agente envolvido (Silva *et al.*, 2002; Desquesnes, 2004). A ocorrência de reações cruzadas, especialmente em regiões endêmicas com presença de *T. evansi*, compromete a acurácia do diagnóstico (Osório *et al.*, 2008), uma vez que a detecção de anticorpos contra outras espécies de *Trypanosoma* pode não ser diferenciada.

Apesar dessas limitações, os testes sorológicos são ferramentas valiosas para estudos epidemiológicos, pois permitem a estimativa da prevalência da infecção em rebanhos e regiões afetadas (Desquesnes, 2004). Também são indicados como testes de triagem em áreas onde a doença não é enzoótica, auxiliando na detecção precoce de focos (Desquesnes, 2004).

2.4.3. Diagnóstico Molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) destaca-se como a técnica de maior sensibilidade para a detecção de tripanossomatídeos, especialmente eficaz em fases crônicas da infecção, quando a parasitemia é baixa e os parasitos estão distribuídos em tecidos (D'ávila *et al.*, 1997; Madruga, 2004). Devido à significativa diferença de sensibilidade entre métodos convencionais, como o exame direto, e as abordagens moleculares, diversos protocolos de PCR foram desenvolvidos para diagnóstico de hemoprotozoários ao longo dos últimos anos. Dentre esses, a técnica de Nested-PCR tem sido amplamente aplicada por apresentar ainda maior sensibilidade, ampliando a detecção de DNA parasitário mesmo em cargas extremamente baixas (Madruga *et al.*, 2004).

Além da elevada sensibilidade, a PCR apresenta alta especificidade, permitindo a identificação de espécies patogênicas de *Trypanosoma* com base na amplificação de regiões específicas do DNA genômico, o que favorece o diagnóstico diferencial entre espécies (Desquesnes, 2004). No entanto, apesar dessas vantagens, a PCR convencional não fornece informações sobre o estágio clínico ou a evolução da infecção, sendo mais adequada para confirmação da presença do agente. Para esse tipo de informação, a PCR em tempo real (qPCR) é preferida, pois permite quantificar a carga parasitária nas amostras analisadas, contribuindo para estimativas prognósticas (Sampaio, 2013).

Outra técnica promissora é a amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP), que possibilita a amplificação do material genético em temperatura constante, dispensando o uso de termocicladores. Essa metodologia se destaca pela execução simples, rapidez e baixo custo, sendo ideal para aplicação em laboratórios com recursos limitados ou em diagnósticos realizados diretamente no campo. Por essas razões, a LAMP tem sido explorada como ferramenta alternativa eficaz na detecção de *T. vivax* (Cadiolle *et al.*, 2015).

Geysen e colaboradores (2003) desenvolveram oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para o gene que codifica a subunidade ribossomal 18S, capazes de amplificar sequências presentes em diversas espécies de *Trypanosoma*. A partir do produto amplificado, é possível diferenciar as espécies por meio de análises de restrição enzimática ou pela aplicação de outras ferramentas moleculares complementares.

Para o diagnóstico específico de *T. vivax*, tem sido utilizado primers direcionados ao gene responsável pela codificação da proteína transportadora de glicose (GTP), que se mostrou conservado em diferentes isolados da espécie, incluindo aqueles circulantes no Brasil (Madruga *et al.*, 2006; Masake *et al.*, 1997).

Adicionalmente, as técnicas moleculares têm potencial não apenas para identificar a presença do parasita, mas também para caracterizar a diversidade genética entre cepas, permitindo o estudo da interação parasita-hospedeiro. Marcadores moleculares como TVW1 & TVW2, ILO1264 & ILO1265 e TV80 & TV322.24, baseados em DNA satélite, têm sido empregados na detecção de tripanossomatídeos pertencentes à seção *Salivaria*. Outros alvos genéticos, como regiões de minicículos e o gene do mini-exón, também têm sido utilizados para aumentar a especificidade e robustez do diagnóstico molecular (Silva *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2001).

As enzimas do tipo catepsina L, conhecidas como cisteínoproteases *CatL*-like, desempenham funções essenciais no metabolismo, na diferenciação celular, na infectividade, na evasão da resposta imune e na patogenicidade dos tripanossomatídeos. Devido à sua relevância biológica, essas enzimas têm sido estudadas como potenciais alvos no desenvolvimento de fármacos, vacinas e métodos diagnósticos (Sajid *et al.*, 2002; Lalmanach *et al.*, 2002). A análise filogenética das cisteínoproteases tem contribuído para o entendimento das relações evolutivas entre diferentes espécies de *Trypanosoma*, além de permitir a identificação de sequências específicas que podem elucidar o papel funcional dessas enzimas nos ciclos biológicos e mecanismos de patogenicidade dos parasitos.

As cisteínoproteases foram amplamente investigadas em *T. cruzi*, *T. congolense* e *T. brucei brucei*, utilizando abordagens bioquímicas, moleculares e imunológicas. Um dos aspectos relevantes é a presença de múltiplas cópias dos genes *CatL*-like e a combinação entre regiões conservadas e divergentes dentro e entre as espécies de *Trypanosoma*, o que reforça seu potencial como marcador molecular para diagnóstico e estudos de diversidade genética populacional. De fato, polimorfismos nessas regiões têm sido empregados com sucesso para diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli*, além de permitir a caracterização de genótipos de *T. cruzi* (Sajid *et al.*, 2002; Lalmanach *et al.*, 2002).

Em um estudo específico voltado ao diagnóstico de *T. vivax*, foi desenvolvida a técnica *TviCatL*-PCR, baseada na amplificação de uma sequência do gene *CatL*-like. Essa abordagem demonstrou alta sensibilidade e especificidade, sendo eficaz mesmo quando aplicada a amostras de sangue armazenadas à temperatura ambiente e extraídas por métodos simples, o que a torna especialmente útil para condições de campo (Cortez *et al.*, 2009). A especificidade da técnica foi validada mediante testes com diferentes isolados de *T. brucei*, *T. evansi*, *T. congolense* e *T. theileri*, todas espécies que infectam ruminantes, confirmando que a *TviCatL*-PCR é direcionada exclusivamente a *T. vivax* (Rodrigues *et al.*, 2006).

Entretanto, a diversidade genética entre isolados de *T. vivax* provenientes das regiões oeste e leste da África representa um desafio adicional para o diagnóstico molecular preciso,

devido à variação significativa nas sequências-alvo (Desquesnes *et al.*, 2001; Malele Craske II *et al.*, 2003). Nesse contexto, a Tvi*CatL*-PCR constitui uma ferramenta promissora em estudos epidemiológicos, pois permite não apenas a detecção da infecção, mas também a discriminação entre diferentes genótipos de *T. vivax*, contribuindo para o monitoramento da diversidade genética e da distribuição geográfica desse parasito.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local do estudo e coleta das amostras

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob nº. 1051220524, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ (Anexo I). As amostras foram coletadas de fazendas de gados bovinos de seis municípios do estado do Rio de Janeiro: Vassouras, Miguel Pereira, Seropédica, Teresópolis, Piraí e Volta Redonda. A seleção das propriedades foi realizada por conveniência, considerando-se a disponibilidade dos proprietários, acesso às áreas e viabilidade logística das coletas. O rebanho-alvo foi composto por bovinos de aptidão leiteira e de corte, e não foi utilizado bando amostral definido previamente.

Tabela 1 - Caracterização dos municípios amostrados no estado do Rio de Janeiro (IBGE, 2022).

Município	Região	Área total (km²)	Altitude (m)	População (2022)	Clima
Vassouras	Sul Fluminense	536,073	434	33.976	Tropical de altitude
Miguel Pereira	Sul Fluminense	287,933	618	26.582	Tropical de altitude
Piraí	Vale do Paraíba Fluminense	490,255	387	27.474	Tropical de altitude
Seropédica	Baixada Fluminense	283,634	26	80.596	Tropical atlântico
Teresópolis	Serra Fluminense	773,338 (urbana: 64,318)	869	165.123	Tropical de altitude
Volta Redonda	Sul Fluminense	182,105	390	261.563	Tropical de altitude

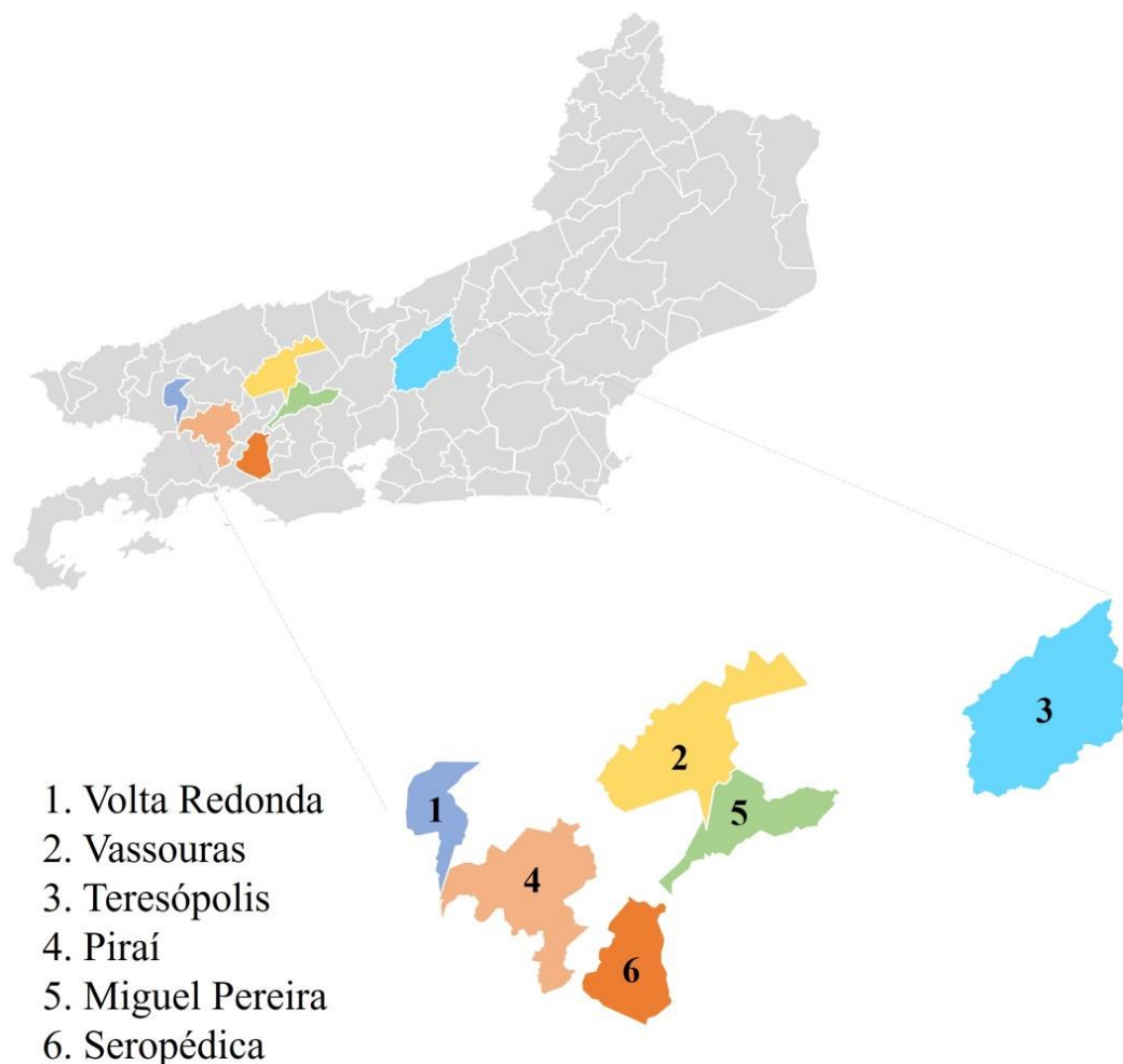


Figura 5. Mapa das cidades fonte de coleta do experimento. Fonte: IBGE, 2022.

No total, foram coletadas 398 amostras sanguíneas de sete fazendas entre novembro de 2022 e janeiro de 2025. A amostragem dentro das propriedades foi aleatória simples, respeitando critérios como a presença de animais adultos clinicamente saudáveis e a possibilidade de contenção segura. A propriedade situada no município de Vassouras foi visitada em dois momentos distintos (2022 e 2024), com o objetivo de avaliar a persistência de possíveis infecções e a dinâmica de circulação do parasito no mesmo plantel, justificando o maior número de amostras provenientes dessa localidade.

Para a coleta, os animais foram contidos em tronco, e realizou-se antissepsia da região ventral da base da cauda com algodão embebido em álcool 70%. A seguir, efetuou-se a venopunção coccígea com agulha 21G, colhendo-se aproximadamente 2 mL de sangue por animal. O volume foi suficiente para a realização das análises moleculares e permitir a separação em alíquotas de 1 mL, facilitando o armazenamento e reduzindo a necessidade de descongelamentos repetidos. O sangue foi coletado em tubos a vácuo com EDTA, que foram refrigerados imediatamente e, posteriormente, armazenados a -80°C no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP/UFRRJ) até o processamento.

3.2. Extração de DNA e verificação de gene endógeno

A extração do DNA genômico foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook (1989). Após a extração, as amostras foram acondicionadas em tubos de polipropileno de 1,5 mL, devidamente identificadas e armazenadas a -20 °C até a realização das análises moleculares. Embora não tenha sido realizada uma quantificação e padronização formal da concentração do DNA, as amostras foram diretamente utilizadas nas reações de PCR. A obtenção de amplificações bem-sucedidas sugere que a qualidade do material genético foi adequada para os procedimentos propostos.

3.3. Verificação do gene endógeno

Após a extração de DNA, para verificação da viabilidade do DNA extraído, as amostras foram processadas por meio de uma reação de PCR convencional visando o gene endógeno de mamíferos, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*), amplificando um fragmento de 400 pares de base (pb). Foram utilizados os oligoiniciadores GAPDH-F (5' CCTTCATTGACCTCAACTACAT 3') e GAPDH-R (5' CCAAAGTTGTCATGGATGACC 3') (Birkenheuer; Levy; Breitschwerdt, 2003). Os seguintes reagentes foram utilizados para amplificação (volume final: 25 µl): 0.8 µM de cada primer; 1.5 mM de MgCl₂; tampão de PCR 1x (5x Colorless, Promega®); 0.2 mM de dNTPs; 1 U de Taq DNA polimerase (Promega®) e 2 µL de DNA. A reação foi realizada em um termociclador T100 (Bio-Rad Laboratórios do Brasil®) com desnaturação inicial (95 °C, 5 min), seguida por 35 ciclos (95 °C, 30 s), anelamento (55 °C, 30 s) e extensão (72 °C, 25 s), com um ciclo de extensão final (72 °C, 5 min). Água ultrapura sem DNase foi utilizada como controle negativo.

3.4 Detecção molecular de *Trypanosoma* spp.

As amostras de DNA extraídas do sangue bovino foram submetidas à amplificação do fragmento *18S* do DNA ribossomal de *Trypanosoma* sp. por PCR convencional, visando a triagem das amostras. As reações direcionadas ao 18S *rDNA* foram conduzidas utilizando os iniciadores 18STnF2 (5'-CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA-3') e 18STnR3 (5'-TGCTCGACCATATATTGCATATAC-3'), responsáveis por amplificar um fragmento de aproximadamente 700 a 800 pb (Geysen *et al.*, 2003). Os seguintes reagentes foram utilizados para amplificação (volume final: 25 µl): 0.5 µM de cada primer; 3 mM de MgCl₂; tampão de PCR 1x (5x Colorless, Promega®); 0.2 mM de dNTPs; 1 U de Taq DNA polimerase (Promega®) e 3 µL de DNA. A reação foi realizada em um termociclador T100 (Bio-Rad Laboratórios do Brasil®) com desnaturação inicial (95 °C, 5 min), seguida por 40 ciclos (94 °C, 30 s), anelamento (58 °C, 45 s) e extensão (72 °C, 40 s), com um ciclo de extensão final (72 °C, 5 min). Água ultrapura sem DNase foi utilizada como controle negativo e DNA de *Trypanosoma amblyommi* foi utilizado como controle positivo.

Na reação de *Trypanosoma* spp. correspondente ao domínio catalítico de enzimas do tipo *CatL-like* (tipo *cdCatL*), os primers DTO 154 (5'-ACAGAATTCCAGGGCCAATGCGGCTCGTGCTGG-3') e DTO155 (5'-TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA-3') foram utilizados, amplificando internamente 500 pb (Cortez *et al.*, 2009). Os seguintes reagentes foram utilizados para amplificação (volume final: 25 µl): 0.4 µM de cada primer; 2 mM de MgCl₂; tampão de PCR 1x (5x Colorless, Promega®); 0.2 mM de dNTPs; 1 U de Taq DNA polimerase (Promega®) e 3 µL de DNA. A reação foi realizada em um termociclador T100 (Bio-Rad Laboratórios do Brasil®) com desnaturação inicial (95 °C, 5 min), seguida por 40 ciclos (94 °C, 30 s), anelamento (56 °C, 30 s) e extensão (72 °C, 35 s), com um ciclo de extensão final (72 °C, 5 min). Água ultrapura sem DNase foi utilizada como controle negativo.

3.5. Eletroforese e Análise dos Resultados

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) sob uma corrente de 75V (5V/cm) por 45 minutos em TAE (Tris, acetato e EDTA). Em seguida, foram corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizados através de transiluminador com luz ultravioleta (L-PIX Sti, Loccus). A fim de determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, eles foram comparados a um padrão de peso molecular de 100pb (100bp Ladder Plus, Ready-To-Use, M1071, Sinapse Inc®).

3.6. Sequenciamento genético e análise filogenética

O material para sequenciamento foi purificado a partir de 5 µL do produto de PCR das amostras positivas no gene *CatL*, sendo tratados com Exo-Sap-IT (GE Healthcare®), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em ambas as direções em um analisador genético automatizado (ABI 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems®) no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular PPGCV/ UFRRJ.

As sequências de *Trypanosoma*, baseadas no gene *CatL*, obtidas neste estudo foram montadas e editadas utilizando o programa CLC Genomics WorkBench v5.1 e, posteriormente, alinhadas com sequências similares disponíveis no GenBank por meio da ferramenta Clustal W, com ajustes manuais realizados no programa MEGA 11.0 (Tamura *et al.*, 2021). As sequências utilizadas para o alinhamento comparativo foram selecionadas com base na similaridade por meio da ferramenta BLASTn e na relevância científica, sendo previamente publicadas em artigos revisados por pares.

A escolha do modelo evolutivo mais adequado para as análises filogenéticas foi realizada no programa MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021), com base na comparação de diferentes modelos de substituição nucleotídica e seleção do modelo com o menor valor do Critério de Informação de Akaike (AIC), que indica o melhor ajuste aos dados com penalização por complexidade. As análises filogenéticas com o gene *CatL* foram conduzidas pelo método da Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood, ML), utilizando o modelo de substituição Kimura de dois parâmetros (Kimura 2-parameter, K2P), previamente identificado como o mais apropriado. O alinhamento incluiu 35 sequências de nucleotídeos, e a espécie *Trypanosoma congolense* (acesso GenBank: KF414042.1) foi utilizada como grupo externo (*outgroup*) para enraizamento da árvore. O suporte estatístico dos agrupamentos (clados) foi avaliado por meio de uma análise de bootstrap com 1000 réplicas, utilizando uma busca heurística que permite estimar a confiabilidade dos ramos da árvore filogenética.

4 RESULTADOS

Foram coletadas, ao todo, 398 amostras sanguíneas de bovinos de fazendas de criação dentro de seis cidades do Rio de Janeiro: Vassouras, Miguel Pereira, Seropédica, Teresópolis e Volta Redonda (tabela 1).

Tabela 2 – Distribuição das amostras por município, ano de coleta, número de positivos e percentual de positividade para *Trypanosoma vivax* no estado do Rio de Janeiro (2022–2025).

Município	Amostras 2022	Amostras 2024	Amostras 2025	Total de amostras	Nº de positivos	% de positivos
Vassouras	124	135	-	259	0,00%	0,00%
Piraí	15	41	-	41	0,00%	0,00%
Miguel Pereira	41	20	-	20	0,00%	0,00%
Seropédica	20	33	-	33	0,00%	0,00%
Teresópolis	33	15	-	15	0,00%	0,00%
Volta Redonda	30	-	30	30	13	43,33%
Total	398	244	30	398	13	3,27%

A qualidade da extração foi confirmada com a amplificação do gene endógeno GAPDH, através de análises moleculares, em todas as amostras utilizadas para o estudo. Dentre as 398 amostras de sangue analisadas neste estudo, 3,27% (13/398) das amostras amplificaram para *Trypanosoma* spp. com alvo nos marcadores *18S* rDNA e *CatL*. Analisando por municípios, não houve detecção nos municípios de Vassouras, Miguel Pereira, Seropédica, Piraí e Teresópolis, tendo positividade somente na propriedade do município de Volta Redonda, representando 43,3% (13/30) das amostras estudadas da propriedade e 3,27% (13/398) do total de amostras do presente estudo.

Das 13 amostras positivas identificadas no estudo, foram escolhidas aleatoriamente seis amostras para o sequenciamento (gene *CatL*), uma vez que eram animais da mesma propriedade, revelando 100% de similaridade entre si. A análise por BLASTn demonstrou 100% de identidade, com cobertura de sequência (Query coverage) de 100%, em relação a *T. vivax* previamente descrito em bovinos do Brasil (PP261306 – PP261311) e da África Ocidental (EU753800; AB781078; EU753795).

Na análise filogenética do gene *CatL* de *T. vivax*, as linhagens bovinas recém-identificadas no estado do Rio de Janeiro agruparam-se com sequências provenientes de gado doméstico da África Ocidental, especificamente dos países Burkina Faso, Gana e Nigéria, além de sequências previamente descritas no Brasil (Rio de Janeiro) (Figura 6).

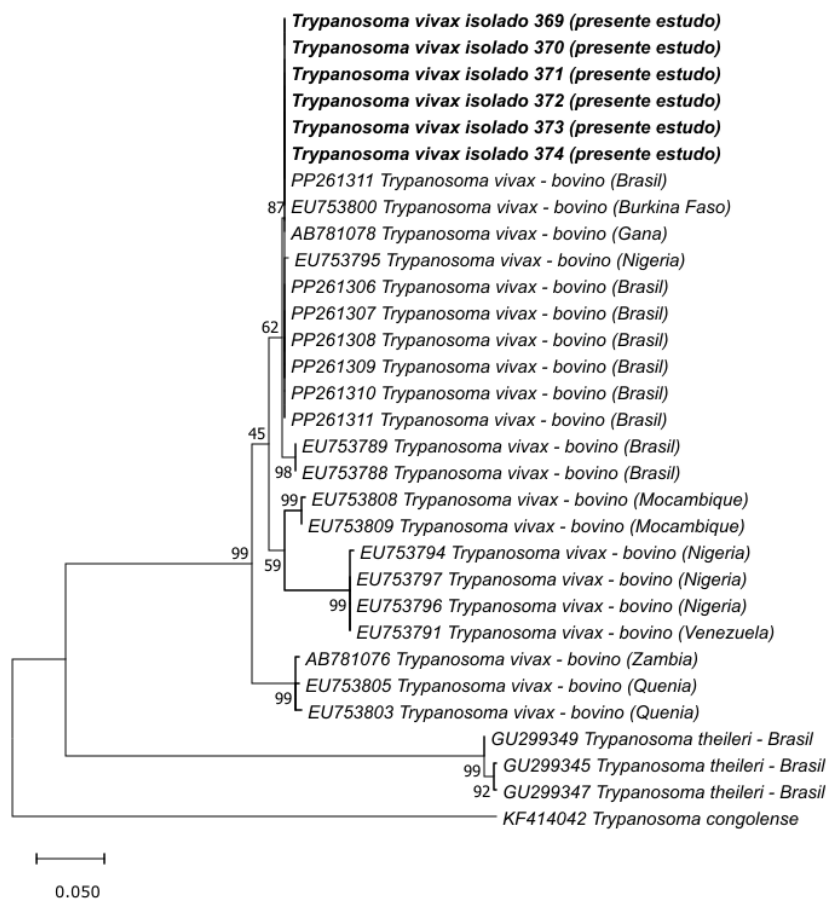


Figura 6. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *catL* de *Trypanosoma* de bovinos com a probabilidade mais alta, inferida usando o método de Máxima Verossimilhança e o modelo Tamura 3 parâmetros com distribuição Gama (G). Esta análise envolveu 31 sequências de nucleotídeos, com um dataset final de 449 posições. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA X.

A estimativa da distância evolutiva geral (overall mean distance) considerando apenas as sequências de *T. vivax* foi de 0.03, indicando um baixo nível de divergência genética entre os isolados da espécie. Quando incluídas as sequências dos outgroups *T. theileri* e *T. congolense*, a distância evolutiva média aumentou para 0.15, refletindo a maior divergência genética esperada entre diferentes espécies do gênero *Trypanosoma*.

Foram analisadas 27 sequências do gene *catL* de *T. vivax*, agrupadas conforme a origem geográfica. Entre os grupos analisados, a menor divergência evolutiva foi observada entre Burkina Faso e Gana (0,0000), indicando alta similaridade entre as sequências desses países. O grupo Brasil apresentou baixa divergência em relação a Burkina Faso e Gana (0,0015), e valores moderados em relação a Moçambique (0,0349) e Nigéria (0,0476). As maiores distâncias foram registradas entre Venezuela e Quênia (0,1084) e entre Zâmbia e Venezuela (0,1067), refletindo os maiores níveis de variação entre os grupos geográficos (Tabela 3).

Tabela 3 – Distância Evolutiva Média entre grupos geográficos de *T. vivax* (catL)

Grupo 1	Grupo 2	Distância Evolutiva Média
Brasil	Burkina Faso	0,0015
Brasil	Gana	0,0015
Brasil	Moçambique	0,0349
Brasil	Nigéria	0,0476
Brasil	Zâmbia	0,0571
Brasil	Venezuela	0,0614
Brasil	Quênia	0,0585
Burkina Faso	Gana	0,0000
Burkina Faso	Moçambique	0,0336
Burkina Faso	Nigéria	0,0459
Burkina Faso	Zâmbia	0,0574
Burkina Faso	Venezuela	0,0597
Burkina Faso	Quênia	0,0589
Gana	Moçambique	0,0336
Gana	Nigéria	0,0459
Gana	Zâmbia	0,0574
Gana	Venezuela	0,0597
Gana	Quênia	0,0589
Moçambique	Nigéria	0,0535
Moçambique	Zâmbia	0,0614
Moçambique	Venezuela	0,0585
Moçambique	Quênia	0,0629
Nigéria	Zâmbia	0,0944
Nigéria	Venezuela	0,0161
Nigéria	Quênia	0,0973
Zâmbia	Venezuela	0,1067
Zâmbia	Quênia	0,0056
Venezuela	Quênia	0,1084

5 DISCUSSÃO

A escolha do gene *gapdh* como controle endógeno nas reações de PCR foi fundamental para a verificação da eficiência do processo de extração do material genético, bem como para a validação da qualidade e integridade das amostras analisadas. Tal abordagem, também adotada por Birkenheuer *et al.* (2003), reforça a confiabilidade dos dados obtidos neste estudo.

O gene *CatL*, que codifica a enzima catepsina L, é amplamente utilizado como marcador molecular para a detecção de *T. vivax*, devido à sua alta especificidade e sensibilidade em diferentes contextos geográficos (Cortez *et al.*, 2009). Contudo, é importante destacar que, apesar de sua eficiência, a amplificação de fragmentos do gene *CatL* pode ocorrer também em outras espécies do gênero *Trypanosoma*, exigindo cautela na interpretação dos resultados apenas com base na PCR convencional (Cortez *et al.*, 2009).

No presente estudo, não foi utilizado o primer específico para *T. vivax*, que amplifica um fragmento de aproximadamente 177 pares de base (pb) do gene *CatL* (Cortez *et al.*, 2009). Em vez disso, optou-se por um primer que amplifica um fragmento mais longo, de aproximadamente 500 pb, comumente utilizado para triagem ampla, permitindo a detecção de diferentes espécies do gênero *Trypanosoma* (Chávez-Larrea *et al.*, 2023). Por essa razão, foi realizado o sequenciamento das amostras positivas, a fim de confirmar a identidade das espécies detectadas. A adoção dessa abordagem é essencial, uma vez que somente a análise de sequência permite a diferenciação precisa entre espécies, especialmente diante da possibilidade de amplificação cruzada. O sequenciamento de todas as amostras positivas é, portanto, necessário para avaliar se há, além de *T. vivax*, a presença de outras espécies no conjunto analisado.

Adicionalmente, o gene *CatL* apresenta polimorfismo genético, o que possibilita a análise da diversidade genética nas amostras estudadas (Cortez *et al.*, 2009). No presente estudo, as amostras sequenciadas apresentaram elevada similaridade, agrupando-se no mesmo clado, com cepas de *Trypanosoma vivax* já detectadas anteriormente no estado do Rio de Janeiro, em estudo realizado entre 2016 e 2018 por Abreu *et al.* (2024), demonstrando que a cepa em questão continua circulando pelo estado.

A propriedade onde foi detectada a presença de DNA de *Trypanosoma* possui um rebanho total de 270 animais. Embora a alta prevalência observada nesta amostragem sugira a ocorrência de um foco ativo ou possível surto, é importante ressaltar que a testagem de todo o rebanho seria necessária para se obter uma estimativa mais precisa da taxa de infecção na propriedade. Durante contato com os responsáveis, foi relatada a ocorrência de sinais clínicos sugestivos de tripanossomose, incluindo abortos, o que corrobora os achados laboratoriais e fortalece a hipótese de infecção ativa. Nos últimos anos, diversos surtos de tripanossomose bovina causada por *T. vivax* têm sido registrados em diferentes estados brasileiros, frequentemente associados a altas taxas de morbidade, mortalidade e prejuízos econômicos expressivos. Esses impactos incluem redução no ganho de peso, abortos, distúrbios reprodutivos, queda na produção de leite e carne, além do aumento dos custos com manejo sanitário e tratamentos medicamentosos, comprometendo a sustentabilidade da atividade pecuária no país.

Apesar da ausência de confirmação do vetor biológico clássico (*Glossina* spp.) no Brasil, a alta taxa de infecção observada na propriedade levanta a possibilidade de transmissão mecânica, especialmente por vetores hematófagos como *Tabanus* spp., *Stomoxys calcitrans* ou *Haematobia irritans* (Cadioli *et al.*, 2012), que podem facilitar a disseminação do parasito entre os animais do rebanho. Além disso, práticas iatrogênicas, como a reutilização de agulhas e seringas contaminadas (Bastos *et al.*, 2017), luvas de palpação retal (Leal *et al.*, 2025), ou ainda a administração de ocitocina com instrumentos compartilhados, também representam potenciais vias de disseminação da infecção, especialmente em rebanhos leiteiros (Bastos *et al.*, 2017).

A análise filogenética das sequências de *Trypanosoma vivax* revelou agrupamentos geográficos distintos, refletindo padrões de dispersão e possivelmente modos de transmissão diferenciados. Em regiões da América do Sul, como Brasil e Venezuela, onde não ocorre a presença da mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.), a transmissão de *T. vivax* ocorre exclusivamente de forma mecânica, o que parece favorecer a expansão clonal de cepas com baixa variabilidade genética (Cortez et al., 2006; Garcia et al., 2024). Em contrapartida, nas regiões africanas onde há prevalência do vetor biológico (tsé-tsé), especialmente na África Oriental, a manutenção do ciclo de vida completo do parasito dentro do vetor pode proporcionar oportunidades de recombinação genética, refletidas na maior diversidade dos isolados africanos (Autheman et al., 2021; Rodrigues et al., 2008). Além disso, evidências de deleções e degradação de genes mitocondriais em cepas sul-americanas, como *ND7* e *COIII*, sugerem uma adaptação ao modo de transmissão mecânico e à perda funcional de etapas do ciclo vetorial dependente da *Glossina* (Garcia et al., 2024). Esses achados reforçam a hipótese de que o modo de transmissão influencia diretamente a diversidade genética do parasito, sendo a transmissão mecânica um fator limitante da variabilidade evolutiva de *T. vivax*.

Estudos anteriores descreveram a presença de *T. vivax* em diversas regiões do Brasil, incluindo áreas com características ambientais semelhantes às observadas nos municípios aqui investigados (Bastos et al., 2017; Caramori et al., 2022). A infecção por *Trypanosoma* spp. em bovinos no Brasil, especialmente nas regiões Sudeste e no estado do Rio de Janeiro, tem sido objeto de diversos estudos recentes. Um levantamento soropidemiológico realizado entre 2020 e 2021, com amostras de 14 estados brasileiros, incluindo o Rio de Janeiro, revelou uma taxa de soroprevalência de 56,5% para *T. vivax* em bovinos, indicando ampla disseminação da doença no país (Donadon, 2023). No estado do Rio de Janeiro, entre 2016 e 2018, foram diagnosticados, 12 focos/surtos de infecção por *T. vivax* em 11 municípios, com sinais clínico-patológicos como anemia, emagrecimento progressivo e diminuição na produção de leite, além de alterações reprodutivas e neurológicas em alguns casos (Costa et al., 2020). Em estudo realizado em 15 propriedades leiteiras do Estado, a detecção molecular revelou 12,8% de positividade para *T. vivax* e 3,6% para *T. theileri*, com sequenciamento genético indicando baixa diversidade entre as sequências de *T. vivax*, sugerindo possível segregação por hospedeiro (Abreu et al., 2024). Esses dados ressaltam a importância de estratégias de controle e monitoramento da tripanossomose bovina, considerando a prevalência e os impactos econômicos associados à doença.

Outros estados do Sudeste, como o estado de Minas Gerais, a tripanossomose bovina, causada por *T. vivax*, apresenta variabilidade na prevalência, conforme evidenciado por estudos moleculares. Uma pesquisa realizada entre 2015 e 2017 em diferentes mesorregiões de Minas Gerais identificou a presença de *T. vivax* em 11 rebanhos, com diagnóstico confirmado por PCR e sequenciamento das amostras (Reis, 2017). Estudos sorológicos demonstraram soroprevalência variável de *T. vivax* em bovinos, com índices que podem ultrapassar 80% em rebanhos afetados, enquanto exames parasitológicos diretos, como o esfregaço sanguíneo, confirmaram a presença do parasito em surtos clínicos, evidenciando a circulação ativa do agente em diferentes regiões do estado (Reis, 2017; Cuglovici et al., 2010). Vale ressaltar, que muitas propriedades realizam a compra de animais de leilões de gado leiteiro nos estados de Minas Gerais ou São Paulo. A movimentação de animais infectados representa um importante fator de risco para a introdução e disseminação de *Trypanosoma vivax* em áreas livres da enfermidade, contribuindo significativamente para a expansão geográfica do parasito, especialmente quando associada à transmissão mecânica por insetos hematófagos (Silva et al., 2003).

A confirmação molecular da presença de *T. vivax* em propriedades rurais do estado do Rio de Janeiro, especialmente naquelas onde foram relatados sinais clínicos compatíveis com a

infecção, evidencia a relevância epidemiológica desse agente no rebanho fluminense. Esses achados reforçam a necessidade de considerar a tripanossomíase bovina no diagnóstico diferencial de doenças infecciosas de apresentação clínica inespecífica, frequentemente confundidas com outras enfermidades endêmicas (Pandolfi *et al.*, 2024; Bonilla *et al.*, 2021).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a presença de parasitos do gênero *Trypanosoma* em rebanhos bovinos no município de Volta Redonda, onde, até o momento, não foram encontrados relatos anteriores de infecção por *T. vivax*. A detecção do parasito foi confirmada por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento direcionado ao gene *CatL*, evidenciando baixa variabilidade genética entre os isolados do estado do Rio de Janeiro. Os achados reforçam a necessidade de vigilância epidemiológica e de medidas de biossegurança rigorosas, especialmente no controle de práticas iatrogênicas como o uso compartilhado de seringas e agulhas, a fim de prevenir a disseminação da infecção nos rebanhos bovinos do estado do Rio de Janeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRÃO, DIANA CUGLOVICI; DE CARVALHO, A. Ú., FACURY FILHO, E. J; *et al.* Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no estado de Minas Gerais. **Ciência Animal Brasileira/Brazilian Animal Science**, p. 672-676, 2009.
- ABREU, A. P. M.; SANTOS, H. A.; PAULINO, P. G. *et al.* Unveiling *Trypanosoma* spp. diversity in cattle from the state of Rio de Janeiro: A genetic perspective. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 44, p. 1–8, 2024.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 133–139, 2017.
- AUTHEMAN, D., CROSNIER, C., CLARE, S. *et al.* An invariant *Trypanosoma vivax* vaccine antigen induces protective immunity. **Nature**, 595, p. 96–100, 2021.
- BASTOS, T. S. A. *et al.* First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Carlos, v. 26, n. 3, p. 366–371, 2017.
- 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**, Amsterdam, v. 143, p. 174–181, 2007.
- BERBIGIER, A. P. Diversidade de tripanosomatídeos em pequenos mamíferos provenientes da Estação Biológica FIOCRUZ da Mata Atlântica, Rio de Janeiro. **Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)** – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.
- BEZERRA, F. S. B. *et al.* *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 28, p. 575–582, 2008.
- BEZERRA, N. M. *et al.* Experimental infection by *Trypanosoma vivax* in goats in the Brazilian semiarid: detection of *T. vivax* DNA in colostrum and assessment of lactogenic transmission. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 43, e07119, 2023.
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172–4177, 2003.
- BONILLA, J. L. *et al.* First report of *Trypanosoma vivax* infection in sheep from Nicaragua. **Veterinary parasitology, regional studies and reports**, v. 25, p. 100602, 2021.
- BÖSE, R. *et al.* Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. **Parasitol Res.**, v. 73, p. 421-424, 1987.
- BÖSE, R.; HEISTER, N. C. Development of *Trypanosoma* (M.) *theileri* in Tabanids. **J Euk Microbiol.**, v. 40, n. 6, p. 788-792, 1993.

BRANDÃO, L. P. *et al.* Natural infection by *Trypanosoma evansi* in dog – Case report. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 36, p. 23–26, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Sanidade dos Herbívoros**. MAPA, 2022. Disponível em:

BRAUN, U. *et al.* *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of heifer with suppurative meningoencephalitis. **Vet Rec.**, v. 150, n. 1, p. 18-19, 2002.

BROTÁNKOVÁ, Anna *et al.* Trypanosomes of the *Trypanosoma theileri* group: Phylogeny and new potential vectors. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 294, 2022.

BUNGENSTAB, D. J. *et al.* (Org.). ILPF: inovação com integração de lavoura, pecuária e floresta. Brasília, DF: **Embrapa**, 2019. 200 p.

BURGDORFER, W.; SCHMIDT, M. L.; HOOGSTRAAL, H. Detection of *Trypanosoma theileri* in Ethiopian cattle ticks. **Acta Tropica**, v. 30, p. 340-346, 1973.

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.

CARAMORI, Cássio Henrique. *et al.* Tripanossomíase no rebanho bovino brasileiro—uma breve revisão da literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 29, p. 001-009, 2022.

CASTILLO-CASTAÑEDA, A. C. *et al.* An overview of the trypanosomatid (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) parasites infecting several mammal species in Colombia. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, 16 dez. 2022.

CAVALCANTI, F. B. P.; SILVA, T. R.; CADIOLI, F. A. As consequências da dificuldade do diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em bovinos: revisão de literatura. **Ciência Animal e Veterinária: Inovações e Tendências**, [S.l.], v. 1, p. 48–60, 2021.

CEZAR, I. M. *et al.* Sistemas de produção de gado de corte no Brasil: uma descrição com ênfase no regime alimentar e no abate. Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**, 2005.

CHÁVEZ-LARREA, M. A *et al.* Molecular identification of *Trypanosoma theileri* (Laveran, 1902) in cattle from two slaughterhouses in Ecuador and its relation with other haemotropic agents. **Frontiers in veterinary science**, v. 10, p. 1153069, 2023.

CONNOR, R. J.; VAN DEN BOOSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. 2nd ed. South Africa: Oxford University Press, 2004. v. 1, cap. 12, p. 251–296.

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, n. 1, p. 44–51, fev. 2009.

COSTA, R. V. C.; ABREU, A. P. M.; THOMÉ, S. M. G. *et al.* Parasitological and clinical-pathological findings in twelve outbreaks of acute trypanosomiasis in dairy cattle in Rio de

Janeiro state, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 22, p. 100466, 2020.

CUGLOVICI, D. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; REIS-CUNHA, J. L. *et al.* Epidemiological aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 320–326, 201

DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 199–212, 2000.

DE SOUZA, M. E. *et al.* *Trypanosoma vivax* na reprodução bovina. **Revista Científica do UBM**, Barra Mansa, p. 18–29, 2024.

DESQUESNES, M. *et al.* *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **BioMed Research International**, [S.l.], v. 2013, p. 1–22, 2013.

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. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 610–614, 2001.

DONADON, A. E. S. Levantamento soroepidemiológico de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Brasil. 2023. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2023.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. A terceira onda da pecuária de corte no Brasil. Brasília, 2022.

EMBRAPA. Pecuária de leite no Brasil: evolução e desafios dos sistemas de produção. Brasília, DF: **Embrapa**, 2017.

FIORIN, F. E. *et al.* Prevalence of natural infection by *Trypanosoma evansi* in Crioula Lageana cattle. **Microbial Pathogenesis**, [S.l.], v. 180, p. 1–6, 2023.

FISHER, A. C.; SCHUSTER, G.; COBB, W. J.; *et al.* Molecular characterization of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) spp. infecting cattle (*Bos taurus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and elk (*Cervus elaphus canadensis*) in the United States. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1–2, p. 29–42, 2013.

FLORES, E. J. C. Identificación molecular de *Trypanosoma theileri* en bovinos de la parroquia de Limoncocha, Ecuador, 2021.

GARCIA, H.A.; RODRIGUES, A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FLORENTIN, A.S.; BETHENCOURT, A.M.; REYNA-BELLO, A.; CHÁVEZ-LARREA, M.A.; PEREIRA, C.L.; BENGALY, Z.; SHEFERAW, D.; *et al.* From Intact to Highly Degraded Mitochondrial Genes in *Trypanosoma vivax*: New Insights into Introduction from Africa and Adaptation to Exclusive Mechanical Transmission in South America. **Parasitologia**, v.4, p. 390-404, 2024.

- GERMANO, P. H. V. *et al.* Tripanossomose bovina: revisão. **Pubvet**, v. 12, p. 133, 2018.
- GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma species* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 110, p. 171–180, 2003.
- GIORDANI, F. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology**, v. 143, n. 14, p. 1862–1869, 2016.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. **Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2006. 198 p.
- GUERRA, N. R. *et al.* Detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de Imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 12, p. 1423-1426, 2013.
- HERRERA, H. M. *et al.* Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 263–275, 2004.
- HOARE, C. A. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. **Journal of Protozoology**, [S.l.], v. 11, n. 2, p. 200–207, 1964.
- HOARE, C. A. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. **Nature**, [S.l.], v. 238, 1972.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal 2023. Rio de Janeiro: **IBGE**, 2023.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Cidades@. Rio de Janeiro: **IBGE**, [s.d.].
- IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Capítulo 27 – Evolução da pecuária no Brasil. In: **Uma jornada pelos contrastes do Brasil: cem anos do Censo Agropecuário**. Brasília: IPEA, 2020.
- JONES, T. W.; DÁVILA, A. M. *Trypanosoma vivax*--out of Africa. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 99–101, 2001.
- KALINER, G. Extravascular occurrence of *T. theileri* in the cerebellum of a zebu cow associated with meningoencephalomyelitis. **Berl Muench Tieraerztl Wochenschr**, v. 85, p. 251-252, 1972.
- KOSTYGOV, A. Y.; YURCHENKO, V. Revised classification of the subfamily Leishmaniinae (Trypanosomatidae). **Folia Parasitologica**, v. 64, 10 jul. 2017.
- LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Urará eastern Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 774–776, 2000.

LALMANACH, G.; BOULANGÉ, A.; SERVEAU, C.; LECAILLE, F.; SCHARFSTEIN, J.; GAUTHIER, F.; *et al.* Congopain from *Trypanosoma congolense*: drug target and vaccine candidate. **Biological Chemistry**, v. 383, p. 739–749, 2002.

LATIF, A. A.; BAKHEIT, M. A.; MOHAMED, A. E.; ZWEYGARTH, E. High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 251–256, 2004.

LEAL, L. L. L. *et al.* First study confirming the transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle through rectal palpation: how many animals can be infected by reusing the same procedure glove, and what role does iodine play as a disinfectant? **Veterinary Research Communications**, v. 49, n. 2, p. 93, 2025.

LEE, Y. F.; CHENG, C. C.; LIN, N. N.; LIU, S. A.; TUNG, K. C.; CHIU, Y. T. Isolation of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri* from dairy cattle in Taiwan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 4, p. 417–424, Apr. 2010.

LOPES, S. T. P. *et al.* *Trypanosoma vivax* em bovino leiteiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 46, p. 1–5, 30 abr. 2018.

MADRID, D. M. C. Avaliação da ultraestrutura e ação de desinfetantes em *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905). 2017. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; LIMA JUNIOR, M. S. C.; MELO, E. S. P. Comparação de métodos de extração do DNA e avaliação de reações da polimerase em cadeia (PCR) para o diagnóstico de *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*. Circular técnica 34. Embrapa. Campo Grande, MS, 2006.

MALELE, C. II L.; KNIGHT, C.; FERRIS, V.; NJIRU, Z.; HAMILTON, P.; *et al.* The use of specific and generic primers to identify trypanosome infections of wild tsetse flies in Tanzania by PCR. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, p. 271–279, 2003.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Painel da Pecuária Brasileira. Brasília: MAPA, 2023.

MARTINS, J. R.; LEITE, R. C.; DOYLE, R. L. *Tripanosomatides* like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 113–114, 2008.

MARTINS, João Ricardo; LEITE, Romário C.; DOYLE, Rovaina L. Tripanosomatídeos similares a *Trypanosoma theileri* no carrapato dos bovinos *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 113–114, 2008. **Medicine**, v. 2, n. 1–4, mar. 1984.

MARTINS, Vitor Rademaker. O papel dos pequenos roedores e marsupiais no ciclo de transmissão de *Trypanosoma cruzi* e *T. evansi* em áreas com diferentes características ambientais no Pantanal Sul-Matogrossense. 2010. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/8635>. Acesso em: 13 abr. 2025.

- MASAKE, R. A.; MAJIWA, P. A.; MOLOO, S. K.; *et al.* Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, New York, v. 85, p. 193–205, 1997.
- MATTHEWS, K. R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 283–290, 2005.
- MERZLYAK, E. *et al.* Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, p. 161–169, 2001.
- MITCHELL, F. E.; LONG, I. R. Bovine foetal death due to *Trypanosma theileri* infection. **Proceedings of 3rd Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, v. 23, p. 67–72, 1980.
- MORAIS, Rayana Carla Silva de. Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania*. 2015. 62 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.
- MORZARIA, S. P.; LATIF, A. A.; JONGEJAN, F.; WALKER, A. R. Transmission of a *Trypanosoma* sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Veterinary Parasitology**, v. 19, p. 13–21, 1986.
- NEHRING, R. Farming Cattle in the tropics: Transnational Science and Industrializing Pastures in Brazil. **Plants, people, planet**, v. 6, n. 5, 17 set. 2023.
- NETO, R. T.; ORLANDINI, I. Redução de impactos ambientais gerados pela bovinocultura de leite: revisão bibliográfica. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 3, n. 1, 2020.
- NEVES, M. F. *et al.* Doença de Chagas em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, p. 11–15, 2011.
- OLIVEIRA, W. J.; BARBOSA, F. C.; MORAES, F. R. Tripanossomose bovina no Brasil. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 17, p. 1–11, 2019.
- OSÓRIO, A. L. *et al.* *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 1, p. 1–13, 2008.
- PACHECO, T. A.; MARCILI, A.; DA COSTA, A. P.; *et al.* Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri* in cattle in Brazil's western Amazon region. **Braz J Vet Parasitol**, v. 27, n. 4, p. 579–583, 2018.
- PANDOLFI, Izabela Andrade. *et al.* The seasonality as a relevant aspect to be considered for differential diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection and co-infections in female cattle. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 109, p. 102180, jun. 2024.

PEÑA-CALLEJAS, G. *et al.* Enfermedad de Chagas: biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. **TIP: Revista especializada en ciencias químico-biológicas**, [S.l.], v. 25, 2022.

PEREIRA, L. M. *et al.* Ocorrência de animais soropositivos para *Trypanosoma vivax* no Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 27, n. 1, p. 45–50, 2020.

PEREIRA, S. S. *et al.* Variant antigen diversity in *Trypanosoma vivax* is not driven by recombination. **Nature Communications**, [S.l.], v. 11, n. 1, 2020.

RADOSTITS, O. M. *et al.* Tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

REIS, M. de O. *Trypanosoma vivax* em bovinos de Minas Gerais: achados epidemiológicos, morfológicos e moleculares. 2017. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, 2017.

RIANA, E. *et al.* Molecular detection of *Trypanosoma* (Trypanosomatidae) in bats from Thailand, with their phylogenetic relationships. **Parasitology**, Cambridge, v. 149, n. 5, p. 654–666, 2022.

RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J. R.; *et al.*, Phylogeny of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 3, p. 1–10, 2006.

RODRIGUES, A. *et al.* Outbreaks of trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 239–249, 2005.

RODRIGUES, A.; *et al.* Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 239–249, 2005.

RODRIGUES, A. C., NEVES, L., GARCIA, H. A., VIOLA, L. B., MARCILI, A., DA SILVA, F. M., SIGAUQUE, I., BATISTA, J. S., PAIVA, F., & TEIXEIRA, M. M. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. **Parasitology**, v.135, n. 11, p. 1317–1328, 2008.

RODRIGUES, R. P. D. S. *et al.* Epidemiological, clinical and pathological analysis of trypanosomiasis “Mal das Cadeiras”. **Pubvet**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 118–124, 2016.

ROQUE, A. L. R.; JASEN, A. M. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: GALVÃO, C. (Org.). **Vetores da Doença de Chagas no Brasil**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. p. 75–87.

SAJID, M.; McKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1–21, 2002.

SALAS, R. Z. *et al.* Tripanosomiasis bovina en ganadería lechera de trópico alto: primer informe de *Haematobia irritans* como principal vector de *T. vivax* y *T. evansi* en Colombia. **Revista Medicina Veterinaria**, [S.l.], v. 33, p. 21–34, 2017.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed. v. 1. **Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SAMPAIO, P. H. Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados pelo *Trypanosoma vivax*. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

SANCHES, M. P. *et al.* Epidemiological, clinical and pathological analysis of trypanosomiasis “Mal das Cadeiras”. **Pubvet**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 118–124, 2016.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brasil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 66, p. 25–32, 1971.

SHORBA, M. *et al.* Seroprevalence and associated risk factors for *Trypanosoma evansi* infection in equine in North of Egypt. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, [S.l.], v. 75, n. 3, p. 8065–8072, 2024.

SILVA, A. S. D. *et al.* Suscetibilidade de *Trypanosoma evansi* à anfotericina B. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2550–2555, 2009.

SILVA, A. S. D. *et al.* Suscetibilidade de *Trypanosoma evansi* à anfotericina B. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2550–2555, 2009.

SILVA, A. S. *et al.* Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira-SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 373–376, 2007.

SILVA, D. Atividade in vitro de óleos essenciais sobre *Trypanosoma evansi*. 2017. 91 f. **Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal) – Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, 2017.

SILVA, F. M. *et al.* Serological and molecular diagnosis of *Trypanosoma vivax* on buffalos (*Bubalus bubalis*) and their ectoparasites in the lowlands of Maranhão, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2023.

SILVA, R. A. M. S. *et al.* *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, 2003.

SILVA, R. A. M. S.; SANCHEZ, V.; DÁVILA, A. M. R. Métodos de diagnósticos parasitológicos das tripanossomoses bovinas e equinas. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 3 p. (Circular Técnica, 41).

SILVA, R. L. P. *et al.* Análise dos fatores que causam impacto ambiental na produção de bovinocultura de corte. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 85571–85580, 2020.

SILVA, R.A.M.S. Tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax* no Brasil e Bolívia: Sintomas clínicos, diagnósticos e dados epizootiológicos. Corumbá, MS: **EMBRAPA-CPAP**, 1997.

SILVA, T. M. F. *et al.* Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. **Veterinary Research**, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 1, 2013.

SOUZA, W.; VIDAL, J. Taxonomia morfológica. **Portal da Doenças de Chagas**, 2017. Disponível em: <https://chagas.fiocruz.br/taxonomia-morfologica/>. Acesso em: 11 abr. 2025.

SVOBODOVÁ, M. *et al.* *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 423–432, 2007.

VENTURA, R. M.; *et al.* *Trypanosoma vivax*: Characterization of the Spliced-Leader Gene of a Brazilian Stock and Species-Specific Detection by PCR Amplification of an Intergenic Spacer Sequence. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 99, n. 1, p. 37–48, 2001.

VICKERMAN, K. P. The diversity of the Kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. **Biology of the Kinetoplastida**. New York: Academic Press, p. 1–34, 1976.

VILLA, A. *et al.* Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 352–354, 2008.

VOTÝPKA, J. *et al.* A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*. **International Journal of Parasitology**, v. 45, p. 741–748, 2015.

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, v. 18, p. 124–193, 1966.

WALLACE, F. G.; CAMARGO, E. P.; MCGHEE, R. B.; *et al.*, Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. **Journal of Protozoology**, v. 30, p. 308–313, 1983.

WELLS, E. A. Animal trypanosomiasis in South America. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, n. 1–4, mar. 1984.

YOKOYAMA, N.; SIVAKUMAR, T.; FUKUSHI, S.; *et al.* Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3–4, p. 335–341, 2015.

ANEXO I



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da diversidade genética de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* das diferentes regiões do Brasil", protocolada sob o CEUA nº 1051220524 (ID 002821), sob a responsabilidade de **Bruna de Azevedo Baêta** e equipe; *Maiara Vasconcelos Monteiro; Matheus Dias Cordeiro; Juliano Martins Santiago; Claudia Bezerra da Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 15/07/2024.

We certify that the proposal "Study of the genetic diversity of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* f.r.o.m different regions of Brazil", utilizing 1920 Bovines (males or females), protocol number CEUA 1051220524 (ID 002821), under the responsibility of **Bruna de Azevedo Baêta** and team; *Maiara Vasconcelos Monteiro; Matheus Dias Cordeiro; Juliano Martins Santiago; Claudia Bezerra da Silva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 07/15/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 07/2024 a 06/2028 Área: Parasitologia Animal

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Bovinos

Linhagem: todas as raças

sexo: Machos ou Fêmeas

idade: 4 a 240 meses

Quantidade: 1920

Peso: 100 a 600 kg

Seropédica, 30 de junho de 2025

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro

Prof. Dr. Daniel de Almeida Balthazar
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro

