

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

TESE

***Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Rio de Janeiro**

Renata Vitória Campos Costa

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

***Trypanosoma vivax* EM BOVINOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

RENATA VITÓRIA CAMPOS COSTA

Sob a orientação da Professora

Marilene de Farias Brito Queiroz

e Co-orientação dos Professores

Sandra Maria Gomes Thomé e Carlos Luiz Massard

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau em **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de concentração Patologia Animal.

Seropédica, RJ

Dezembro de 2018

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

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

C837t Costa, Renata Vitória Campos , 1972-
Trypanosoma vivax em bovinos no estado do Rio de
Janeiro / Renata Vitória Campos Costa. - 2018.
68 f.: il.

Orientadora: Marilene de Farias Brito Queiroz.
Coorientadora: Sandra Maria Gomes Thomé .
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Medicina Veterinária, 2018.

1. Tripanossomíase. 2. Epidemiologia. 3.
Diagnóstico. 4. Patologia veterinária. 5. Bovino. I.
Queiroz, Marilene de Farias Brito , 1960-, orient.
II. Thomé , Sandra Maria Gomes, 1955-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Medicina Veterinária. IV. Título.

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

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

RENATA VITÓRIA CAMPOS COSTA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

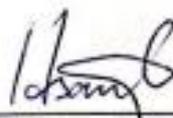
TESE APROVADA EM 06/12/2018



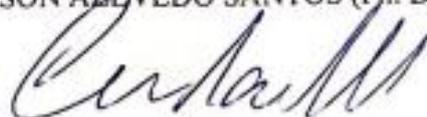
MARILENE DE FARIAS BRITO QUEIROZ (Ph D) UFRRJ - ORIENTADOR



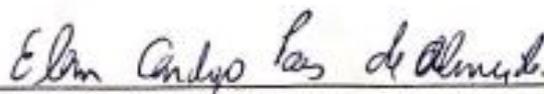
LUCIANO DA SILVA ALONSO ((Ph. D) UFRRJ



HUARRISSON AZEVEDO SANTOS (Ph. D) UFRRJ



CICERO ARAUJO PITOMBO (Ph. D) UFF



ELAN CARDOZO PAES DE ALMEIDA (Ph. D) UFF

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Umberto Vitório da Costa, pela dedicação e carinho incondicionais, pelo incentivo e oportunidade para que eu conseguisse concluir este trabalho. À minha mãe, Heloísa Campos Costa pelo eterno carinho e compreensão. À minhas filhas, Vitória Costa Villela e Joana Costa Villela, por terem entendido minha ausência e por darem sentido à minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Professora e orientadora Marilene de Farias Brito, pela dedicação, pelo carinho e paciência; pelos ensinamentos e conselhos; pelo exemplo de força e por ter confiado em mim.

À Professora e co-orientadora Sandra Maria G. Thomé, pelo carinho, paciência, por facilitar minha visão e entendimento em Epidemiologia e por toda ajuda.

Ao Professor e co-orientador Carlos Luiz Massard, pela orientação, oportunidade e disponibilidade, especialmente possibilitando parte dos exames laboratoriais.

À Ana Paula Abreu, pela imensa ajuda, paciência, disponibilidade, competência, profissionalismo, e pela preciosa ajuda na realização dos exames complementares.

Ao Professor Daniel Guimarães Ubiali, pelo aprendizado, confiança e ajuda.

Ao Professor Luciano Alonso, pela ajuda e conhecimento conferidos, fundamental no que se refere ao estudo anatômico do sistema nervoso.

Ao Professor Huarrison, pela disponibilidade e ajuda na parte da PCR, e a todos os residentes e discentes do Laboratório de Sanidade Avícola - LASAVE.

Aos funcionários, residentes, estagiários e bolsistas do Setor de Anatomia Patológica, pelo profissionalismo e ajuda, em especial à Ana Paula de Castro Pires, pela ajuda fundamental.

Ao Professor Aivaldo Henrique da Fonseca e ao técnico Matheus Dias Cordeiro, pela ajuda e apoio técnico na disponibilização do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ pela colaboração na realização da PCR para diagnóstico diferencial de infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5.

À todos os funcionários e colegas do Núcleo de Defesa Agropecuária de Valença, pela facilitação e compreensão.

Ao Coordenador de Defesa Sanitária Animal, Virgínio da Silva Junior, e ao Superintendente de Defesa Agropecuária, Paulo Henrique de Moraes, por terem apoiado e facilitado este estudo.

A todos os Médicos Veterinários de campo que colaboraram e possibilitaram a realização deste trabalho, em especial aos colegas José Cardoso Macedo Filho e Vinícius Rodrigues Garcia Teixeira, pela imensa contribuição e amizade.

Às amigas Samara Lopes e Yasmin Daoualibi, por todo suporte, carinho e amizade.

À amiga Glenda de Oliveira, por ter me incentivado a iniciar esta trajetória.

À todos os meus familiares, que foram pacientes e compreensíveis, e que sempre torceram por mim. Ao meu companheiro, Sergio Olaya, pelos cuidados, paciência e incentivo.

À todas as pessoas que me ajudaram, torceram e contribuíram direta ou indiretamente, sou muito grata.

RESUMO

COSTA, Renata Vitória Campos. *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Rio de Janeiro 2018. 67 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2018.

As tripanossomíases são enfermidades causadas por espécies do gênero *Trypanosoma*. Em bovinos a tripanossomíase é causada pelo *Trypanosoma vivax* que tem origem na África tropical, onde a enfermidade representa um obstáculo para o desenvolvimento da pecuária. A expansão da enfermidade para as Américas ocorreu durante a colonização europeia, na década de 1830, e o deslocamento dos rebanhos e a adaptação do parasito à transmissão mecânica por moscas hematófagas possibilitou a disseminação dessa parasitose. No Brasil a infecção por *T. vivax* em bovinos foi relatada pela primeira vez no estado do Pará, em 1944, e atualmente a presença do parasito já foi registrada em diversos estados. Este estudo teve como objetivo relatar os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos da infecção natural por *T. vivax* em bovinos no estado do Rio de Janeiro. Foram diagnosticados 16 focos de infecção *Trypanosoma vivax* em bovinos, em 13 municípios do estado do Rio de Janeiro, entre abril de 2016 a outubro de 2018. Destes, 12 focos foram estudados com base nos dados epidemiológicos, sinais clínico-patológicos e exames laboratoriais. Os animais clinicamente afetados apresentaram anemia, diminuição do apetite, diminuição significativa na produção de leite, emagrecimento progressivo, fraqueza, alterações reprodutivas, diarreia e sinais neurológicos. Em alguns animais o quadro evoluiu para a morte. O diagnóstico laboratorial (exames parasitológico, molecular, necropsia e histopatológico) foi realizado em 284 amostras de sangue total e tecidos coletados de 280 bovinos. Os exames parasitológicos realizados em esfregaços de capa leucocitária resultaram positivos em 25 amostras provenientes de seis dos 12 focos estudados. O diagnóstico molecular através da reação em cadeia de polimerase convencional (cPCR), realizado em amostras de sangue total, detectou 46 amostras positivas em cinco dos 12 focos e em mais sete amostras positivas em fragmentos de tecidos coletados. A cPCR apresentou elevada sensibilidade diagnóstica quando comparada aos métodos parasitológicos. Das 12 vacas que morreram, nove apresentaram sinais neurológicos e, ao exame histológico, foram encontradas alterações inflamatórias principalmente no sistema nervoso central e coração, caracterizadas por meningoencefalite e miocardite linfocitária multifocal; no sistema nervoso central dos animais estas lesões ocorreram com maior intensidade no cérebro em relação à medula. A tripanossomíase em rebanhos bovinos no estado do Rio de Janeiro traz preocupação devido ao seu potencial em causar prejuízos econômicos e, em face da inespecificidade dos sinais clínicos, os exames laboratoriais são fundamentais para elucidar o diagnóstico.

Palavras chave: *Trypanosoma vivax*, bovino, tripanossomíases.

ABSTRACT

COSTA, Renata Vitória Campos. *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Rio de Janeiro 2018. 67 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2018.

Trypanosomiasis is a disease caused by species of the genus *Trypanosoma*. In cattle trypanosomiasis is caused by *Trypanosoma vivax* that originates in tropical Africa, where the disease represents an obstacle to the development of livestock. The spread of disease to the Americas occurred during European colonization in the 1830s, and the displacement of the herds and the adaptation of the parasite to mechanical transmission by hematophagous flies allowed the spread of this parasite. In Brazil, *T. vivax* infection in cattle was reported for the first time in the State of Pará, in 1944, and the presence of the parasite has been reported in several states. This study aimed to report the epidemiological and clinical-pathological aspects of *T. vivax* natural infection in cattle in the state of Rio de Janeiro. Sixteen foci of *Trypanosoma vivax* infection were diagnosed in cattle in 13 municipalities in the state of Rio de Janeiro between April 2016 and October 2018. Of these, 12 outbreaks were studied based on epidemiological data, clinical-pathological signs and laboratory tests. Clinically affected animals presented anemia, decreased appetite, significant decrease in milk production, progressive weight loss, weakness, reproductive abnormalities, diarrhea and neurological signs. In some animals the picture evolved to death. The laboratory diagnosis (parasitological, molecular, necropsy and histopathological examinations) was performed on 284 whole blood samples and tissues collected from 280 cattle. Parasitological exams performed on leukocyte - layer smears were positive in 25 samples from six of the 12 foci studied. Molecular diagnosis using conventional polymerase chain reaction (cPCR), carried out on whole blood samples, detected 46 positive samples in five of the 12 foci and in seven other positive samples in tissue fragments collected. The cPCR presented high diagnostic sensitivity when compared to parasitological methods. Of the 12 cows that died, nine presented neurological signs and, on histological examination, inflammatory alterations were found mainly in the central nervous system and heart, characterized by meningoencephalitis and multifocal myocarditis; in the central nervous system of the animals these lesions occurred with greater intensity in the brain in relation to the marrow. Trypanosomiasis in bovine herds in the state of Rio de Janeiro is of concern because of its potential to cause economic losses and, due to the lack of specificity of clinical signs, laboratory tests are fundamental to elucidate the diagnosis.

Key words: *Trypanosoma vivax*, bovine, trypanosomiasis.

LISTA DE QUADROS

		Página
Quadro 1	Tripanossomíases dos animais domésticos e do homem.	8
Quadro 2	Achados macroscópicos em bovinos infectados por <i>Trypanosoma vivax</i> , oriundos de focos do estado do Rio de Janeiro.	39
Quadro 3	Intensidade da perivasculite linfocitória em diferentes áreas do sistema nervoso central de bovinos infectados por <i>Trypanosoma vivax</i> , no estado do Rio de Janeiro.	49
Quadro 4	Intensidade da perivasculite linfocitória e infiltração histiocitária em diferentes órgãos de bovinos infectados por <i>Trypanosoma vivax</i> , no estado do Rio de Janeiro.	50
Quadro 5	Exames laboratoriais dos bovinos necropsiados oriundos de propriedades-foco, confirmadas para infecção por <i>Trypanosoma vivax</i> , no estado do Rio de Janeiro.	51
Quadro 6	Co-morbididades detectadas em bovinos necropsiados, oriundos de propriedades-foco de infecção por <i>Trypanosoma vivax</i> no estado do Rio de Janeiro.	53

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Identificação dos focos e número de animais estudados.	22
Tabela 2	Número total de amostras coletadas para diagnóstico laboratorial.	23
Tabela 3	Identificação dos focos adicionais e número de amostras enviadas.	26
Tabela 4.	Número de animais clinicamente afetados e taxa de mortalidade, associados à infecção por <i>Trypanosoma vivax</i> em 10 dos 12 focos estudados.	29
Tabela 5	Sinais clínicos observados e relatados nos 12 focos de tripanossomíase estudados em 11 municípios do estado do Rio de Janeiro.	30
Tabela 6	Médias e desvio padrão de parâmetros morfométricos de <i>Trypanosoma vivax</i> presentes em lâminas de esfregaço sanguíneo de bovinos oriundos de três focos de tripanosomíase do estado do Rio de Janeiro.	35
Tabela 7	Amostras de sangue para diagnóstico parasitológico e molecular, por foco de tripanosomíase do estado do Rio de Janeiro.	36
Tabela 8	Análise da discordância entre a pesquisa de <i>Trypanosoma vivax</i> em esfregaço sanguíneo e PCR de bovinos oriundos de focos de tripanosomíase do estado do Rio de Janeiro.	36

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Classificação dos principais tripanosomos de mamíferos.	3
Figura 2	<i>Trypanosoma vivax</i> : formas tripomastigotas encontradas no sangue de bovinos naturalmente infectados.	5
Figura 3	Índices biométricos dos tripanosomas.	6
Figura 4	Localização e cronologia de identificação dos 16 focos de infecção por <i>Trypanosoma vivax</i> em bovinos no estado do Rio de Janeiro.	27
Figura 5	Bovino de propriedade–foco de tripanossomíase com acentuado emagrecimento. Vassouras (E), RJ, 2016.	31
Figura 6	Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com prostração, acentuado emagrecimento e edema submandibular. Areal (B), RJ, 2016.	31
Figura 7	Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com apatia e acentuado emagrecimento. Rio Claro (G), RJ, 2016.	32
Figura 8	Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com apatia e acentuado emagrecimento. Rio Claro (G), RJ, 2016.	32
Figura 9	Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com mucosa conjuntival pálida e retração do globo ocular (desidratação). Areal (B), RJ, 2016.	33
Figura10	Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com mucosa vulvar pálida. Areal (B), RJ, 2016.	33
Figura 11	Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com mucosa oral pálida. Pirai (A), RJ, 2018.	34
Figura 12	Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com fezes com muco e sangue. Rio Claro (G), RJ, 2016.	34
Figura 13	Bezerro (n° registro 1/LHV) de propriedade-foco; formas tripomastigotas sanguíneas de <i>Trypanosoma vivax</i> . Giemsa, obj. 100. Pirai (A), RJ.	37
Figura 14	Bezerro (n° registro 1/LHV) de propriedade-foco; formas tripomastigotas sanguíneas de <i>Trypanosoma vivax</i> . Giemsa, obj. 100. Pirai (A), RJ.	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 15 Bovino (33424) de propriedade-foco de tripanossomíase. Linfonodo pré-escapular aumentado, úmido ao corte e com áreas esbranquiçadas. Rio Claro (G), RJ.	40
Figura 16 Bovino (33228) de propriedade-foco de tripanossomíase. Córtex telencefálico com áreas acastanhadas e hemorragias, desde a região frontal até a occipital. Areal (B), RJ.	40
Figura 17 Sistema Nervoso Central. Córtex cerebral: infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e histiocitário perivascular. HE, obj. 10. Bovino 33204 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B), RJ.	43
Figura 18 Figura 18. Sistema Nervoso Central. Núcleo lentiforme: infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e histiocitário perivascular. HE, obj. 40. Bovino 33204 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B), RJ.	43
Figura 19 Figura 19. Sistema Nervoso Central. Córtex temporal: infiltrado inflamatório linfocitário perivascular. HE, obj. 63. Bovino 33228 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B), RJ.	44
Figura 20 Sistema Nervoso Central. Gânglio trigeminal: infiltrado inflamatório linfocitário perivascular. HE, obj. 20. Bovino 33204 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B), RJ.	44
Figura 21 Rim: infiltrado inflamatório linfocitário intersticial periglomerular. HE, obj. 40. Bovino 33204 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B) RJ.	45
Figura 22 Baço: infiltrado composto por plasmócitos, histiócitos e eosinófilos. HE, obj. 63. Bovino 33204 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B), RJ.	45
Figura 23 Intestino delgado: mucosa do jejuno com moderado infiltrado inflamatório linfocítico. HE, obj. 20. Bovino 33424 de propriedade-foco de tripanossomíase. Rio Claro (G), RJ.	46
Figura 24 Coração. Infiltrado inflamatório linfocitário intersticial multifocal. HE, obj 10. Bovino 33424 de propriedade-foco de tripanossomíase. Rio Claro (G), RJ.	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 25 Coração. Infiltrado inflamatório linfocitário intersticial multifocal. HE, obj 20. Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase. Município de Rio Claro (G), RJ.	47
Figura 26 Intestino delgado: moderado infiltrado inflamatório linfocitário na lâmina própria da mucosa. HE, obj 10. Bovino 33424 de propriedade-foco de tripanossomíase. Rio Claro (G), RJ.	47
Figura 27 Intestino delgado: acentuado infiltrado inflamatório linfocitário entre as criptas intestinais. HE, obj 40. Bovino 33424 de propriedade-foco de tripanossomíase. Rio Claro (G), RJ.	48

SUMÁRIO

	Página	
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Etiologia e Taxonomia	2
2.2	Morfologia	4
2.3	Ciclo Biológico e Transmissão	6
2.4	Origem e Distribuição Geográfica de <i>Trypanosoma vivax</i>	7
2.5	Formas de Ocorrência de <i>Trypanosoma vivax</i> no Brasil	9
2.6	Patogenia	9
2.7	Virulência das cepas de <i>Trypanosoma vivax</i>	11
2.8	Resposta Imune	11
2.9	Sinais Clínicos	12
2.10	Patologia clínica	14
2.11	Perdas Econômicas	15
2.12	Alterações Anatomopatológicas Macroscópicas	16
2.13	Alterações Histológicas	16
2.14	Diagnóstico	17
2.14.1	Diagnóstico Parasitológico	17
2.14.2	Diagnóstico Molecular	19
2.14.3	Diagnóstico Sorológico	20
2.15	Tratamento e Profilaxia	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Localização e Descrição do Estudo	22
3.2	Estudo dos 12 Focos	22
3.3	Diagnóstico Parasitológico e Morfometria	23
3.4	Diagnóstico Molecular em Amostras de Sangue Total	24
3.4.1	Extração de DNA Total em Amostras de Sangue	24
3.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR) e Sequenciamento	24
3.5	Diagnóstico Molecular em Amostras de Tecido	24
3.5.1	Extração de DNA Total em Amostras de Tecido	25
3.5.2	Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR)	25
3.6	Análise Estatística	25
3.7	Necropsias	25
3.8	Histopatologia	25
3.9	Diagnóstico Diferencial e Co-infecções	26
3.10	Focos Adicionais	26

SUMÁRIO

Página

4	RESULTADOS	27
4.1	Histórico e Dados Epidemiológicos nos 12 Focos Estudados	28
4.2	Sinais Clínicos	29
4.3	Diagnóstico Parasitológico e Molecular	35
4.4	Alterações Macroscópicas	38
4.5	Alterações Histológicas	41
4.6	Co-morbidades	52
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS		
	Anexo A	67
	Anexo B	68

1. INTRODUÇÃO

As tripanossomíases são enfermidades causadas por espécies do gênero *Trypanosoma*, protozoários dotados de flagelo que possibilitam o movimento em meio líquido, principalmente na corrente sanguínea de seus hospedeiros vertebrados.

Trypanosoma spp. parasita um número variado de espécies animais, tanto domésticas como silvestres. A ocorrência de tripanossomíases em animais de produção causa diminuição da produção nos rebanhos acometidos e conseqüentemente, perdas econômicas nas propriedades e regiões afetadas.

A tripanossomíase causada pelo *T. vivax* tem origem na África tropical onde a enfermidade, conhecida como “Nagana”, afeta frequentemente bovinos, mas também ovinos, caprinos, equídeos e camelídeos. No continente Africano, a transmissão entre os animais domésticos ocorre, principalmente, através de vetores biológicos em regiões infestadas pelas moscas do Gênero *Glossina*, conhecidas como Tsé-tsé, mas também mecanicamente, através de outras moscas hematófagas.

O impacto econômico causado pela enfermidade em regiões endêmicas da África é de grande importância, principalmente nas regiões da África tropical, onde a enfermidade representa um obstáculo para o desenvolvimento da pecuária.

Na América do Sul, as espécies de tripanosomas que causam enfermidades em animais de produção pertencem às espécies *T. evansi*, *T. vivax* e *T. equiperdum*; *T. vivax* é principalmente um parasito de ruminantes (bovinos, ovinos, caprinos e búfalos).

A expansão da enfermidade para as Américas ocorreu por volta da década de 1830 através da comercialização de bovinos, por colonizadores europeus. Postula-se que o deslocamento dos rebanhos e a adaptação do parasito à transmissão mecânica por moscas hematófagas, possibilitou a disseminação da infecção por *T. vivax* nas Américas Central, do Sul e Caribe.

A tripanossomíase por *T. vivax* em bovinos é caracterizada pela presença de um quadro de anemia seguida de perda da condição corporal, redução da produtividade e, frequentemente, alta letalidade. Nas Américas, tanto em países e regiões onde a enfermidade ocorre de forma endêmica, como também em áreas não endêmicas onde ocorrem surtos, a infecção por *T. vivax* em rebanhos bovinos de pecuária de leite e corte vem causando perdas econômicas significativas. As perdas são tanto diretas devido à mortalidade, doença e diminuição da produção, como indiretas devido à gastos com diagnóstico, tratamento e controle.

No Brasil, o primeiro relato de infecção por *T. vivax* ocorreu em búfalos no estado do Pará, em 1972. Posteriormente, focos em bovinos, ovinos e búfalos foram relatados em 1981. Na região do Pantanal (MT e MS), os primeiros relatos em bovinos foram realizados nos estados do Mato Grosso (1996) e do Mato Grosso do Sul (2000).

Na região Norte e no Pantanal (MT e MS), a enfermidade apresenta caráter endêmico, enquanto que nas outras regiões a doença é considerada não endêmica, com focos isolados e vínculos epidemiológicos próximos.

Após os registros de *T. vivax* no Pantanal (MT e MS), diversos outros estados (Maranhão, Paraíba, Tocantins, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Pernambuco, São Paulo, Goiás, Piauí e Sergipe) já apresentaram registros de focos de infecção por *T. vivax* em bovinos. Mas são regiões onde a tripanossomíase ainda não é considerada endêmica.

O objetivo deste estudo foi relatar os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos da infecção natural por *T. vivax* em bovinos no estado do Rio de Janeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia e Taxonomia

Trypanosoma vivax é um protozoário da ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae, que contém oito gêneros (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Phytomonas*); *T. vivax* pertence ao gênero *Trypanosoma*, subgênero *Duttonella* (HOARE, 1972; JONES; SILVA et al., 2002; HUNT, 2011).

Assim como todos os outros parasitos do gênero *Trypanosoma*, *T. vivax* é um protozoário digenético com ciclo de vida que alterna entre dois hospedeiros: um invertebrado, que representa o hospedeiro intermediário ou vetor, e um hospedeiro vertebrado, onde os parasitos vivem e se multiplicam na corrente sanguínea e/ou tecido animal (HOARE, 1972; JONES; HUNT, 2011).

As espécies do gênero *Trypanosoma* são divididas em duas grandes seções, caracterizadas pelo modo de transmissão e desenvolvimento no vetor. Nas espécies da seção Salivaria o ciclo de desenvolvimento do parasito no interior do inseto vetor é completado no tubo digestivo anterior e a transmissão é por inoculação durante a alimentação. Nos parasitos da seção Stercoraria o ciclo de desenvolvimento no interior do vetor é completado no tubo digestório posterior e a transmissão é por contaminação fecal. *Trypanosoma vivax* e outros tripanosomas patogênicos para a os animais domésticos presentes na América Latina pertencem todos à seção Salivaria (HOARE, 1972; RADOSTITS et al., 2000; DESQUENES, 2004).

Trypanosoma vivax, *T. brucei brucei*, *T. congolense* e *T. simiae* são as quatro principais espécies responsáveis por causar tripanossomíase em mamíferos domésticos na África, e pertencem à seção Salivaria (Figura 1). Os tripanosomas patogênicos para os animais domésticos presentes na América Latina também pertencem todos à seção Salivaria, subgênero *Duttonella* para *T. vivax*, e *Trypanozoon* para *T. evansi* e *T. equiperdum* (HOARE, 1972; RADOSTITS et al., 2000; DESQUENES, 2004).

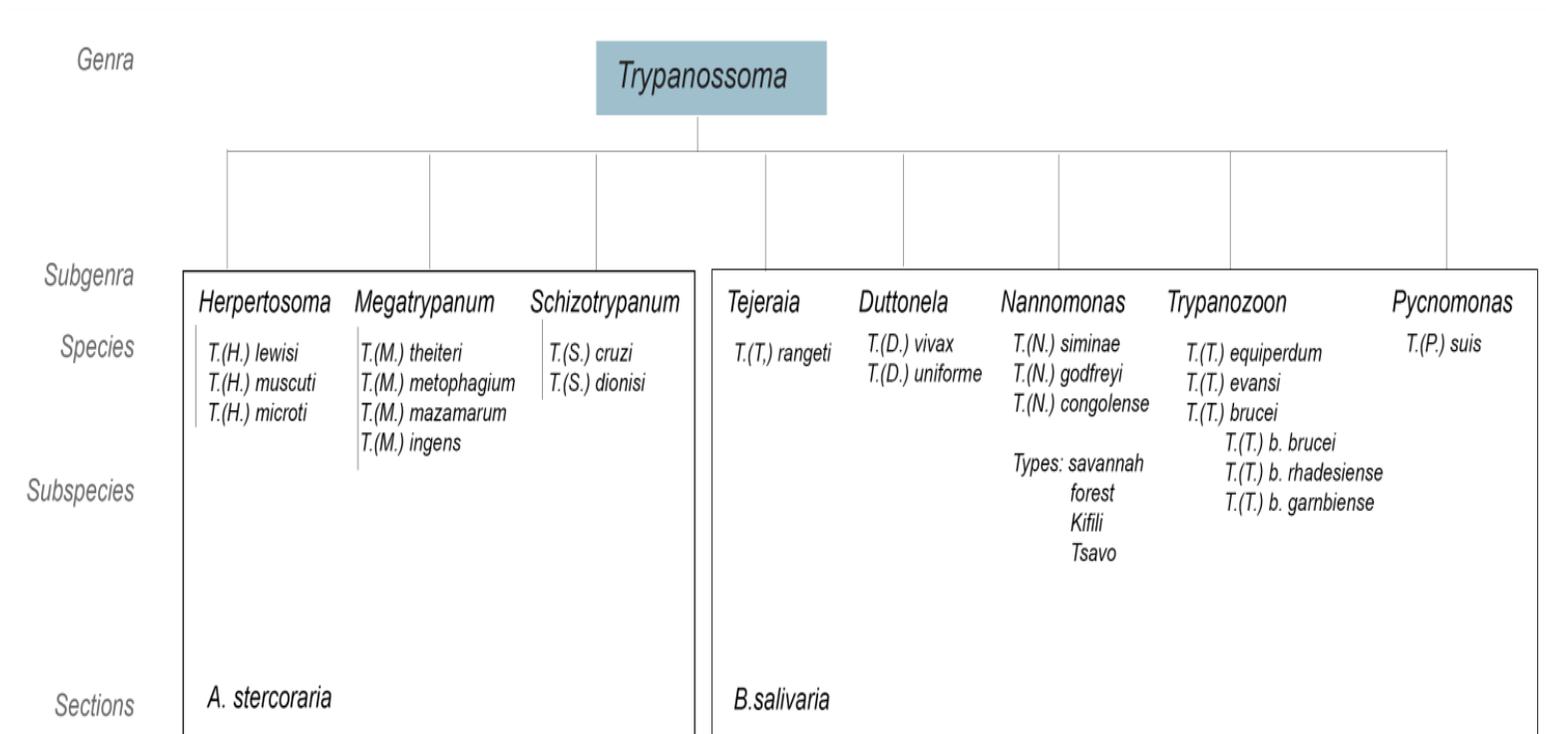


Figura 1. Classificação dos principais tripanosomas de mamíferos (de acordo com a OMS). Fonte: Adaptado de DESQUENES, 2004.

2.2 Morfologia

Trypanosoma spp., de modo geral, são protozoários de corpo longo, delgado, que apresentam kinetoplasto e flagelo. São parasitos que vivem no sangue e em outros tecidos orgânicos de hospedeiros vertebrados e, com a ajuda do flagelo, se locomovem nos fluidos corpóreos, traçando seu caminho entre as células. As espécies de tripanosomas podem diferir no tamanho e na forma. A observação dessas características é útil para definir e classificar as espécies (CONNOR; BOSSCHE, 2005).

Os parasitos do gênero *Trypanosoma* podem apresentar cinco diferentes estágios de desenvolvimento: promastigota, epimastigota, sphaeromastigota e tripomastigota. Embora a forma típica encontrada no sangue dos hospedeiros vertebrados seja a tripomastigota, os tripanosomas podem assumir qualquer um destes estágios e aparecer em diferentes combinações, em vários períodos do seu ciclo de vida digenético, tanto em vertebrados quanto nos vetores invertebrados, dependendo da espécie (HOARE, 1972).

Algumas formas extravasculares, cuja morfologia às vezes difere das formas da corrente sanguínea, têm sido descritas ocasionalmente para *T. vivax*, regularmente para *T. evansi* e frequentemente para *T. equiperdum* e *T. cruzi*. Para fim de diagnóstico de rotina (através de amostras de sangue) as formas encontradas na corrente sanguínea, delgadas ou tripomastigotas, são descritas na literatura com maior frequência e detalhamento de suas características (HOARE, 1972; DESQUENES, 2004).

Trypanosoma congolense é menor e mais lento do que *T. vivax*. Possui menor comprimento, com kinetoplasto marginal, sem flagelo livre e sem membrana ondulante proeminente. *Trypanosoma brucei brucei* é grande como *T. vivax*, porém é pleomórfico e pode ocorrer na forma longa e delgada, na forma intermediária ou na forma curta e achatada. Nas formas delgadas e intermediárias, possui um longo flagelo, extremidade posterior alongada, kinetoplasto subterminal e membrana ondulante proeminente, enquanto na forma achatada se assemelha ao *T. congolense*, porém é maior e possui a membrana ondulante proeminente. *Trypanosoma simiae*, encontrado no sangue de suínos, é morfologicamente indistinguível de *T. congolense* (HOARE, 1972; RADOSTITS et al., 2000).

Trypanosoma vivax apresenta um flagelo longo e livre e uma membrana ondulante não muito proeminente. Por pertencer ao subgênero *Duttonella*, possui um kinetoplasto grande, arredondado e subterminal, localizado entre a extremidade posterior e o núcleo. O núcleo se localiza próximo à extremidade anterior. A extremidade posterior de *T. vivax* é arredondada (HOARE, 1972; D'ÁVILA et al., 1997; RADOSTITS et al., 2000; DESQUENES, 2004).

Na África, *T. vivax* passa por um ciclo polimórfico de desenvolvimento em seus hospedeiros, nos quais as formas delgadas (tripomastigotas) na corrente sanguínea, uma vez reconhecidas pelos anticorpos do hospedeiro, dão lugar às formas achatadas que apresentam novos antígenos de superfície. Nas Américas, *T. vivax* é transmitido mecanicamente e somente formas delgadas são encontradas (HOARE, 1972; DESQUENES, 2004). A forma delgada (tripomastigota) de *T. vivax* está ilustrada na Figura 2.

A morfometria da forma sanguínea do parasito *T. vivax* foi citada em estudos morfológicos realizados por Hoare (1972). As cepas africanas de *T. vivax* apresentam largura média entre 1,5 a 3µm e a faixa de comprimento total de é de 18µm a 31µm (incluindo o flagelo livre, que mede 3-6µm, em média), com média de 21µm a 25,4µm. Já *T. vivax* de cepas sul-americanas são ligeiramente menores, com médias de 16-26,5µm, mas permanecem dentro da faixa estabelecida para *T. vivax*. As formas mais curtas estão associadas a cepas que causam doença aguda em bovinos na região oeste da África, enquanto que formas mais longas se associam a cepas que causam infecção crônica no leste da África. Além do comprimento total, índices biométricos são utilizados para confirmar o diagnóstico de espécie e comparar eventuais diferenças entre cepas (SILVA et al., 1996).

As medidas de comprimento total de *T. vivax* encontrados no sangue de bovinos naturalmente infectados no Brasil e na Bolívia, foram comparadas por Dávila et al. (1997), que concluíram que as formas mais curtas detectadas poderiam estar relacionadas com a doença aguda observada por eles.

No primeiro foco descrito no Brasil (SHAW; LAINSON, 1972), as dimensões de *T. vivax* relatadas foram de 22,77 μ m (variando de 19,2 μ m para 25,0 μ m), enquanto que Silva et al. (1996) encontraram, no Pantanal, formas um pouco mais curtas, com médias de 18,73 μ m (variando de 11,34 μ m a 21,87 μ m). Ainda Linhares et al. (2006), em um foco no Tocantins, obteve uma média de 19,42 μ m, e no primeiro relato no Maranhão, em 2003, os parasitos encontrados apresentavam médias biométricas de 19,9 μ m (GUERRA et al., 2008) e variação de 15,38 μ m a 24,26 μ m de comprimento total. Nos focos de Minas Gerais, as dimensões foram de 19,89 μ m \pm 2,15 (CUGLOVICE et al., 2010).

Além do comprimento total, índices morfométricos (Figura 3) são utilizados para confirmar o diagnóstico de espécie e comparar eventuais diferenças entre cepas (HOARE, 1972; DESQUENES, 2004).

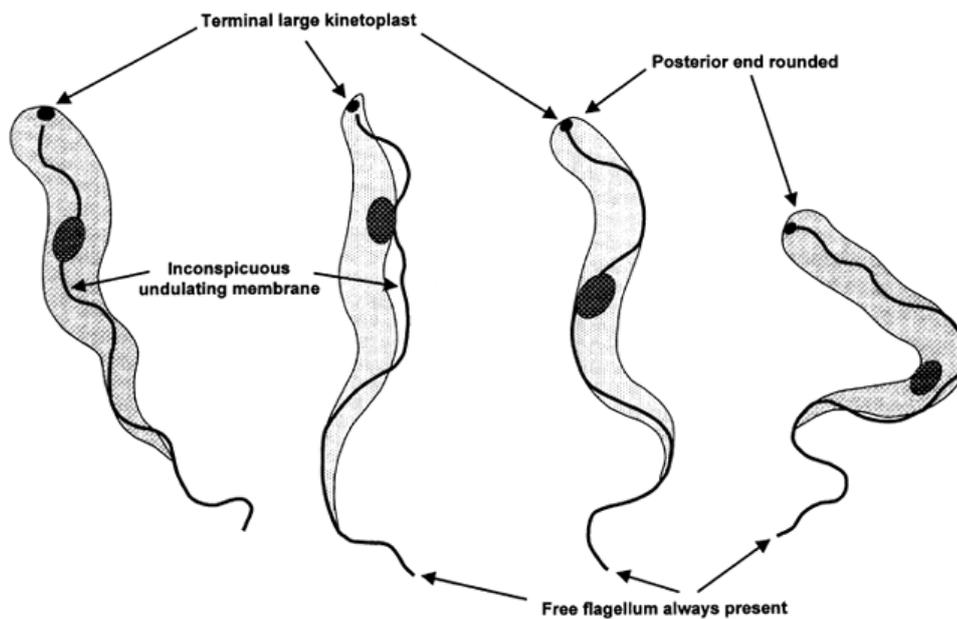


Figura 2. *Trypanosoma vivax*: formas tripomastigotas encontradas no sangue de bovinos naturalmente infectados. Fonte: SILVA et al., 2003.

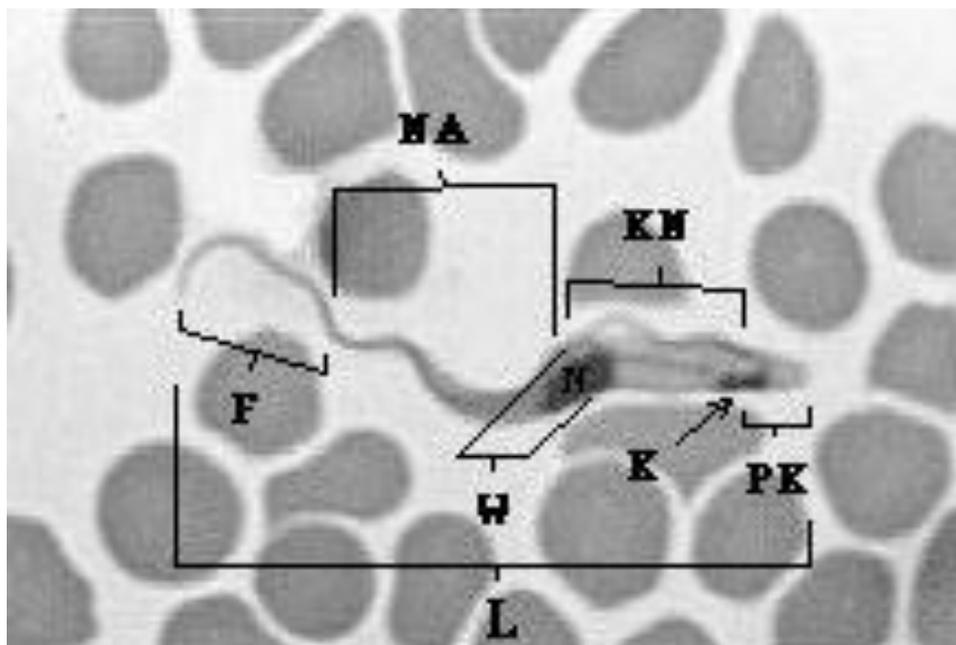


Figura 3: Índices biométricos dos tripanosomas. L: Comprimento total (incluindo o flagelo livre); PK: Distância do final da extremidade posterior ao cinetoplasto; KN: do cinetoplasto ao meio do núcleo; PN: do final da extremidade posterior ao meio do núcleo; NA: do meio do núcleo ao final da extremidade anterior; F: comprimento do flagelo livre; K: Cinetoplasto. Fonte: SILVA et al., 2003.

2.3 Ciclo Biológico e Transmissão

Trypanosoma vivax são parasitos digenéticos que requerem dois hospedeiros para completar seu ciclo. No ciclo biológico são transmitidos para o hospedeiro vertebrado através de inoculação pela saliva de um vetor (insetos hematófagos), durante o repasto sanguíneo. Nos hospedeiros vertebrados eles se multiplicam no sangue, tecidos e fluidos e são ingeridos pelos vetores hematófagos invertebrados onde se desenvolvem em seu interior (HOARE, 1972; DESQUENES, 2004).

Os hospedeiros vertebrados de *T. vivax* são ruminantes incluindo bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, camelos, várias espécies de antílopes selvagens, e raramente equinos (DESQUENES, 2004; RIET – CORREA, 2007). No Brasil os principais hospedeiros são bovinos, seguidos de bubalinos, caprinos e ovinos. A infecção em equinos nunca foi relatada.

Na África os vetores biológicos são moscas hematófagas do gênero *Glossina*, conhecidas como Tsé-tsé. Além do ciclo biológico original e predominante na África, a transmissão mecânica também pode ocorrer, tanto pelas moscas Tsé-tsé como por outras espécies hematófagas (HOARE, 1972; CONNOR; BOSSCHE, 2005; JONES; HUNT, 2011).

Nas Américas, na ausência do vetor biológico (*Glossina spp*), *T. vivax* conseguiu adaptar-se à transmissão mecânica por moscas hematófagas do gênero *Tabanus* e por *Stomoxys calcitrans*. Estes vetores são capazes de transmitir formas sanguíneas do parasito diretamente de um hospedeiro vertebrado para outro, quando o repasto sanguíneo é interrompido e seguido da alimentação (em um período inferior a 10 minutos) em outro animal (OTTE; ABUABARA, 1991; PAIVA et al., 2000; DESQUESNES 2004; BALDACHINO et al., 2013).

Apesar da habilidade para transmitir os tripanosomas mecanicamente ser de curta duração e depender da sobrevivência dos parasitos nas peças bucais do inseto, infecções em

fase de alta parasitemia podem ser compensatórias e facilitar a transmissão mecânica (PAIVA et al., 2000, RADOSTITS et al., 2000; DESQUESNES, 2004.; RIET-CORREA, 2007).

Trypanosoma vivax vem se dispersando no território brasileiro para áreas onde os vetores estão presentes. A transmissão baseada na presença de moscas hematófagas e a alta prevalência de infecção por *T. vivax* em bovinos, associada a um aumento na população destes vetores em propriedades foi sugerida por diversos autores que estudaram focos de infecção por *T. vivax* na América Latina e no Brasil (OTTE & ABUABARA, 1991; SILVA et al., 2006; BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008; CUGLOVICE et al., 2010; PAIVA et al., 2010; CADIOLI et al., 2012; PIMENTEL et al., 2012; LOPES et al., 2018).

A maior incidência da enfermidade ocorre principalmente durante a estação chuvosa no Pantanal, época associada a condições favoráveis para o desenvolvimento dos vetores e aumento de suas populações que influenciam na transmissão do parasito. Já regiões com baixos índices pluviométricos, períodos longos de seca e alta temperatura não apresentam condições favoráveis ao desenvolvimento dos vetores (PAIVA et al., 2000; DÁVILA et al., 2003; GUERRA et al., 2013; MADRUGA 2009).

Enquanto na África, *T. vivax* possui muitos reservatórios silvestres (artiodáctilos, perissodáctilos e até carnívoros), na América do Sul o único animal selvagem encontrado infectado até o momento foi o veado (*Odocoileus gymnotis*), na Venezuela (OSÓRIO et al., 2008).

No Brasil, nas extensas áreas de pecuária do Pantanal, cervídeos podem ser um reservatório para o parasito. Porém, na falta de evidências, só se pode supor que o estabelecimento de *T. vivax* é inteiramente dependente de seus hospedeiros domésticos. Búfalos e bovinos são reservatório de *T. vivax* na região do Pantanal (D'ÁVILA et al., 2003; SILVA et al.; 2004), mas caprinos e ovinos também são relatados como reservatórios potenciais (BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008; PIMENTEL et al., 2012).

Bovinos infectados e assintomáticos são potenciais causas de difusão do parasito. Estudos em regiões não endêmicas relatam que surtos da enfermidade podem ter ocorrido após a introdução de rebanhos com infecção subclínica, oriundos de áreas endêmicas ou de ocorrência recente. Além de bovinos, o deslocamento de bubalinos, caprinos e ovinos assintomáticos também representa risco potencial de introdução da enfermidade (BATISTA et al., 2007; GUERRA et al., 2008; DA SILVA et al., 2009; MADRUGA, 2009; PIMENTEL et al., 2012; GERMANO et al., 2017; VIEIRA et al., 2017).

A aplicação de ocitocina na veia mamária com a utilização da mesma agulha e seringa para todos os animais de um rebanho foi uma prática amplamente relatada em estudos de diversos focos de infecção em bovinos por *T. vivax*, como prática indutora da disseminação via sanguínea do parasito entre os animais, principalmente vacas em lactação. Até mesmo a aplicação de vacinas por via subcutânea, com agulhas compartilhadas, foi relatada como uma possível causa da disseminação do *T. vivax* (LINHARES et al., 2006; ABRÃO et al., 2009; GALIZA et al., 2011; GERMANO et al., 2017; VIERA et al., 2017).

A possibilidade de existir transmissão vertical não foi comprovada até o momento. No entanto, estudos detectaram bezerros nascidos durante surtos e mantidos afastados das vacas em lactação que apresentaram sinais clínicos, parasitemia e morte (BATISTA et al., 2007).

2.4 Origem e Distribuição Geográfica de *Trypanosoma vivax*

Na África, existem muitas espécies do gênero tripanosoma que são patogênicas para mamíferos, incluindo o homem. O primeiro relato que associou o gênero *Trypanosoma* com doenças ocorreu na Índia, por Evans, em 1880 que encontrou o parasito no sangue de camelos e cavalos doentes devido a uma doença conhecida localmente como “Surra”, e que hoje em dia sabe-se que é causada por *T. evansi*. Posteriormente, Bruce descobriu em Zuzuland, Sul da

África, que o gênero *Trypanosoma* também era causador da doença chamada “Nagana”, ou “*Tsé-tsé fly disease*” (HOARE, 1972; CONNOR; BOSSCHE, 2005).

A ecologia e distribuição das moscas Tsé-tsé (gênero *Glossina*), constitui o principal fator determinante das tripanossomíases na África, principalmente nas regiões da África tropical, ao sul do deserto do Saara. A “doença do sono”, como é conhecida a tripanossomíase humana na África, é causada pelos *T. brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense* e é responsável por mais de 45.000 mortes por ano. No sul da África as tripanossomíases nos animais são conhecidas como “Nagana” e são causadas por *T. vivax*, *T. brucei brucei*, *T. congolense* e *T. simae*, e acometem bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos e ruminantes silvestres (DESQUENES, 2004; CONNOR; BOSSCHE, 2005).

Trypanosoma vivax foi descrito pela primeira vez na África por ZIEMANN, e foi encontrado no sangue de ruminantes domésticos, em Camarões. Na África tropical *T. vivax* é prevalente na maior parte do oeste, centro, sul e leste da África, principalmente em regiões com a presença da mosca Tsé-tsé, mas também em outras regiões na ausência desta (HOARE, 1972; RADOSTITS et al., 2000; DESQUENES, 2004; CONNOR; BOSSCHE, 2005).

A tripanossomíase se espalhou para outros continentes e países, devido à importação de gado. Nas Américas Central e do Sul, o estabelecimento da espécie *T. vivax* ocorreu pela importação de rebanhos pelos colonizadores espanhóis e portugueses, sobretudo de gado zebu, oriundo do Senegal, por volta de 1930, para a Guiana Francesa e ilhas de Martinica e Guadalupe (HOARE, 1972; WELLS et al., 1984; CONNOR; BOSSCHE, 2005).

A primeira ocorrência do *T. vivax* nas Américas foi registrada na Guiana Francesa, em 1919 (LEGER; VIENNE, 1919). Posteriormente a este caso inicial, ocorreu o aparecimento de focos em outros países da América do Sul e Central, como Colômbia, Venezuela, Bolívia e algumas ilhas do Caribe (WELLS et al., 1984; MELÉNDEZ et al., 1993, SILVA et al., 1997). A disseminação do parasito por diversos países americanos ocorreu em decorrência da movimentação dos rebanhos (JONES; DÁVILA, 2001).

O Quadro 1 apresenta o nome popular das enfermidades, seus hospedeiros, sua distribuição e as espécies de *Trypanosoma*, respectivamente.

Quadro 1: Tripanossomíases dos animais domésticos e do homem

Enfermidade	Espécie acometida	Distribuição	<i>Trypanosoma spp.</i>
Nagana	Vários mamíferos	África Tropical	<i>T. brucei brucei</i> , <i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> , <i>T. simiae</i>
Tripanossomíase/ Tripanossomoses	Ruminantes domésticos	América do Sul e Central	<i>T. vivax</i>
Surra/Mal da Cadeiras	Equinos e camelos	África, Ásia, Américas	<i>T. evansi</i>
Durina	Equinos	África, Ásia, Europa e Américas	<i>T. equiperdum</i>
Doença do sono	Humanos	África (central, do Sul, leste e oeste)	<i>T. brucei rhodesiense</i> , <i>T. brucei gambiense</i>
Doença de chagas	Humanos/ Mamíferos	América Central e sul dos EUA	<i>T. cruzi</i>

Fonte: Adaptado de RADOSTITIS et al., 2000.

No Brasil, *T. vivax* foi observado pela primeira vez em 1944, em bovinos da zona Bragantina no estado do Pará (DESQUENES, 2004), e quase 30 anos após, foi encontrado em búfalos no estado do Pará (SHAW; LAINSON, 1972). Outros relatos foram feitos por Massard et al. (1979) em búfalos no Amapá, e em 1981, focos de infecção em bovinos foram relatados também no Amapá (SERRA FREIRE, 1981).

Em 1995 ocorreu o primeiro surto de tripanossomíase causada por *T. vivax* em bovinos, no município de Poconé, localizado no Pantanal, em Mato Grosso (SILVA et al., 1996). Posteriormente, infecções por *T. vivax* em bovinos foram descritas entre 1997 a 1999, na região do Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul (PAIVA et al., 2000); em 2003, no Maranhão (GUERRA, et al., 2008); depois na Paraíba (BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008) e no Tocantins (LINHARES et al., 2006).

Os registros mais recentes ocorreram em Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008, ; ABRÃO et al., 2009; CUGLOVICI et al., 2010), no Rio Grande do Sul (DA SILVA et al., 2009), em Pernambuco (PIMENTEL et al., 2012), em São Paulo (CADIOLI et al., 2012), em Goiás (BARBOSA et al., 2015; BASTOS et al., 2017), em Sergipe (VIEIRA et al., 2017) e no Piauí (LOPES et al., 2018).

2.5 Formas de Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no Brasil

Atualmente a tripanossomíase bovina no Brasil é considerada endêmica no Pantanal matogrossense (nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e em parte do Pará. O Pantanal representa uma importante área de produção pecuária, com uma população bovina elevada, com clima e ambiente favoráveis para o desenvolvimento dos vetores e com ampla distribuição do *T. vivax*. (PAIVA et al., 2000; DÁVILA et al., 2003; MADRUGA 2006; BATISTA et al., 2008; MADRUGA 2009).

Como a enfermidade é endêmica na região do Pantanal, a disseminação para outras regiões do país torna-se muito provável e o posterior estabelecimento da enfermidade depende de fatores como a presença de ambiente favorável para o desenvolvimento de vetores (SILVA et al., 1999; BATISTA et al.2007).

Após aqueles estudos relatados nas regiões endêmicas do Pantanal são citados surtos em regiões e estados considerados não endêmicos. Em sua maioria a enfermidade foi relatada após a introdução de animais oriundos de regiões endêmicas (ou de ocorrência recente) e onde exista a presença dos vetores e/ou práticas de manejo que favoreçam a transmissão (BATISTA et al., 2008, PIMENTEL et al., 2012).

Em um estudo de um surto ocorrido na Paraíba, área não endêmica, o acompanhamento da propriedade por dois anos demonstrou que o período definido como de evolução da enfermidade no rebanho foi de 4 meses, a taxa de morbidade foi de 49% e a taxa de mortalidade de 8,4%. Após dois anos a doença estava ausente e o *T. vivax* aparentemente eliminado do rebanho (BATISTA et al., 2007). Além deste, outros focos em regiões e estados não endêmicos, têm sido relatados, com evolução e taxas de incidência semelhantes (BATISTA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; ABRÃO et al., 2009; GALIZA et al., 2011; CADIOLI et al., 2012; PIMENTEL et al., 2012; VIEIRA et al., 2017).

2.6 Patogenia

A infecção por *T. vivax* causa, na maioria das vezes, uma doença progressiva e nem sempre fatal, que tem como características principais a anemia, danos teciduais e imunossupressão (RADOSTITS et al., 2000).

Após a penetração no organismo do hospedeiro, as formas tripomastigotas do parasito atingem a corrente sanguínea e se multiplicam rapidamente por fissão binária, o que leva a uma parasitemia intermitente, característica da infecção. A presença de *T. vivax* geralmente produz um alto nível de parasitemia, principalmente nos estágios iniciais (fase aguda) da

infecção, que dura aproximadamente duas semanas, e é acompanhada de febre alta. O parasito se multiplica rapidamente no sangue e é uniformemente dispersado por todo o sistema cardiovascular (SILVA et al., 1997; RADOSTITS et al., 2000; JONES; HUNT, 2011).

O principal efeito que *T. vivax* exerce é uma anemia severa e danos teciduais de intensidades variadas. A anemia envolve mecanismos patogênicos complexos, principalmente devido ao aumento da eritrofagocitose, hemólise intra e extravascular, redução ou inibição da eritropoiese e hemorragias (; RADOSTITS et al., 2000; BATISTA et al., 2006; BATISTA et al., 2008, CADIOLI et al., 2014; LOPES et al., 2018).

Em um estudo que se utilizou da observação de interações celulares em eritrócitos de ovinos infectados experimentalmente com *T. vivax*, foi possível observar que a infecção resultou em alterações na forma das hemácias bem como na formação de orifícios ou vesículas em sua superfície. Houve aderência do flagelo e do corpo celular dos parasitos às superfícies das hemácias dos ovinos. Os eritrócitos alterados são propensos à remoção fagocitária mononuclear, contribuindo assim para a diminuição do hematócrito durante a infecção. Além disso, a ação de substâncias biologicamente produzidas pelos tripanosomas na corrente sanguínea contribui para a eritrofagocitose (BOADA-SUCRE et al., 2016).

A hiperplasia compensatória do sistema fagocitário mononuclear (secundária ao aumento da eritrofagocitose) resulta em exaustão do sistema hematopoiético e linfóide (RADOSTITS et al., 2000; JONES & HUNT, 2011; VALI et al., 2015).

Infecções muito agudas por *T. vivax* em bovinos podem levar a uma parasitemia intensa e coagulação intravascular disseminada, com quadros de hemorragias. Essas síndromes se assemelham a septicemias e a anemia pode não ser observada (RADOSTITS et al., 2000).

No estudo experimental de Gardiner et al. (1989), o quadro patológico em bovinos infectados com isolados africanos de *T. vivax* foi caracterizado por lesões hemorrágicas severas, principalmente no trato gastrointestinal. A "síndrome hemorrágica" descrita na África Oriental e os sinais hemorrágicos observados na África Ocidental não foram relatados na América (DESQUENES, 2004).

Trypanosoma vivax podem escapar dos capilares e ingressar no espaço intersticial de tecidos e em cavidades serosas, onde eles continuam a se multiplicar. Nos tecidos os parasitos incitam uma reação inflamatória predominantemente mononuclear que pode ocorrer em diversos tecidos do corpo, inclusive na musculatura esquelética, miocárdio, cérebro, medula espinhal e meninges, olhos, fígado, útero e pele (RADOSTITS et al., 2000; JONES; HUNT, 2011).

Na fase crônica, a temperatura volta ao normal e a parasitemia diminui ou se torna ausente. A localização extravascular dos parasitos é característica da fase crônica ((BATISTA et al., 2006; BATISTA et al., 2007).

Animais cronicamente infectados podem desenvolver infecções secundárias devido ao quadro de imunossupressão desenvolvido (RADOSTITS et al., 2000).

O fluido cerebrospinal é frequentemente invadido por *T. vivax*. A infecção de bovinos por *T. vivax* pode causar sinais nervosos devido à inflamação e lesões cerebrais degenerativas (RADOSTITS et al., 2000; BATISTA et al., 2007).

Lesões do sistema nervoso têm sido associadas à presença de a) tripanosomas nos tecidos nervosos e fluido cérebro-espinhal; b) alterações circulatórias causadas por êmbolos formados por tripanosomas, leucócitos e fibrina nos capilares e vênulas do cérebro; c) reação autoimune (anticorpos contra tecidos nervosos foram detectados no fluido cérebro-espinhal) e d) apoptose de células endoteliais dos vasos sanguíneos do cérebro e cerebelo (BATISTA et al., 2007).

A anemia severa pode causar hipoxia cerebral e ocasionar sinais neurológicos transitórios, principalmente durante a movimentação desses animais, levando ao surgimento de sinais clínicos neurológicos (GALIZA et al., 2011).

A importância do parasito na patogênese da cardiopatia na infecção por *T. vivax* foi mencionada por KIMETO et al. (1990) que, pela microscopia eletrônica do coração de bovinos infectados experimentalmente com *T. vivax*, detectaram o parasito no miocárdio e correlacionaram a severidade das lesões inflamatórias com a localização extravascular do mesmo.

Bovinos que se tornam tripanotolerantes podem controlar a parasitemia e terem menor grau de anemia e lesões teciduais (RADOSTITS et al., 2000).

Alguns fatores podem influenciar na patogenia causada por *T. vivax* em bovinos, como a virulência da cepa envolvida, estado imunológico dos animais e infecções concomitantes.

2.7 Virulência das cepas de *Trypanosoma vivax*

A infecção por *T. vivax* pode apresentar quadro clínico-patológico variado, dependendo do tipo de cepa envolvida. Cepas muito virulentas podem provocar quadros clínicos graves e fatais; enquanto outras, de baixa virulência, podem determinar doença leve, de caráter crônico, com equilíbrio entre hospedeiro e parasito, e outras ainda, podem mesmo levar a infecções assintomáticas. Em todos os casos, é possível que ocorra uma completa recuperação do animal e desenvolvimento de resposta imune (VALI et al., 2015).

Na África, a tripanossomíase em rebanhos bovinos, causada pelo *T. vivax*, apresenta diferenças nas manifestações clínicas entre as populações do agente da costa leste e oeste. Na região leste da África, as infecções apresentam caráter crônico, enquanto na região oeste, onde se originou a população inicial do *T. vivax* das Américas, as cepas aparentemente possuem um maior potencial patogênico, assim como maior virulência, determinando manifestações clínicas agudas (SILVA et al., 1996; PAIVA et al., 2000).

A transmissão por vetor biológico permite que os tripanosomas desenvolvam a habilidade em gerar populações antigenicamente diferentes no hospedeiro vertebrado. Após a infecção, *T. vivax* estimula a resposta imunológica do hospedeiro para que ocorra a produção de anticorpos específicos, e esse estímulo se dá devido aos antígenos variáveis de superfície (VATs) formados por glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs) situadas na superfície externa dos tripanosomas. A expressão periódica de diferentes VSGs promove variação antigênica que influencia na relação parasito-hospedeiro de *T. vivax* na África, onde ocorrem diferentes cepas do parasito (RADOSTITS et al., 2000).

Nas Américas, onde a transmissão vetorial é mecânica, não ocorre mutação nos genes que controlam a variação antigênica. Daí se dá a ausência de diversidades de cepas americanas, ao contrário do que ocorre na África (RIET-CORREA, 2007).

A redução da variação antigênica é um fator importante e considerado em relação às diferenças das manifestações clínicas entre cepas africanas e americanas (PAIVA et al., 2000; SHENK et al., 2001; JONES; DÁVILA, 2001).

2.8 Resposta Imune

A imunidade dos animais também representa um fator importante e determinante na condução da manifestação clínica nos animais e conseqüente evolução da tripanossomíase. Bovinos em boas condições fisiológicas controlam a parasitemia do *T. vivax*, conseguem estabelecer um equilíbrio na relação hospedeiro-parasito e desenvolvem capacidade de amenizar e até mesmo de suprimir as manifestações clínicas graves e alterações hematológicas características de tripanossomíase (PAIVA et al., 2000; SCHENK et al., 2001; MADRUGA 2009).

A influência da imunidade também foi relatada em um estudo experimental que teve como objetivo avaliar alterações clínicas e laboratoriais de bezerros Nelores em bom estado nutricional, inoculados com organismos viáveis de *T. vivax*, com uma cepa isolada de bovinos da região do Pantanal de Poconé, Mato Grosso do Sul. Os animais apresentaram apenas febre branda e diminuição do volume globular médio. Mesmo em um animal em que a presença de *T. vivax* foi evidenciada durante 6 meses, o quadro clínico se manteve estável (SCHENK et al., 2001).

Em rebanhos afetados em alguns municípios do estado do Pará, onde o quadro nutricional e deficiências minerais foram corrigidas, os animais apresentaram melhora clínica e conseguiram conviver com a infecção sem grandes consequências clínicas ou produtivas (BARBOSA, 2015).

A morbidade e mortalidade ocorridas entre 1997 e 1999, em rebanhos bovinos do Pantanal do Mato Grosso do Sul, foram associadas primariamente à presença de outros agentes etiológicos e a condições nutricionais regulares que podem ter induzido a uma diminuição da imunidade destes animais. A co-infecção por *T. vivax* atuou como agente secundário que contribuiu para o agravamento do quadro clínico geral (PAIVA et al., 2000).

2.9 Sinais Clínicos

Em rebanhos infectados por *T. vivax*, a presença, ausência ou a intensidade dos sinais clínicos dependem, além de fatores já citados (virulência do protozoário, estado imunológico dos animais e co-infecções) da fase da evolução da doença (SCHENK et al., 2001; MADRUGA 2009; VIEIRA et al, 2017; LOPES et al., 2018).

A fase aguda é caracterizada pela presença de sinais clínicos intensos e letalidade. Após a sintomatologia aguda inicial, alguns animais podem passar para uma fase crônica, com alterações leves ou para infecções subclínicas. Nem todos os animais passam para a fase crônica, alguns morrem na fase aguda ou podem apresentar cura espontânea ou medicamentosa. Na fase crônica a parasitemia está reduzida e *T. vivax* pode permanecer no organismo de forma extravascular, no interior de órgãos diversos. Podem ocorrer episódios de recidiva dos sinais agudos, principalmente em casos de queda de imunidade, como tem sido verificado no período pós-parto (BATISTA et al., 2006; BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008).

Infecções subclínicas por *T. vivax* são comuns na África (GARDINER et al., 1989) e em regiões endêmicas sul americanas. Nas regiões do Brasil consideradas endêmicas, como no Pantanal e em algumas regiões do Pará, a presença de infecções generalizadas por *T. vivax* em bovinos, búfalos e ovinos está associada ao caráter crônico com predominância de rebanhos assintomáticos ou com manifestações clínicas esporádicas e leves (OTTE et al., 1994; PAIVA et al., 2000; DAVILA et al., 2003; MADRUGA, 2004; MADRUGA, 2009; GARCIA et al., 2014).

Diferenças evidentes ocorreram em animais inicialmente infectados em surtos em regiões não endêmicas onde os focos relatados tenderam a apresentar predomínio de uma evolução inicial aguda com doença grave e mortalidade elevada (SILVA et al., 1998; BATISTA et al. 2007; BATISTA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; ABRÃO et al., 2009; GALIZA et al., 2011; CADIOLI et al., 2012; PIMENTEL et al., 2012; VIEIRA et al., 2017).

Em 1996 foi descrito o primeiro surto de infecção por *T. vivax* em bovinos na região de Poconé, no Pantanal do estado de Mato Grosso, onde os sinais clínicos foram febre, letargia, perda de apetite, fraqueza, lacrimejamento, disenteria, aborto, emagrecimento e mortes. Alguns animais desenvolveram a forma crônica, caracterizada por emaciação e caquexia com evolução mais longa, de quatro a seis semanas (SILVA et al, 1996).

Num estudo de Paiva et al. (2000), entre 1997 e 1999, na região do Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul, os animais dos rebanhos estudados apresentaram manifestações clínicas inespecíficas (emagrecimento progressivo, abortos, decúbito e morte) de evolução prolongada e não apresentaram características coincidentes com sinais clínicos agudos atribuídos ao agente. A infecção por *T. vivax* nos animais contribuiu para acentuar o quadro clínico já existente devido à intoxicação por plantas, desnutrição, idade avançada e restrição alimentar acentuada, devido a manejo inadequado na época das inundações sazonais das pastagens do Pantanal.

Nos registros de focos de infecções por *T. vivax* em regiões e estados não endêmicos, que ocorreram após os relatos do Pantanal, os sinais clínicos mais descritos foram: palidez de mucosas, febre, fraqueza, falta de apetite, emagrecimento, caquexia, queda significativa na produção de leite, diarreia, sinais neurológicos, alterações reprodutivas e mortes. Palidez acentuada das mucosas, devido à anemia, foi amplamente relatada e é um sinal característico da fase aguda (SILVA et al., 1998; SILVA et al., 2004; BATISTA et al. 2007; BATISTA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; ABRÃO et al., 2009; GALIZA et al., 2011; CADIOLI et al., 2012; PIMENTEL et al., 2012; VIEIRA et al., 2017). Com menor frequência foram relatados em alguns estudos, edema de barbela, opacidade de córnea, diarreia, linfonodos aumentados e palpáveis, e aumento das frequências cardíaca e respiratória (BATISTA et al., 2008).

No primeiro registro no estado da Paraíba, em 2002, os bovinos afetados apresentaram depressão, anorexia, febre, anemia grave, perda de peso progressiva e diminuição na produção de leite, assim como sinais neurológicos. Além das vacas, bezerros nascidos durante o surto apresentaram baixo ganho de peso e alguns tiveram exsudação nasal, dispneia e tosse. Cinco bezerros morreram. Neste estudo, o rebanho foi acompanhado por mais dois meses e foi relatada a recuperação parcial de alguns animais que passaram a apresentar alterações clínicas mais leves, típicas da fase crônica, como perda de peso progressiva, febre recorrente, leve descoloração das mucosas e aumento do débito cardíaco e respiratório (BATISTA et al., 2007).

Em 2007 ocorreu o primeiro registro de foco de tripanossomíase em bovinos no estado de Minas Gerais. A prevalência na região foi acompanhada até 2009. A anemia foi a alteração mais importante encontrada em animais infectados, além de febre, anorexia, linfonodos aumentados, apatia e emagrecimento progressivo (CARVALHO et al., 2008; ABRÃO et al., 2009; CUGLOVICI et al., 2010).

Em 2010, um surto de infecção por *T. vivax* afetou vacas leiteiras no município de Itambé, no norte da zona costeira do estado de Pernambuco; 27,5% dos animais apresentaram febre, anorexia, mucosas pálidas, diarreia aquosa de coloração escura, redução na produção de leite, partos prematuros e abortos acima da média (PIMENTEL et al., 2012).

Cadioli et al. (2012) relataram o primeiro surto de infecção por *T. vivax* em bovinos no estado de São Paulo onde os animais acometidos apresentaram febre, icterícia, diminuição da produção de leite, perda de peso, aumento de linfonodos, edema submandibular, diarreia profusa, abortos, anemia e morte. Três vacas apresentaram sintomatologia nervosa caracterizada por dismetria, ataxia, fraqueza muscular e ptialismo.

Estudos têm verificado que, entre os animais dos rebanhos, as vacas em lactação e aquelas que se encontram no período de pós-parto são as mais afetadas clinicamente. O período pós-parto recente também foi apontado em alguns estudos como de risco para o reaparecimento dos sinais clínicos. Alguns estudos relataram a ocorrência de sinais clínicos e presença do parasito também em bezerros jovens (BATISTA et al., 2007; GERMANO et al., 2017).

Os sinais neurológicos que foram relatados em estudos de rebanhos bovinos com infecção por *T. vivax* incluíram depressão, incoordenação, hipermetria, dismetria, tremores

musculares, opistótono, tetania, estrabismo, nistagmo e cegueira. Sinais neurológicos não foram relatados em animais jovens, somente em vacas em lactação (BATISTA et al., 2007; RIET-CORREA, 2007; BATISTA et al., 2008; DA SILVA, 2009; GALIZA et al., 2011; CADIOLI et al., 2012; VIEIRA et al., 2017). A cegueira foi relatada como transitória em alguns casos (BATISTA 2008; VIEIRA et al., 2017).

A grande maioria dos animais que apresentam alterações neurológicas morre e raros são os relatos de recuperação definitiva. Alguns animais podem apresentar períodos de recuperação temporária natural ou após o tratamento com drogas tripanocidas (BATISTA et al. 2007; BATISTA et al. 2008; DA SILVA, 2009).

Em 2002, no foco relatado por Batista et al. (2007) em bovinos na Paraíba, nove vacas apresentaram sinais neurológicos de incoordenação, hipermetria, tremores musculares, fasciculações, opistótonos, cegueira e estrabismo. Todas morreram, sendo que seis destas apresentaram um período de recuperação seguido de retorno dos sinais neurológicos e morte.

No Rio Grande do Sul, um registro de infecção em uma novilha com cinco meses de prenhez, revelou que o animal apresentou, além de hipertermia e fraqueza, sinais neurológicos de agressividade, atrofia muscular dos membros pélvicos, incoordenação motora e “posição de cão sentado” com dificuldade para levantar-se. A novilha apresentou melhora clínica transitória durante a prenhez, ausência de parasitemia e aos nove meses pariu um bezerro fraco que morreu dois dias após o parto; após o qual, a novilha voltou a apresentar hipertermia, fraqueza muscular e retorno da parasitemia, revelado por esfregaços sanguíneos (DA SILVA, 2009).

No primeiro relato de tripanossomíase por *T. vivax* em um rebanho em São Paulo, três vacas em lactação apresentaram sinais de dismetria, ataxia, fraqueza muscular e ptialismo (CADIOLI et al., 2012).

A ocorrência de abortos, mortalidade perinatal e repetição de cio em rebanhos bovinos infectados por *T. vivax* foram amplamente relatados nos estudos, tanto em regiões endêmicas, como nos surtos em regiões não endêmicas, e sugere que a tripanossomíase em bovinos deve ser considerada uma enfermidade que causa alterações reprodutivas (SILVA et al., 2004; ; BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008; DA SILVA, 2009; PIMENTEL et al., 2012; VIEIRA et al., 2017; LOPES et al. 2018).

Em bovinos machos, patologias reprodutivas ocasionadas por *T. vivax* estão especialmente ligadas a lesões do testículo e epidídimo. Nos casos crônicos, infertilidade ou mesmo esterilidade estão presentes (SEKONI et al., 1990; BEZERRA et al., 2008).

Galiza et al. (2011) relataram um surto de tripanossomíase por *T. vivax* em ovinos de produção de lã, no sertão do semiárido do estado da Paraíba, onde, de 306 ovelhas, 240 adoeceram e 216 morreram. Os sinais clínicos incluíram anorexia, letargia, anemia, pelagem áspera, perda de peso, edema submandibular, aborto e sinais neurológicos.

2.10 Patologia Clínica

Na fase aguda da infecção em bovinos, os parasitos circulam na corrente sanguínea e provocam anemia significativa, com redução acentuada no número de hemácias, diminuição na quantidade de hemoglobina e do volume globular, além de leucopenia, hipoglicemia e aumento na atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST). Trombocitopenia e redução do nível de fibrinogênio também são achados comuns em animais que se encontram na fase aguda da infecção (RIET – CORREA et al., 2007; VALI et al., 2015; FIDELIS JR et al., 2016).

A anemia é a alteração hematológica mais frequente e é relatada em bovinos infectados naturalmente ou experimentalmente por *T. vivax*, sobretudo na fase aguda (BATISTA et al., 2006; BATISTA et al., 2008, CADIOLI et al., 2012; LOPES et al. 2018).

A anemia normocítica normocrômica em bovinos foi relatada em alguns estudos (LOPES et al. 2018). Germano et al. (2017) detectou anemia microcítica e normocrômica.

Os valores de volume globular médio em animais na fase aguda da enfermidade podem variar de 16% a 20%, segundo Batista et al. (2007).

Em casos de anemia grave e severa, a leucopenia normalmente acompanha a anemia, principalmente na fase inicial da doença (BATISTA et al., 2008).

Alterações na bioquímica sérica em animais com infecção por *T. vivax* foram estudadas por diversos autores. No estudo experimental de Schenk et al. (2001), os valores de aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), creatinafosfoquinase (CK), ureia, creatinina, cálcio e fósforo tiveram aumento, mas permaneceram na faixa de normalidade para a espécie bovina, não sendo detectadas alterações que evidenciassem disfunção hepática e renal. Os valores de proteínas séricas totais e da albumina diminuíram a partir do 4º e 8º dias após inoculação e a gamaglobulina apresentou aumento em seus valores após o 12º dia. Esses resultados foram relacionados, pelo autor, ao estímulo antigênico desencadeado pelo parasito.

Germano et al. (2017) observaram aumento sérico de fosfatase alcalina e GGT, enquanto que as proteínas totais se mostraram diminuídas, sugerindo algum tipo de comprometimento hepático, segundo os autores. Batista et al. (2007) também sugerem a possibilidade de lesão hepática, mas atribuem a lesão à alta atividade sérica de AST, a qual provavelmente seria provocada pela anemia.

As funções hepáticas, renais e a atividade enzimática muscular não foram afetadas pela infecção por *T. vivax* no estudo do foco em Sergipe. Porém, foi observado aumento dos níveis de proteínas totais e globulinas e, concomitantemente, redução na albumina (LOPES et al., 2018).

Na bioquímica sérica de bovinos foram reveladas diminuição da glicose sanguínea e aumento dos parâmetros indicadores de função renal (ureia e creatinina) e hepática (FA, TGO e TGP), além da inversão da relação albumina-globulina. A diminuição da albumina sérica com manutenção dos níveis de proteína total podem ocorrer na tripanossomíase, devido ao incremento da fração gamaglobulina (LOPES et al., 2018).

Anemia, leucopenia, hipoglicemia e aumento da atividade sérica da AST foram achados durante a fase de alta parasitemia no foco estudado em bovinos por Batista et al. (2007).

Na fase crônica podem ocorrer diminuição ou ausência da parasitemia e redução ou ausência de anemia (SILVA et al., 1997; BATISTA et al., 2006; VALI et al., 2015).

2.11 Perdas Econômicas

Os sinais reprodutivos são relatados como principais causas de perdas econômicas em rebanhos infectados com *T. vivax* (SILVA et al., 2004).

As tripanossomíases nos animais são um dos principais obstáculos para o desenvolvimento da pecuária em regiões da África (mais de 10 milhões por km²) onde existe a presença *T. vivax*, e onde 50 milhões de cabeças de gado estão expostos à infecção. As desordens reprodutivas como aborto, anestro temporário ou permanente, ciclos estrais anormais e redução da fertilidade do rebanho são os principais sinais relatados ocasionando perdas econômicas (SEKONI et al, 1994; DESQUENES, 2004; SILVA et al. 2004).

No Brasil, o Pantanal representa uma importante área de produção pecuária, com uma população bovina elevada, o que fez com que a tripanossomíase se estabelecesse e assumisse importância econômica (SILVA et al., 2004).

Apesar das perdas econômicas causadas por *T. vivax* na América Latina, principalmente no Brasil, ainda não terem sido bem estimadas até a presente data, sabe-se que surtos de *T. vivax* causam perdas econômicas expressivas em rebanhos bovinos leiteiros,

relacionadas principalmente com a mortalidade de animais adultos, abortos e redução de produção de leite (ABRÃO et al., 2009).

2.12 Alterações anatomopatológicas macroscópica

De uma forma geral, as alterações macroscópicas nas infecções por *T. vivax* não são significativas, podendo se observar aumento de linfonodos, baço com polpa branca proeminente e, em casos de animais com sinais neurológicos, espessamento das meninges (RIET-CORREA, 2007).

Nas necropsias realizadas nos estudos de Batista et al. (2007), Batista et al. (2008), Galiza et al. (2011) e Germano et al. (2018), as alterações macroscópicas relatadas em bovinos e ovinos foram edema na região da barbela, palidez de carcaça e tecidos, espessamento das meninges, linfadenomegalia, baço com polpa branca proeminente e cápsula espessa, hemorragias petequiais e equimóticas no epicárdio. Nos rins foram verificadas hemorragia de cápsula renal e ausência da proporção cortical/medular, sugerindo nefrite intersticial multifocal.

Outros achados menos frequentes relatados foram aderências e presença de fibrina no pericárdio; pulmões com aderências, parênquima colabado e com fibrose, sugestivo de pleuropneumonia (GERMANO et al., 2017) e presença de líquido na cavidade peritoneal e saco pericárdico (GALIZA et al., 2011).

No estudo de infecção experimental realizado por Batista et al. (2006), todos os ovinos do grupo dos infectados apresentaram palidez da carcaça, aumento generalizado dos linfonodos, aumento de volume do baço com acentuação da polpa branca e acúmulo de discreta quantidade de líquido amarelo citrino nas cavidades peritoneal e pericárdica.

No Quênia, Gardiner (1989), após inoculação experimental em bovinos, de um isolado africano de *T. vivax*, relatou a ocorrência de uma síndrome hemorrágica severa em que os animais apresentaram anemia profunda, hemorragias petequiais e equimóticas generalizadas (nas superfícies serosas do pericárdio, serosas das cavidades torácica e abdominal, pulmões, baço, fígado, rins, bexiga e vesícula biliar) e particularmente mais graves no trato gastrointestinal e no coração, onde afetou o epicárdio, miocárdio e endocárdio de ambos os átrios e ventrículos.

2.13 Alterações histológicas

Nos estudos histológicos relatados em focos naturais e experimentais de infecção por *T. vivax*, as lesões mais significativas foram encontradas no sistema nervoso central, e foram caracterizadas por meningoencefalite com áreas de malácia, e no coração miocardite não supurativa (BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008; Da SILVA et al., 2009; GALIZA et al., 2011).

No estudo de um foco no semiárido da Paraíba, em 2002, as vacas que morreram com sinais neurológicos apresentaram lesões de meningite, meningoencefalite, meningoencefalomielite e malácia. A meningite foi encontrada no córtex parietal, temporal, cerebelo, ponte e medula espinhal. A encefalite afetou os núcleos basais do tálamo e cápsula interna, e o corpo geniculado. Lesões difusas de malácia foram observadas na substância branca cerebelar com neuropilo vacuolizado pálido, associado com pequenas quantidades de células de gitter, linfócitos e esferoides axonais distribuídos dentro do parênquima. Na medula espinhal, foram verificadas mielite com células inflamatórias perivasculares, principalmente na substância cinzenta cervical, e lesões inflamatórias menos graves na substância branca (BATISTA et al., 2007).

Lesões semelhantes com predominância de meningoencefalite foram relatadas em bovinos por Batista et al. (2008) em três focos subsequentes na Paraíba. A meningite foi

caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, plasmócitos e células morulares (células de Mott) e macrófagos, por vezes contendo hemossiderina, nas meninges das regiões do córtex parietal, temporal e cerebelo. A encefalite foi evidenciada por infiltrados perivasculares (de até 14 camadas de células) compostos principalmente de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, sendo que os infiltrados envolveram um maior número de vasos na substância branca do tálamo, cápsula interna e pedúnculo cerebelar. A encefalite também foi observada no telencéfalo, na altura dos lobos parietal, temporal e occipital, porém em menor intensidade. Neste estudo não foram observadas lesões de malácia.

No estudo histológico realizado por Batista et al. (2006), os ovinos infectados apresentaram hiperplasia da polpa branca do baço, leve nefrite intersticial, linfadenite eosinofílica e miocardite caracterizada por extensos infiltrados multifocais de células mononucleares ou pequenos focos de células mononucleares no interstício do tecido cardíaco.

As lesões histológicas relatadas por Galiza et al. (2011) no surto natural em ovinos, na região do semiárido da Paraíba, foram miocardite multifocal com infiltrados de células mononucleares constituídos por linfócitos e plasmócitos, hiperplasia moderada da polpa branca do baço e infiltrados mononucleares moderados nos espaços porta, com poucas células Mott nos tecidos hepáticos. No sistema nervoso central havia meningoencefalite supurativa com acentuado infiltrado inflamatório mononuclear perivascular, composto de linfócitos e plasmócitos, e malácia na substância branca. As lesões foram mais acentuadas no córtex frontal e nos núcleos basais do cérebro.

Na síndrome hemorrágica estudada em bovinos por Gardiner (1989) no Quênia, os achados histológicos confirmaram os achados macroscópicos de congestão grave, hemorragia e alterações degenerativas na maioria dos tecidos e órgãos. Adicionalmente, coágulos de fibrina foram encontrados nos exsudatos e nos ventrículos do cérebro e trombos nos vasos linfáticos. Marcada infiltração celular intersticial por linfócitos, plasmócitos e macrófagos foi achado característico em diversos órgãos, mas particularmente no coração, músculos esqueléticos, fígado, rins e plexo coroide. Observou-se uma meningoencefalite leve, com leve infiltrado celular mononuclear difuso em todo o cérebro, mas particularmente no tronco cerebral onde eram encontradas áreas focais de gliose. Os linfonodos apresentaram-se com aumento no número de folículos linfocitários, muitos dos quais continham centros germinais evidentes e cordões medulares distendidos com plasmócitos e macrófagos nos seios.

2.14 Diagnóstico

O diagnóstico específico de tripanossomíases é relativamente difícil. Não somente porque os sinais clínicos são inespecíficos, mas porque a parasitemia intermitente e frequentemente baixa faz com que a detecção do parasito nem sempre ocorra com facilidade. Além disso, a infecção pode existir sem a manifestação clínica, de modo que animais com infecção subclínica vivem em equilíbrio, mesmo com a presença de tripanosomas patogênicos. A presença de um ou mais sinais clínicos constitui elemento necessário para se realizar o diagnóstico laboratorial (CONNOR; BOSSCHE, 2005).

2.14.1 Diagnóstico parasitológico

Vários métodos parasitológicos têm sido usados para o diagnóstico de tripanossomíases. Dentre eles, os principais são: técnica da gota espessa, técnica do esfregaço, técnica Woo do microhematócrito (*Buffy Coat*), método do “aspirado” de linfonodo e inoculação em camundongo. As amostras utilizadas para execução destes métodos podem ser de sangue fresco, fluido de linfonodos, fluido cérebro espinhal, esfregaço de órgãos e secreções genitais (para diagnóstico de *T. equiperdum*). Os métodos parasitológicos propiciam a visualização das formas sanguíneas dos parasitos e suas principais características

em microscópico ótico, determinando com precisão o diagnóstico de gênero (RADOSTITIS et al., 2000; SILVA et al., 2003; DESQUENES, 2004).

O diagnóstico das espécies é realizado através de diferenças na forma, no posicionamento do núcleo e do kinetoplasto, no grau do desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo e através da morfometria (HOARE, 1972; D'ÁVILA et al., 1997; CUGLOVICI et al., 2010).

Além do comprimento total, os índices para medidas biométricas são utilizados para auxiliar na diferenciação das espécies. O índice nuclear (NI) e o índice kinetoplástico (KI) definem a posição do núcleo e do kinetoplasto. O NI representa a razão da distância do final da extremidade posterior para o núcleo e do núcleo para o final da extremidade anterior (PN/NA). Quando o NI=1, o núcleo está no meio do corpo, quando é <1, está na metade posterior e quando é >1, está na metade anterior. O KI se obtém dividindo-se a distância desde o final da extremidade posterior ao núcleo (PN) pela distância desde o kinetoplasto ao núcleo (KN). Se o KI é menor que 2, o kinetoplasto está no meio dos dois, e se é maior que 2 o kinetoplasto está próximo (SILVA et al., 2003).

No estudo morfológico feito por Guerra et al. (2008), em bezerros no Maranhão, em 100% dos tripanosomas o kinetoplasto (K) estava localizado entre a extremidade posterior e o núcleo, e em 54% apresentavam núcleos localizados perto da extremidade anterior (NI > 1); 44% na extremidade posterior (NI < 1) e 2% na região mediana.

Nos últimos focos diagnosticados em vacas leiteiras no estado de Minas Gerais, todos os tripanosomas observados foram identificados como *T. vivax* (CUGLOVICE et al., 2010).

Dentre as amostras de fluido corpóreo, o sangue é o mais utilizado, e pode ser coletado de veias, como a jugular, ou de vasos capilares como os localizados na ponta da orelha. Em rebanhos bovinos, amostras de sangue coletadas diretamente da veia jugular ou da veia coccígea, utilizando-se tubos contendo anticoagulantes, representam um material de fácil obtenção e frequentemente utilizado para esta finalidade (DESQUENES, 2004; CONNOR; BOSSCHE, 2005;).

Para realizar o método da gota espessa, coloca-se uma pequena gota de sangue entre lâmina e lamínula e procede-se a visualização diretamente em microscópio óptico, com objetiva de 100. Nas amostras de sangue fresco, *T. vivax* apresenta movimentos muito vivos, e atravessam o campo visual do microscópio de maneira característica. Apesar da baixa sensibilidade desse método, ele permite, algumas vezes, que os parasitos sejam identificados com base em critérios morfológicos e de motilidade (RADOSTITIS et al., 2000; SILVA et al., 2003; DESQUENES, 2004).

Para o método do esfregaço sanguíneo são recomendáveis esfregaços de camada fina, pois facilitam a leitura ao apresentarem células mais dispersas. Após secagem, realiza-se a fixação com metanol, coloração com Giemsa e visualização em microscópio óptico, com objetiva de 100. Os tripanosomas são identificados com base em características morfológicas e morfométricas (SILVA et al., 2003; DESQUENES, 2004).

O método do microhematócrito, também chamado de Método de Woo, é realizado com material obtido após centrifugação da amostra de sangue para se obter a capa leucocitária. Monta-se uma lâmina quebrando-se o capilar na parte onde se separa a parte líquida com a parte celular, colocando-se assim uma ou duas gotas deste material numa lâmina e fazendo-se o esfregaço para posterior coloração e visualização, conforme descrito para o método do esfregaço sanguíneo (HOARE, 1972; SILVA et al., 2003).

O método do aspirado de linfonodo consiste em se fazer um esfregaço com o líquido extraído de um linfonodo. Com o auxílio de uma seringa e agulha, injeta-se 1 mL de soro fisiológico estéril no linfonodo, até a metade do seu comprimento. Logo após a introdução, o soro é retirado obtendo-se um líquido misturado com sangue com o qual são separados esfregaços grossos, que serão fixados com álcool metílico, corados com Giemsa e procede-se

a visualização em microscópio óptico. Em bovinos, o linfonodo mais fácil de manipular é o pré-escapular (SILVA et al., 2003).

O diagnóstico parasitológico é o mais utilizado no país para o diagnóstico das infecções por *T. vivax* em rebanhos de bovinos. Baseando-se em dados da literatura, o método do microhematócrito, com esfregaço feito da capa leucocitária, é considerado o método parasitológico mais sensível, mais empregado com boa confiabilidade e mais recomendado para o diagnóstico a campo (HOARE, 1972; SILVA et al., 2003; MADRUGA, 2004; ABRÃO et al., 2009).

Em diversos relatos de infecção por *T. vivax* em rebanhos bovinos no Brasil, o diagnóstico parasitológico foi realizado através do método da capa leucocitária (BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008).

Em bovinos clinicamente afetados que apresentaram anemia durante um surto, a sensibilidade parasitológica foi significativa, com detecção de quantidade elevada de parasitos pelo exame da capa leucocitária (BATISTA et al., 2007).

Os métodos parasitológicos são muito específicos, mas de sensibilidade relativamente baixa, principalmente quando estes métodos são considerados para um animal individualmente e não para o rebanho. A sensibilidade é menor na fase crônica do que na fase aguda, dependendo do nível de parasitemia. Como consequência, a prevalência aparente de tripanossomíase determinada pelos métodos parasitológicos é subestimada quando em relação à prevalência real, o que pode ser um problema em áreas de baixa prevalência ou de ocorrência sazonal, ou ao quando se pretende descartar a ocorrência da doença numa área ou em um rebanho em particular (CONNOR & BOSSCHE, 2005; MADRUGA et al., 2006).

Independentemente do método parasitológico utilizado, outros indicadores úteis para o diagnóstico (características morfológicas e índices biométricos) deverão ser sempre utilizados para a comprovação da espécie do parasito (HOARE, 1972; SILVA et al., 2003).

2.14.2 Diagnóstico molecular

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é o método mais sensível para detectar a presença dos tripanosomas em tecidos, principalmente na fase crônica da enfermidade, quando eles estão presentes no organismo em pequenas quantidades. Essa ferramenta representa uma alternativa de diagnóstico direto que tem sensibilidade consideravelmente superior ao exame parasitológico. Por essa razão, várias técnicas de PCRs para o diagnóstico desse hemoprotozoário foram desenvolvidas e avaliadas nos últimos anos (D'ÁVILA et al., 1997; MADRUGA, 2004).

A detecção de um segmento de DNA específico fornece um diagnóstico de espécies em infecções ativas por tripanosomas; *primers* sensíveis e específicos foram descritos para os principais tripanosomas patogênicos para mamíferos (DESQUENES, 2004).

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para diagnóstico de infecção por *T. vivax*. Em uma delas, descrita por Pereira (2002), foram utilizados *primers* baseados na sequência do gene que codifica proteína de transporte da glicose (PCR/GTP). Outra técnica utiliza *primers* da sequência do gene que expressa um antígeno solúvel, conservado em todos os isolados de *T. vivax*, inclusive de isolados brasileiros analisados até o presente (MADRUGA et al., 2006; MASAKE et al., 1997).

Geysen et al. (2003) descrevem uma técnica de PCR cujos *primers* foram desenhados com base no gene que expressa a subunidade ribossomal menor 18S, com capacidade para ampliar todas as espécies, utilizando-se os mesmos pares de *primers*. A vantagem deste ensaio é a sua sensibilidade, a sua aplicabilidade universal e as inúmeras possibilidades de análises enzimáticas restritas da região amplificada, dependendo da espécie do tripanosoma, possibilitando a diferenciação de espécies de tripanosomas mais importantes para bovinos.

2.14.3 Diagnóstico sorológico

Os métodos sorológicos se baseiam na detecção de anticorpos após um quadro de infecção. Eles apresentam algumas limitações na sua utilização como diagnóstico das tripanossomíases, principalmente devido à sua incapacidade em estabelecer se a infecção está ativa ou se ocorreu no passado. Após o tratamento ou autocura, os anticorpos podem permanecer por mais de um ano, o que dificulta saber se se trata de uma nova infecção ou se são anticorpos residuais de uma infecção passada e já curada. Além disso, antígenos compartilhados pelos tripanossomos são comuns e a detecção de anticorpos não é, portanto, considerada específica da espécie (SILVA et al., 2002; DESQUENES, 2004).

Apesar destas limitações, os estudos sorológicos constituem uma ferramenta epidemiológica valiosa para avaliar a prevalência de infecções em regiões e para acompanhar a tripanossomíase em fazendas afetadas ou em estudos experimentais (DESQUENES, 2004; GALIZA et al 2011).

O teste de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA) com antígeno solúvel de isolado de *T. vivax* foi utilizado na região de Poconé, no estado de Mato Grosso. Essa prova sorológica permitiu avaliações epidemiológicas preliminares da distribuição do parasito em bovinos no Pantanal do estado de Mato Grosso (PAIVA et al., 2000).

Em um estudo feito por Batista et al. (2007), em um surto em bovinos no semirário no estado da Paraíba, a presença de anticorpos em animais assintomáticos foi detectado por ELISA, empregando um extrato de *T. vivax* como antígeno. Neste caso, a titulação foi utilizada para monitorar a duração da enfermidade no rebanho e para detectar animais assintomáticos.

No estudo experimental com bovinos, de Schenk et al. (2001), o teste de Elisa foi utilizado para detectar os anticorpos produzidos após a infecção e a soroconversão ocorreu a partir do 6º e 8º dias. O mesmo teste foi diariamente realizado e permitiu a identificação de animais soropositivos durante os 30 dias do experimento.

O estudo de prevalência em bovinos realizado por Guerra et al. (2013) em Pernambuco, utilizou a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o resultado foi semelhante ou superior às prevalências encontradas em outras regiões e países endêmicos (CONNOR; BOSSCHE, 2005), o que permitiu sugerir que o estado de Pernambuco seja área endêmica para infecção por *T. vivax*.

2.15 Tratamento e Profilaxia

A quimioterapia utilizada para o controle das tripanossomíases consiste no uso de drogas tripanocidas que podem ser usadas como preventivas ou curativas. A diferença entre prevenção e cura depende da droga e/ou da dosagem que está sendo administrada. Algumas drogas são armazenadas nos tecidos e por uma lenta liberação na corrente circulatória mantêm a concentração do composto ativo suficiente para controlar os tripanosomas. O tratamento quimioterápico curativo deve ser feito quando a incidência é baixa e quando somente poucos casos ocorrem em um rebanho durante o período de um ano. O tratamento preventivo é requerido quando o gado está sob constante risco e quando a enfermidade ocorre em um alto nível durante o ano (PEREGRINE et al, 1993; SILVA et al., 2004).

As drogas primariamente utilizadas para o tratamento e profilaxia da tripanossomose causada por *T. vivax* em bovinos, ovinos e caprinos são o dimenazene, homidium e isometamidium (SILVA et al., 2004).

O aceturato de diminazene é uma diamidina aromática, comercializada em combinação com antipirina, que é um estabilizador que prolonga a atividade do composto em solução. É uma droga utilizada somente para tratamentos curativos, nas dosagens de 3,5 a 5 mg/kg de peso vivo. Até agosto de 2016, era a única droga disponível e comercializada, para o tratamento de rebanhos no Brasil (SILVA et al., 2004).

Em alguns estudos de focos no Brasil, o diminazene apresentou eficácia. Na Paraíba, alguns animais infectados do surto estudado por Batista et al. (2007) foram tratados e após dois anos a doença estava ausente e *T. vivax* aparentemente eliminado do rebanho. Experimentos realizados com diminazene demonstraram uma atividade alta contra ambos *Trypanosoma* e *Babesia* spp (SILVA et al., 2004).

A recidiva de sinais clínicos após o tratamento com diminazene em bovinos que apresentaram sinais neurológicos foi relatada em estudos de focos de infecção por *T. vivax* (CADIOLI et al., 2012; BATISTA et al., 2007). Bezerros também apresentaram recidiva clínica e morte após o tratamento com diminazene (BATISTA et al., 2007; GERMANO et al., 2017).

Em um estudo de foco em São Paulo, em uma propriedade do município de Lins, a cepa de *T. vivax* se mostrou resistente ao tratamento com aceturato de diaminazene e a infecção se disseminou rapidamente no rebanho (CADIOLI et al., 2012).

O isometamidium (cloreto de isometamidium) é uma amidina aromática da fenantridina com atividade profilática e terapêutica. A dosagem recomendada para fins profiláticos é de 0,5 a 1mg/kg e a curativa varia de 0,25 a 0,5 mg/kg. Para a profilaxia, o cloreto de isometamidium deve ser administrado com intervalos de três a quatro meses o que corresponde a três ou quatro aplicações por ano (SILVA et al., 2004). O composto tem sido usado com sucesso para manter a produtividade do gado zebu exposto ao desafio com a mosca tsé-tsé no leste da África (DESQUENES, 2004).

No estudo realizado por Batista et al. (2007), no surto da Paraíba, o tratamento de animais clinicamente afetados com isometamidium apresentou recuperação de valores hematológicos dos animais após 4 meses (DESQUENES, 2004; SILVA et al., 2004).

No foco relatado em São Paulo por Cadioli et al. (2012), após o tratamento com duas doses de 1 mg/kg do cloreto de isometamídio, com intervalos de quatro meses entre as aplicações, e depois que medidas de controle contra as moscas foram executadas, nenhum novo caso de infecção por *T. vivax* foi observado na fazenda após seis meses do fim do tratamento (DESQUENES, 2004)

Os parasitos, durante localização em células nervosas, líquido cefalorraquidiano e humor aquoso, estão protegidos contra drogas tripanocidas (BATISTA et al., 2007).

O controle populacional de artrópodes vetores é preconizado como método de profilaxia de infecções por *T. vivax*. O controle químico dos vetores pode ser realizado com drogas *pour on* e armadilhas impregnadas com inseticidas (PEREGRINE et al., 1993; SILVA et al., 2004).

O controle químico nos animais pode ser feito com a utilização de produtos ectoparasiticidas organofosforados (exemplos: clorpirifós, diclorvós, diazinon, entre outros), associados ou não aos piretroides (exemplos: cipermetrina, deltametrina, entre outros), administrados pela via *pour on* e pulverização. As administrações de inseticidas à base de organofosforados e piretroides, na forma de aerossol/pulverização dentro e em volta dos estábulos e das instalações rurais proporcionam bom controle local (DESQUENES, 2004; SILVA et al., 2004).

Os métodos de manejo e higiene ambiental são fundamentais para reduzir as infestações por moscas e se baseiam na remoção da fonte onde elas se proliferam. Em propriedades rurais com criação de bovinos, o manejo ambiental consiste basicamente em destinação adequada de resíduos orgânicos e do manejo de esterqueiras, que funcionam como potenciais criadouros para as moscas. A remoção de resíduos alimentares dos cochos, currais, estábulos e de qualquer outro local que possa acumular matéria orgânica também são medidas fundamentais. Restos de culturas, gramas cortadas, como feno e palhas úmidos, dentre outros, não devem ser acumulados, pois a fermentação transforma-os em importantes focos de reprodução para as moscas (DESQUENES, 2004; SILVA et al., 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e Descrição do Estudo

Neste estudo foram identificados 16 focos de tripanossomíase em bovinos, em 13 municípios do estado do Rio de Janeiro. Destes, 12 foram estudados entre fevereiro de 2016 e fevereiro de 2018, com acompanhamento por visitas, coleta de material para diagnóstico e estudos epidemiológicos, clínicos e patológicos. Os outros quatro focos foram identificados entre março e outubro de 2018, através de materiais enviados para diagnóstico apenas por PCR.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ (CEUA/UFRRJ) sob o protocolo 5931200217 e autorizado pelos responsáveis pelas propriedades através do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), Anexo I.

3.2 Estudo dos 12 Focos

Os 12 focos estudados entre fevereiro de 2016 e fevereiro de 2018 localizavam-se em 11 municípios distintos. Os focos foram identificadas em ordem alfabética (A a L) de acordo com o aparecimento dos focos (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação dos focos e número de animais estudados.

Focos	Identificação	Número de animais estudados
Piraí	A	14
Areal	B	93
Valença	C	6
Valença	D	5
Vassouras	E	21
Santo Antônio de Pádua	F	70
Rio Claro	G	14
Cantagalo	H	8
Barra do Piraí	I	9
Paraíba do Sul	J	17
Barra Mansa	K	18
Rio das Flores	L	5
TOTAL	-	280

As propriedades eram de aptidão leiteira, de média a alta produção, compostas por bovinos mestiços ou das raças Gir, Holandês e Girolando.

O critério de inclusão das propriedades foi através de: 1) notificação feita por Médicos Veterinários de propriedades já com diagnóstico recente, através de exames parasitológicos, de infecção por *Trypanosoma sp* (propriedades dos municípios de Areal e Vassouras); 2) propriedades sem diagnóstico anterior, mas com presença de animais com sinais clínicos suspeitos de infecção por *T. vivax* (demais focos).

Por intermédio de informações concedidas por Médicos Veterinários, proprietários e/ou funcionários ligados às propriedades-focos, foram obtidos históricos, dados epidemiológicos e todas as informações de manejo, produção e ocorrências de relevância relativas a cada propriedade. Estas informações relatadas e os sinais clínicos observados durante as visitas foram registrados em questionário padronizado (Anexo II) elaborado especificamente para a realização do estudo.

O número de animais estudados em cada foco correspondeu à quantidade de animais que tiveram algum tipo de material para diagnóstico e variou em função do número de

animais afetados; da quantidade de animais que eram disponibilizados para exame clínico, da coleta de material nos dias das visitas e de animais necropsiados com coleta de material.

As amostras biológicas foram coletadas para diagnóstico laboratorial por meio de exames parasitológicos, moleculares, necropsias e exames histopatológicos (Tabela 2).

Tabela 2: Número total de amostras coletadas para diagnóstico laboratorial

Focos	Amostras de sangue total	Necropsias com coleta de amostras de tecidos	Total de amostras coletadas
A	13	1	14
B	89	6	95
C	6	0	6
D	5	0	5
E	21	0	21
F	70	1	71
G	13	2	15
H	8	0	8
I	9	0	9
J	17	0	17
K	17	1	18
L	4	1	5
TOTAL	272	12	284

3.3 Diagnóstico Parasitológico e Morfometria

O diagnóstico parasitológico foi realizado em 266 amostras de sangue total coletadas, provenientes de bovinos dos 12 focos estudados entre fevereiro de 2016 e fevereiro de 2018. Após a contenção dos animais em bretes, foram coletados 3 a 5 ml de sangue total, obtido através da punção da veia mamária ou coccígea. A coleta foi realizada por meio do sistema *vacutainer*, com agulhas de 25x0,8 mm, após a devida higienização do local da venopunção. As amostras foram identificadas, armazenadas em tubos contendo 10% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), acondicionadas em isopor com gelo reciclável e encaminhadas para o Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV) da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz (E.E.P.P. W.O. Neitz) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

A técnica utilizada foi a do esfregaço obtido da capa leucocitária após centrifugação das amostras de sangue. Após a secagem das lâminas de esfregaço, estas foram fixadas em metanol 100% durante 10 minutos. As lâminas foram coradas em Giemsa (1/10) durante 40 minutos em mesa agitadora; ao final deste tempo foram rinsadas com água corrente e colocadas para secar. A leitura das lâminas foi realizada pela mesma pessoa durante aproximadamente 11 minutos (em microscópio Nikon E20, obj. 100) para determinar ou não a positividade das amostras analisadas através observação morfológica das formas tripomastigotas.

Com o objetivo de confirmar a espécie foi realizada a morfometria em três amostras (lâminas) de esfregaço sanguíneo positivas, provenientes de três focos relativas ao ano de 2016 (A, B e E) e comparadas com as medidas obtidas por Carvalho et al. (2007), nos focos de Minas Gerais. A partir daí, não foi considerada necessária a realização da morfometria nos parasitos diagnosticados nos outros focos seguintes a estes, pois os aspectos epidemiológicos relativos à espécie afetada, origem da infecção, evolução e sinais clínicos eram semelhantes. Para cada lâmina analisada, observaram-se em microscópio óptico (Olympus BX51®), com objetiva de 100, escala de 20µ, no mínimo 30 formas tripomastigotas, onde se aferiu os seguintes parâmetros: tamanho total do parasito (L), posterior ao kinetoplasto (PK), posterior

ao núcleo (PN), kinetoplasto ao núcleo (KN), núcleo à porção anterior (NA) e tamanho do flagelo livre (F), segundo metodologia utilizada por Cuglovici et al. (2010).

3.4 Diagnóstico Molecular em Amostras de Sangue Total

O diagnóstico molecular foi realizado em 246 das amostras de sangue total coletadas nas propriedades, como descrito, e foram provenientes de bovinos de 11 dos 12 focos estudados. No foco E não houve coleta e envio de amostras de sangue total para diagnóstico molecular.

A extração de DNA e a reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) foram realizadas no LHV/UFRRJ.

3.4.1 Extração de DNA total em amostras de sangue

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada utilizando-se o Kit de purificação do material genômico de DNA Wizard® (Promega, Madison, WI, USA), conforme protocolo do fabricante. Esta etapa foi realizada a partir de 300 µL de cada amostra de sangue. As amostras de DNA obtidas foram ressuspendidas em 100µL de tampão AE (do próprio kit), e quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA). As amostras de DNA foram separadas em alíquotas, de forma que cada uma sofresse degelo poucas vezes, garantindo a integridade do DNA e a confiabilidade da técnica, e armazenadas a -80°C, até o momento da utilização.

3.4.2 Reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) e sequenciamento

A reação em cadeia de polimerase convencional (cPCR) foi realizada nas amostras de DNA extraídos, para confirmação do diagnóstico parasitológico e utilizado em amostras negativas ao diagnóstico parasitológico.

O DNA extraído foi submetido à cPCR para detecção dos genes *18S rRNA* de *Trypanosoma vivax*. As reações foram realizadas utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 18STnF2 (5'-CAA CGA TGA CAC CCA TGA ATT GGG GA-3') e o iniciador reverso 18STnR3 (5'-TGC TCG ACC AAT AAT TGC AATAC-3'), com aproximadamente 780 pb (GEYSEN et al., 2003). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de Agarose a 1,5%. A corrida eletroforética foi de 60 minutos a 100 volts (5V/cm); em seguida, os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação em equipamento L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia®).

3.4.3 Sequenciamento de nucleotídeos.

Cinco amostras positivas foram sequenciadas: uma do foco de Piráí (A), duas do foco de Areal (B), uma do foco de Santo Antônio de Pádua (F) e uma do foco de Rio Claro (G). Para o sequenciamento, os produtos da amplificação das PCRs foram purificados com ExoSap-IT (USB Corporation®) e o sequenciador automático de DNA modelo ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Perkin Elmer) determinou suas sequências, conforme instrução do fabricante. Em seguida, as sequências foram comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank.

3.5 Diagnóstico molecular em amostras de tecido

O diagnóstico molecular foi realizado em amostras de tecido (coração, baço e sistema nervoso central) de sete animais, coletadas durante as necropsias (focos A, B, F e L). Estas amostras também foram encaminhadas para estudo histológico e receberam identificação de

acordo com o número registrado no Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ: 33206, 33751, 33811, 34985, 34976, 34671, 33284.

Os fragmentos foram acondicionados em frascos estéreis, armazenados congelados em freezer -80° no Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) do Instituto de Veterinária da UFRRJ, onde foi realizada a extração de DNA e diagnóstico molecular.

3.5.1 Extração de DNA total em amostras de tecido

Para a extração de DNA utilizou-se o Kit de purificação de material genômico de DNA Purelink® (Invitrogen). Esta etapa foi realizada a partir de 25 mg de cada tecido, e conforme protocolo do fabricante. As amostras de DNA obtidas foram ressuspensas em 100µL de tampão AE, e quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA). As amostras de DNA foram separadas em alíquotas, de forma que cada uma sofresse degelo poucas vezes, garantindo a integridade do DNA e a confiabilidade da técnica, e armazenadas a -80°C, até o momento da utilização.

Tanto a extração de DNA, quanto o preparo das reações e a pipetagem das amostras foram realizadas em ambientes separados, evitando-se a ocorrência de contaminação. Além disso, ponteiras com filtro foram utilizadas em todas as etapas do processo.

3.5.2 Reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR)

A reação em cadeia de polimerase convencional (cPCR) realizada nas amostras de tecido seguiram o protocolo utilizado por Fikru et al (2014).

3.6 Análise Estatística

Para análise estatística da comparação da morfometria foi utilizado o programa Biostat® com nível de significância de 5%, para as mensurações, média e desvio padrão dos parâmetros de morfometria.

Para comparação das diferenças entre o diagnóstico parasitológico (pesquisa de hemoparasito em esfregaço sanguíneo) com o molecular (cPCR) quanto à detecção de amostras positivas, foi utilizado o programa McNemar que proporciona a discordância significativa entre os testes, com nível de significância de 0,5.

3.7 Necropsias

Foram realizadas 12 necropsias em bovinos oriundos de seis propriedades. As amostras coletadas foram identificadas por animal, com o número de registro utilizado pelo SAP/UFRRJ. Dos animais 34985-Areal (B), 34976-Piraí (A), 33305-Rio Claro (G) e 34671-Rio das Flores (L) a necropsia, coleta e envio de material foram realizados pelo Veterinário. As demais necropsias - 33204, 33206, 33228, 33751, 33811-Areal (B), 33424-Rio Claro (G), 33284- Santo Antônio de Pádua (F) e 34163 – Barra Mansa (K) - foram realizadas durante as visitas.

Destas, nove vacas morreram naturalmente e três foram eutanasiadas *in extremis*, de acordo com as diretrizes recomendadas pela Resolução Normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013, do Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

3.8 Histopatologia

Os fragmentos do sistema nervoso central e dos diversos tecidos e órgãos) destinados aos exames histopatológicos foram armazenados em solução de formalina a 10% tamponada e enviados para o SAP/UFRRJ, onde foram clivados, desidratados em álcool, clarificados com xilol, incluídos em parafina, cortados a 5µm e corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE).

3.9 Diagnóstico diferencial e co-infecções

O diagnóstico diferencial de infecção pelo vírus da raiva foi realizado no SAP/UFRRJ através do teste de imunohistoquímica (IHQ) conforme descrito em Pedroso et al., (2009) em amostras do sistema nervoso central parafinadas, oriundas de oito bovinos (33204, 33208, 33228, 33284, 33424, 33811, 33751 e 34985) que foram necropsiadas.

O diagnóstico diferencial de infecção pelo herpesvírus bovino tipo 5 foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ, através da técnica de PCR (multiplex-PCR) em amostras de DNA extraídas do sangue ou de tecidos, oriundas dos mesmos oito bovinos necropsiadas, conforme descrito em Claus et al. (2007).

Diagnóstico de outras hemoparasitoses foram realizados no LHV/UFRRJ, através da leitura das lâminas de esfregaço sanguíneo durante o diagnóstico parasitológico.

3.10 Focos adicionais

Quatro focos foram diagnosticados entre março e outubro de 2018, de quatro propriedades dos municípios de Trajano de Moraes, Rio Claro, Vassouras e Valença, através do envio de amostras de sangue total de bovinos para o LASAVE/UFRRJ, destinadas ao diagnóstico molecular (Tabela 3). As amostras foram enviadas por Médicos Veterinários das propriedades após suspeitarem de infecção por *T. vivax* nos rebanhos.

Tabela 3. Identificação dos focos adicionais e número de amostras enviadas.

Focos	Identificação	Número de amostras enviadas
Trajano de Moraes	M	5
Rio Claro	N	4
Vassouras	O	4
Valença	P	1
TOTAL	4	17

A extração de DNA das amostras de sangue total foi realizada através do mesmo protocolo já citado e utilizado nas amostras dos 12 focos estudados. A reação em cadeia de polimerase convencional (cPCR) realizada nas amostras dos focos adicionais seguiram o protocolo utilizado por Fikru et al (2014).

4. RESULTADOS

Foram identificados 16 focos de infecção por *Trypanosoma vivax* em bovinos em 13 municípios do estado do Rio de Janeiro entre fevereiro de 2016 e outubro de 2018; destes, 12 foram estudados e quatro apenas diagnosticados por PCR realizada em amostras de sangue enviadas ao LASAVE/UFRRJ, no período de março a outubro de 2018. A localização dos municípios e a cronologia da identificação dos 16 focos estão demonstrados na Figura 4.

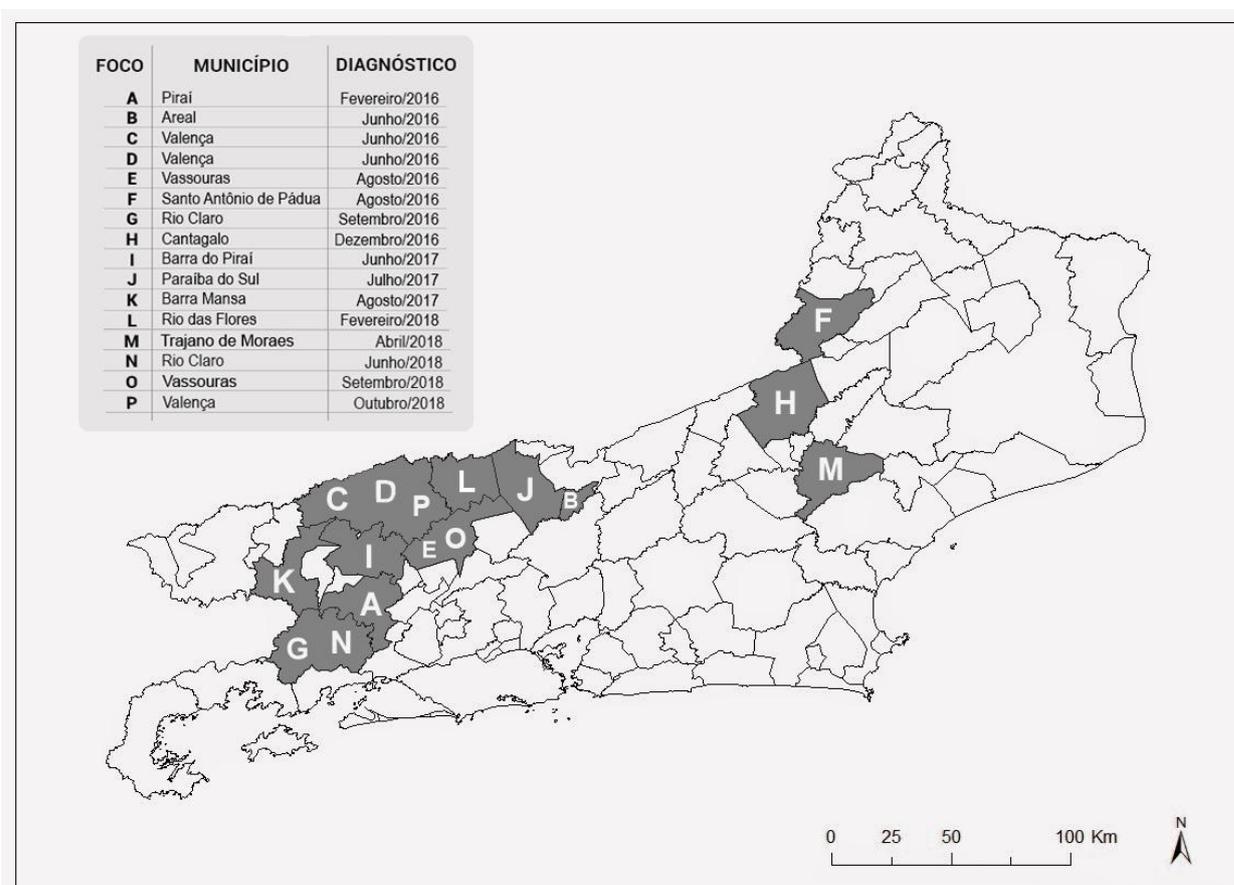


Figura 4. Localização e cronologia de identificação dos 16 focos de infecção por *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Rio de Janeiro.

4.1 Histórico e Dados Epidemiológicos nos 12 Focos Estudados

Os 12 focos estudados de infecção por *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Rio de Janeiro ocorreram entre fevereiro de 2016 e fevereiro de 2018, em 11 municípios do estado do Rio de Janeiro (focos A a L).

De uma forma geral, as propriedades estudadas possuíam bons índices zootécnicos, com bovinos de aptidão leiteira, das raças Holandesa, Girolando ou animais mestiços dessas raças, criados em regime semi-intensivo, e alimentados com pastagens nativas e de *Urochloa (Braquiaria) decumbens*, ração comercial e silagem de milho.

Em todas as propriedades foi relatada a aquisição recente (entre dois e 12 meses antes da ocorrência dos primeiros casos), diretamente ou através de leilões, de vacas procedentes de municípios dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso. Os animais introduzidos inicialmente apresentavam-se aparentemente saudáveis e em bom estado nutricional. Na maioria dos focos, a doença e as mortes nos rebanhos começaram a ocorrer em um período que variava de 1 a 3 meses posterior à chegada destes animais nas propriedades, oriundos de outros estados ou de outras propriedades, e após a introdução destas vacas na linha de ordenha.

Algumas destas vacas recém-adquiridas também adoeceram ou morreram após passarem por uma situação de estresse, como mudanças de manejo ou após o parto, conforme relatado no foco de Areal (B).

A confirmação do diagnóstico de infecção por *T. vivax* em bovinos do foco de Areal (B) foi realizada, em nosso estudo, por diagnóstico parasitológico em junho de 2016. Porém, o primeiro diagnóstico foi realizado através da iniciativa do Médico Veterinário responsável pela propriedade, em maio de 2016, através do envio para laboratório particular de 100 amostras para pesquisa de hemoparasitos em esfregaços sanguíneos de 100 vacas em lactação. Destas, 43 apresentaram resultados positivos, incluindo três vacas da raça Girolando e uma Holandesa, compradas três meses antes em leilões em Minas Gerais; essas três vacas morreram dias após o diagnóstico. Na ocasião, a suspeita e o envio das amostras para diagnóstico foi devido a uma queda brusca na produção de leite e ao aparecimento de animais com sinais clínicos de anemia, fraqueza e mortes, que ocorreram após a suspensão abrupta do fornecimento de silagem para diminuição de custos. A partir daí, houve notificação do foco e a propriedade passou a fazer parte deste estudo, com acompanhamento e coletas adicionais.

O quadro clínico foi observado, predominantemente em todas as propriedades estudadas, em vacas e novilhas em lactação e logo após o parto, e em menor escala, em vacas em período seco. Apenas em uma propriedade do município de Piraí (A) a infecção foi confirmada em um bezerro adquirido do estado de Mato Grosso.

A utilização do hormônio ocitocina, com emprego de seringas e agulhas compartilhadas, inseridas diretamente na veia mamária durante a ordenha, foi um manejo amplamente relatado em todas as propriedades estudadas. Em nove das 12 propriedades, os casos clínicos se iniciaram após a introdução de vacas leiteiras recém-chegadas na linha de ordenha.

A presença de moscas hematófagas dos gêneros *Stomoxys* e *Tabanus* foi observada durante algumas visitas e também foi amplamente relatada em todas as propriedades estudadas e eram descritas como “moscas do estábulo” e “mutucas”, nomes populares utilizados para os dípteros desses gêneros, respectivamente.

A Tabela 4 demonstra o número de animais clinicamente afetados e a taxa de mortalidade associados à infecção por *T. vivax* em 10 dos 12 focos estudados. Estes dados foram obtidos a partir das informações coletadas e registradas no questionário (Anexo II). No foco de Barra Mansa (K) e Rio das Flores (L) estes dados não foram disponibilizados.

Tabela 4. Número de animais clinicamente afetados e taxa de mortalidade, associados à infecção por *Trypanosoma vivax* em 10 dos 12 focos estudados.

Foco	Nº de animais no rebanho/ nº de vacas em lactação	Nº de animais clinicamente afetados	Nº de mortes associadas à enfermidade
A	364/ 130	13	3
B	282 / 100	60	15
C	322/102	20	15
D	302/177	40	21
E	150/30	27	13
F	136/85	10	10
G	516/220	55	25
H	65/40	6	2
I	675/190	50	10
J	303/120	30	10

Propriedades dos municípios de A: Pirai; B: Areal; C: Valença; D: Valença; E: Vassouras; F: Santo Antônio de Pádua; G: Rio Claro; H: Cantagalo; I: Barra do Pirai; J: Paraíba do Sul.

4.2 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos que foram comuns a todos os animais afetados, em todas as propriedades-focos de tripanossomíase estudadas foram: mucosas pálidas, diminuição de apetite, diminuição significativa na produção de leite, emagrecimento progressivo e fraqueza (Figuras 5 a 12, Tabela 5). Adicionalmente, de forma irregular entre as propriedades, foram observados apatia, edema de barbel e peito, diarreia, conjuntivite, opacidade de córnea, pneumonia, abortos e/ou repetições de cio, ataxia, andar em círculos, incoordenação, tremores musculares, cegueira, sialorreia, movimentos de pedalagem e morte.

Os sinais neurológicos foram observados em nove vacas: duas das propriedades de Rio Claro (foco G), seis vacas de Areal (foco B), e uma vaca da propriedade de Rio das Flores (foco L). Em duas vacas foi relatado que os sinais clínicos se iniciaram após terem sido movimentadas após um período de repouso. Todos os bovinos que apresentaram sintomatologia neurológica morreram, com exceção de uma vaca Girolanda $\frac{3}{4}$, de cinco anos de idade (foco B), que apresentou remissão dos sinais clínicos (ataxia e andar em círculos) 24 horas após o tratamento com cloreto de isometamidium e recuperação do escore corporal após 10 dias.

Diminuição ou interrupção da produção leiteira, perda de animais, gastos com medicamentos, assistência veterinária e alterações reprodutivas foram as principais causas responsáveis pelas perdas econômicas relatadas pelos proprietários.

Dentre as alterações reprodutivas, o aborto foi citado como a principal causa de perda de produção, e no foco de Cantagalo (H) esse foi um sinal amplamente relatado e associado a uma anemia severa das vacas que abortaram (30 % das vacas em lactação). Aumento do número de vacas com repetições de cios e de nascimento de bezerros fracos foram alterações também relatadas após o aparecimento da enfermidade. Os índices de perda da produção leiteira variaram de 30% até a queda total nos animais infectados.

Tabela 5. Sinais clínicos observados e relatados nos 12 focos de tripanossomíase estudados em 11 municípios do estado do Rio de Janeiro.

Sinais clínicos/Focos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	TOTAL
Apatia	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12
Mucosas pálidas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12
Diminuição de apetite	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12
Emagrecimento progressivo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12
Fraqueza	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12
Diminuição da produção de leite	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12
Edema de peito e barbela	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	2
Diarreia	-	X	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	3
Conjuntivite	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Opacidade de córnea	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Pneumonia	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	2
Abortos/repetição de cio	X	X	-	-	-	X	-	-	X	-	X	X	6
Ataxia	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	2
Andar em círculos	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Incoordenação motora	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	2
Tremores musculares	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	2
Cegueira	-	X	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	2
Sialorreia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	1
Movimentos de pedalagem	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	2
Morte	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	12

X: sinais clínicos presentes; -: sinais clínicos ausentes; propriedades (focos) dos municípios de A: Piraí; B: Areal; C: Valença; D: Valença; E: Vassouras; F: Santo Antônio de Pádua; G: Rio Claro; H: Cantagalo; I: Barra do Piraí; J: Paraíba do Sul; K: Barra Mansa; L: Rio das Flores.



Figura 5. Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com acentuado emagrecimento. Vassouras (E), RJ, 2016.



Figura 6. Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com prostração, acentuado emagrecimento e edema submandibular. Areal (B), RJ, 2016.

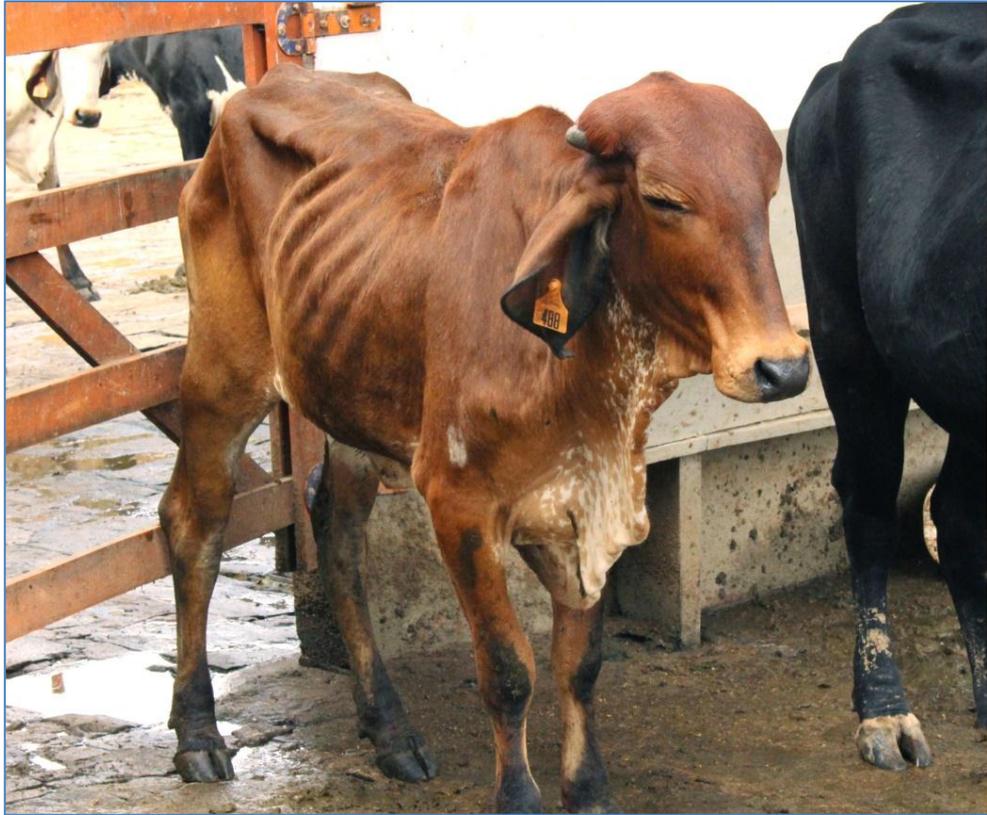


Figura 7. Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com apatia e acentuado emagrecimento. Rio Claro (G), RJ, 2016.



Figura 8. Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com apatia e acentuado emagrecimento. Rio Claro (G), RJ, 2016.

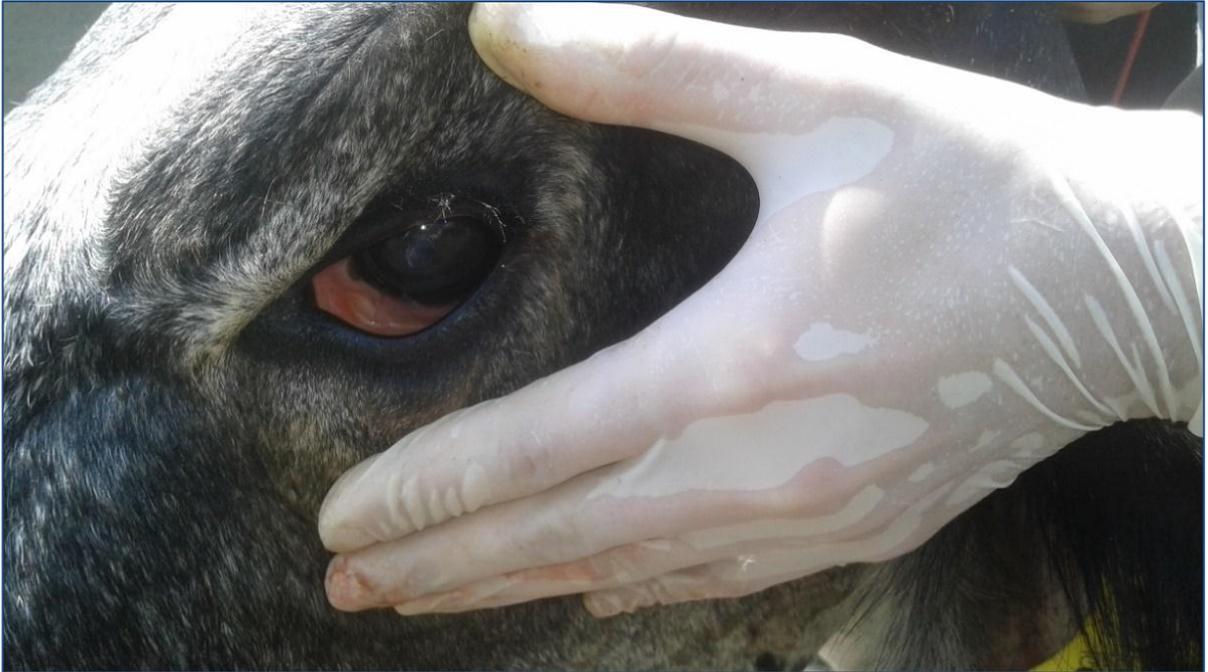


Figura 9. Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com mucosa conjuntival pálida e retração do globo ocular (desidratação). Areal (B), RJ, 2016.



Figura10. Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com mucosa vulvar pálida. Areal (B), RJ, 2016.



Figura 11. Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com mucosa oral pálida. Pirai (A), RJ, 2018.



Figura 12. Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase com fezes com muco e sangue. Rio Claro (G), RJ, 2016.

4.3 Diagnóstico parasitológico e molecular

As formas tripomastigotas de *T. vivax*, visualizadas em microscópio óptico e analisadas morfológicamente, revelaram presença de cinetoplasto subterminal, núcleo medial e membrana ondulatória estreita (Figuras 13 e 14). A Tabela 6 exibe as medidas observadas em amostras obtidas de três propriedades diferentes, comparadas com as medidas obtidas por Carvalho et al. (2007), nos focos de Minas Gerais.

Tabela 6. Médias e desvio padrão de parâmetros morfométricos de *Trypanosoma vivax* presentes em lâminas de esfregaço sanguíneo de bovinos oriundos de três focos de tripanosomíase do estado do Rio de Janeiro.

Propriedades	L (µm)	PK (µm)	PN (µm)	KN (µm)	NA (µm)	F (µm)
A (n = 30)	21.37 ± 3.38	2.08 ± 0.67	8.36 ± 1.22	6.29 ± 0.74	5.04 ± 1.25	10.46 ± 2.56
B (n = 30)	23.77 ± 1.83	1.21 ± 0.50	7.40 ± 1.08	6.15 ± 0.94	7.29 ± 1.24	8.82 ± 1.09
E (n = 30)	19.20 ± 1.96	1.38 ± 0.45	5.32 ± 0.90	4.05 ± 0.84	7.23 ± 1.43	5.97 ± 1.16
Minas Gerais*	19.89 ± 2.15	0.90	7.55	6.64	7.46	6.22

L: tamanho total do parasito, incluindo flagelo livre; PK: distância do final da extremidade posterior ao cinetoplasto; PN: distância do final da extremidade posterior ao meio do núcleo; KN: distância do cinetoplasto ao meio do núcleo; NA: distância do meio do núcleo ao final da extremidade anterior; F: comprimento do flagelo livre; n: quantidade de parasitos mensurados. Propriedades dos municípios de B: Areal; E: Vassouras; A: Piraf. * Carvalho et al., (2007).

Na reação em cadeia de polimerase (PCR), as amostras de 46 bovinos amplificaram fragmentos de DNA com aproximadamente 780 pb, das quais cinco foram sequenciadas e pareadas com outras sequências disponíveis no GenBank. Todas e apresentaram 100% de identidade com *T. vivax*.

Dos 12 focos de infecção por *T. vivax* identificados, em seis o diagnóstico foi realizado por meio da visualização do protozoário em esfregaços sanguíneos e pela PCR. No entanto, em outros cinco focos não foi possível visualizar o *T. vivax* em amostras de esfregaço sanguíneo e o diagnóstico foi confirmado pela PCR (Tabela 7). Apenas no foco de Rio das Flores (L) não houve coleta de sangue e o diagnóstico foi feito somente por PCR em fragmentos de órgãos, e será descrito posteriormente.

A Tabela 8 compara os resultados obtidos e mostra a análise da discordância entre a pesquisa de hemoparasito em esfregaço sanguíneo e na cPCR, nas 240 amostras que foram submetidas às duas técnicas. O resultado $p < 0,0001$ significa que os testes são diferentes quanto à positividade. O diagnóstico parasitológico apresentou sensibilidade de 0,64% quando comparado à PCR.

Tabela 7: Amostras de sangue para diagnóstico parasitológico e molecular, por foco de tripanosomíase do estado do Rio de Janeiro.

Foco	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	Total
Número total de amostras de sangue coletadas	13	89	6	5	21	70	13	8	9	17	17	4	272
Número de amostras destinadas ao diagnóstico parasitológico	13	89	6	5	21	70	13	8	9	17	11	4	266
Número de amostras destinadas ao diagnóstico molecular	13	89	6	5	0	70	13	8	9	17	12	4	246
Amostras positivas no esfregaço sanguíneo	2	13	0	0	6	2	2	1	0	0	0	0	25
Amostras positivas na PCR	4	18	1	1	-	9	3	1	5	1	3	0	46

Propriedade dos municípios de A: Pirai; B: Areal; C: Valença; D: Valença; E: Vassouras; F: Santo Antônio de Pádua; G: Rio Claro; H: Cantagalo; I: Barra do Pirai; J: Paraíba do Sul; K: Barra Mansa.

Tabela 8: Análise da discordância entre a pesquisa de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo e PCR de bovinos oriundos de focos de tripanosomíase do estado do Rio de Janeiro.

Diagnóstico parasitológico	Diagnóstico Molecular		Total
	Positivo	Negativo	
Pesquisa de <i>Trypanosoma vivax</i>			
Positivo	18	1	19
Negativo	25	194	219
<i>Total</i>	43	195	238
<i>p-valor</i>	P< 0.0001*		

*p<0.05 = discordância significativa entre os testes (McNemar – Método Exato).

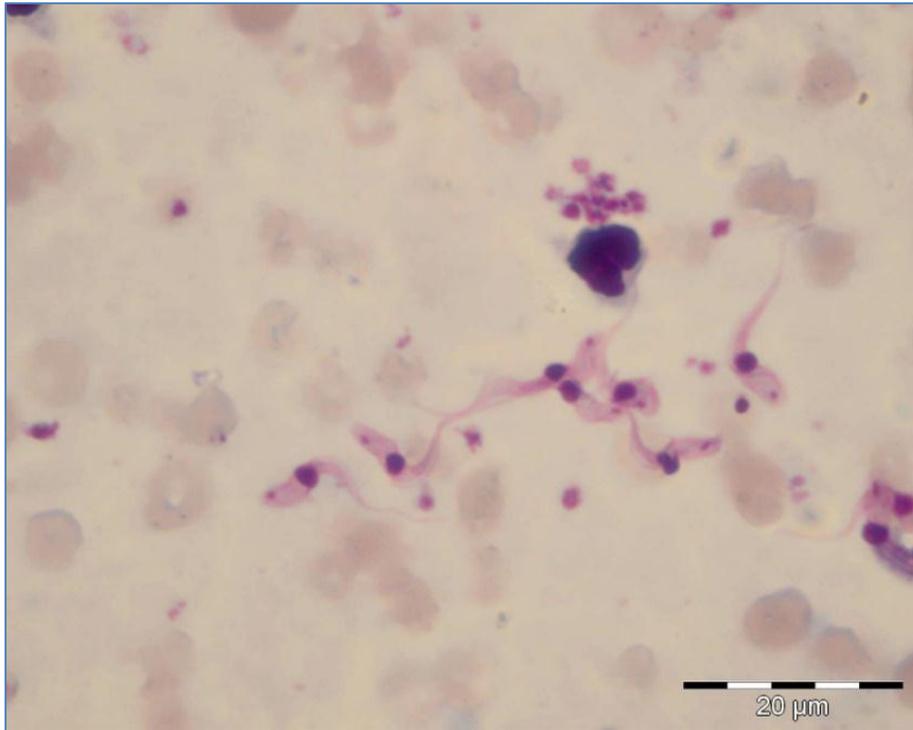


Figura 13. Bezerro (n° registro 1/LHV) de propriedade-foco; formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma vivax* . Giemsa, obj. 100. Pirai (A), RJ.

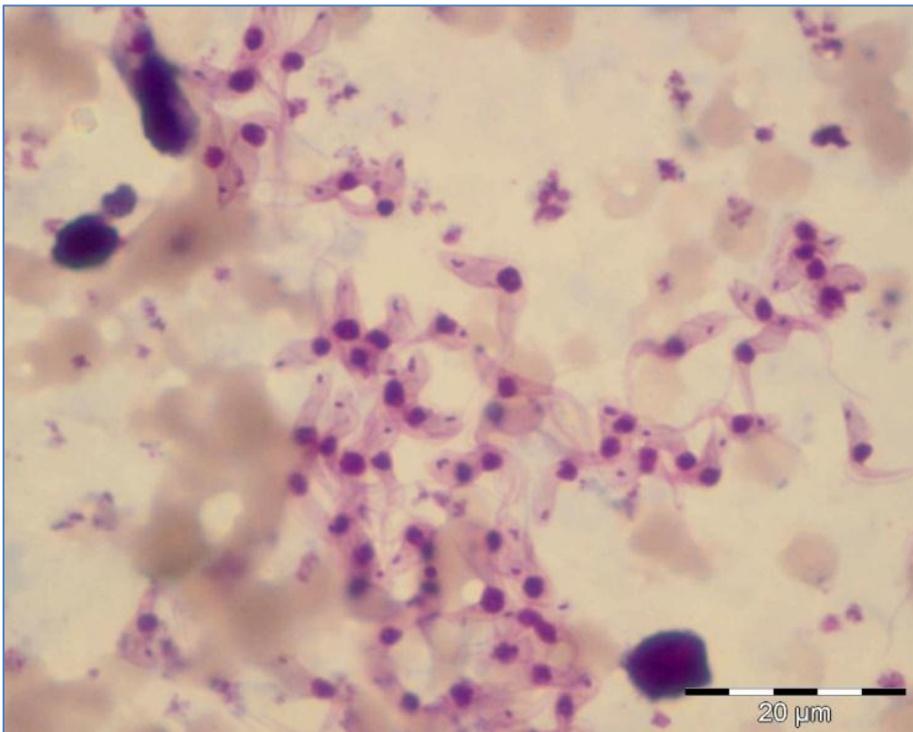


Figura 14. Bezerro (n° registro 1/LHV) de propriedade-foco; formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma vivax* . Giemsa, obj. 100. Pirai (A), RJ.

4.4 Alterações Macroscópicas

As principais alterações macroscópicas foram: estado nutricional em geral ruim, mucosas pálidas, pelos secos e arrepiados, linfonodos moderadamente aumentados, úmidos ao corte, com áreas esbranquiçadas e com equimoses ou petéquias (Figura 15) e aumento de volume do baço. O sistema nervoso central, em geral, não apresentou alterações macroscópicas; porém, no Bovino 33228 foram observadas áreas desde acastanhadas até hemorragias bem evidentes no córtex telencefálico, desde a região frontal até a occipital (Figura 16). As alterações macroscópicas de cada animal necropsiado estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2. Achados macroscópicos em bovinos infectados por *Trypanosoma vivax*, oriundos de focos do estado do Rio de Janeiro.

Bovinos	Achados macroscópicos
33204-Areal (B)	<i>Estado Nutricional</i> ruim; <i>olho</i> esquerdo com opacidade de córnea; <i>mucosas</i> (oral, conjuntival e vaginal) acentuadamente pálidas; <i>linfonodos superficiais</i> (diversos) moderadamente aumentados - pré-escapular com 13x4x3,5cm, com exsudato purulento de cor creme e consistência pastosa (linfadenite abscedativa); <i>pulmão</i> com enfisema interlobular e pleural acentuados; <i>coração</i> com atrofia serosa da gordura epicárdica; <i>baço</i> com leve aumento de volume, vasos da cápsula evidentes, tortuosos e com parênquima moderadamente friável; <i>músculo</i> longíssimo dorsal direito com equimoses multifocais.
33206-Areal (B)	<i>Estado nutricional</i> ruim; <i>pele</i> com extensas úlceras em áreas das tuberosidades ósseas (escaras de decúbito); <i>mucosa</i> da vulva moderadamente pálida; <i>ânus</i> com estrias vermelhas (sangue); <i>tecido subcutâneo</i> com edema multifocal acentuado, associado às áreas de úlceras de pele; <i>linfonodos pré-crurais</i> aumentados, com 6x5x3cm; <i>pulmão</i> com áreas multifocais de atelectasia, área focalmente extensa de enfisema intersticial e pleural; <i>fígado</i> com dois abscessos no parênquima, com 3 e 5 cm de diâmetro; <i>músculos esqueléticos</i> com áreas multifocais e extensas de necrose, e hemorragias associadas às úlceras da pele.
33228-Areal (B)	<i>Estado nutricional</i> ruim; <i>pelos</i> arrepiados; <i>mucosas</i> pálidas; <i>linfonodos pré-escapulares</i> moderadamente aumentados e com equimoses; <i>traqueia</i> com leve quantidade de espuma branca no lúmen (edema); <i>pulmão</i> com grandes áreas de enfisema alveolar e intersticial distribuídos aleatoriamente; <i>baço</i> moderadamente aumentado e com áreas irregulares de espessamento da cápsula; <i>músculos intercostais</i> com equimoses; <i>cérebro</i> com áreas de hemorragias no córtex telencefálico, desde a região frontal até a occipital.
33751-Areal (B)	<i>Estado nutricional</i> ruim; <i>pele</i> levemente desidratada; <i>pelos</i> arrepiados; <i>mucosas</i> acentuadamente pálidas; <i>coração</i> com algumas equimoses no epicárdio; <i>baço</i> moderadamente aumentado e com áreas irregulares de espessamento da cápsula; <i>linfonodos pré-escapulares</i> moderadamente aumentados e com equimoses.
33811-Areal (B)	<i>Estado nutricional</i> regular; <i>pele</i> levemente desidratada; <i>pelos</i> arrepiados; <i>mucosas</i> acentuadamente pálidas; <i>linfonodos</i> congestos; <i>baço</i> moderadamente aumentado e com bordos arredondados.
34985-Areal (B)	Necropsia realizada pelo Veterinário; sem dados macroscópicos; coleta e envio de material para exame histopatológico.
34976-Piraí (A)	Necropsia realizada pelo Veterinário; sem dados macroscópicos; coleta e envio de material para exame histopatológico.
33305-Rio Claro (G)	Necropsia realizada pelo Veterinário; sem dados macroscópicos; coleta e envio de material para exame histopatológico.
33424-Rio Claro (G)	<i>Estado nutricional</i> ruim; <i>pelos</i> arrepiados; <i>mucosas</i> hiperêmicas; <i>linfonodos traqueobrônquicos</i> aumentados e com áreas avermelhadas e amareladas; <i>pulmão</i> com áreas de atelectasia nos lobos crânio-ventrais, lobos dorso-caudais com desenho reticulado amarelado ao corte havia pequenos focos de supuração, nas extremidades dos lobos craniais havia áreas de enfisema alveolar e intersticial; <i>fígado</i> levemente mais firme à palpação; <i>linfonodos hepático, pancreáticos e ruminais</i> aumentados de volume e úmidos ao corte, avermelhados e com áreas claras irregulares; <i>bexiga</i> com mucosa levemente hiperêmica; <i>intestino grosso</i> com pequenos piogranulomas sugestivos de esofagostomose; <i>útero</i> grávido com feto macho de 47 cm (medida nuca-inserção da cauda).
34671-Rio das Flores (L)	Necropsia realizada pelo Veterinário; sem dados macroscópicos; coleta e envio de material para exame histopatológico.
33284- Santo Antônio de Pádua (F)	<i>Estado nutricional</i> ruim; <i>pelos</i> secos e sem brilho; <i>linfonodos</i> toda cadeia ganglionar superficial e interna, incluindo os mesentéricos, moderada a acentuadamente aumentada, úmidos ao corte, alguns com petéquias (pré-escapulares e mediastínicos) e com a região cortical com áreas esféricas, esbranquiçadas e proeminentes; <i>abdômen</i> abaulado; <i>baço</i> aumentado de volume e com evidênciação folicular; <i>abomaso</i> com alguns exemplares de <i>Haemonchus</i> sp.; <i>intestinos delgado e grosso</i> com numerosos exemplares de <i>Moniezia benedeni</i> .
34163 – Barra Mansa (K)	<i>Estado nutricional</i> ruim; <i>pele</i> com poucos carrapatos; <i>olhos</i> moderadamente retraídos; <i>dentes</i> incisivos centrais flutuantes à pressão; <i>mucosas</i> levemente pálidas; <i>linfonodos</i> cervicais superficiais levemente acastanhados ao corte; <i>fígado</i> discretamente amarelado e friável; <i>rúmen</i> com papilas atrofiadas; <i>abomaso</i> com mucosa de aspecto finamente ladrilhado e com pequena quantidade de <i>Haemonchus</i> sp.; <i>linfonodos mesentéricos</i> escuros ao corte; <i>músculos</i> com atrofia generalizada.



Figura 15. Bovino (33424) de propriedade-foco de tripanossomíase. Linfonodo pré-escapular aumentado, úmido ao corte e com áreas esbranquiçadas. Rio Claro (G), RJ.



Figura 16. Bovino (33228) de propriedade-foco de tripanossomíase. Córtex telencefálico com áreas acastanhadas e hemorragias, desde a região frontal até a occipital. Areal (B), RJ.

4.5 Alterações histológicas

A principal lesão do sistema nervoso encontrada nos casos de tripanossomíase em bovinos deste estudo consistiu em uma meningoencefalite, caracterizada predominantemente por perivascularite linfocitocitária, com presença de raros plasmócitos em alguns vasos, por vezes ativados (células Mott) e eventualmente eosinófilos e células multinucleadas. A intensidade da infiltração linfocitocitária variou de discreta a acentuada e envolvia os vasos das meninges, da substância cinzenta, e em maior intensidade, da substância branca (Figuras 17 e 18). Em alguns animais, enquanto vasos de menor calibre exibiam poucas camadas de células inflamatórias, na mesma região, vasos de maior calibre apresentavam várias, por vezes, até mais de 10 camadas de células inflamatórias. Em quatro animais (Bovinos 33204, 33206, 33228 e 33751, todos do foco B, de Areal), em fragmentos examinados do córtex frontal, temporal, parietal e occipital, núcleos da base, tálamo, hipocampo/amígdala e hipotálamo, as lesões foram muito uniformes e, em geral, variaram de moderadas a acentuadas (Figuras 19). Nos colículos rostrais e caudais, ponte e bulbo, óbex e cerebelo, as lesões, embora também se apresentassem como moderadas a acentuadas, por vezes, em algumas áreas eram leves. Na neurohipófise, gânglios trigêmeos, plexo coroide e epêndima, os infiltrados variaram de leves a moderados (Figura 20). Na medula cervical, torácica e lombar, as lesões estavam ausentes ou eram muito discretas, e se restringiam a eventuais infiltrados de poucas células linfocitocitárias ao redor de vasos das meninges, da substância branca e ou da substância cinzenta (Quadro 3).

Outras alterações histológicas que acompanharam a meningoencefalite linfocitocitária perivascular incluíam ativação endotelial, congestão, edema perivascular, pequenos focos de vacuolização do neurópilo, e nestas áreas eventualmente se encontravam alguns astrócitos reativos (gemistocíticos e de Alzheimer do tipo II) e gliose focal a difusa leve; lesões estas encontradas nos Bovinos 33204, 33206, 33228 e 33751. Corpúsculos de choque e êmbolos de fibrina no interior de vasos foram observados apenas em dois animais (Bovinos 33204 e 33811), este último, concomitantemente, apresentou lesões histológicas compatíveis com salmonelose.

Em todos os animais, exceto no Bovino 34985, foram encontradas lesões histológicas no coração, caracterizadas por leve a moderado infiltrado inflamatório intersticial linfocitocitário perivascular, com raros plasmócitos e eosinófilos, e eventualmente células multinucleadas.

No baço e linfonodos, em geral, foram observadas rarefação centro-folicular, infiltração linfocitocitária difusa e leve a moderada, com focos de infiltrados por eosinófilos e alguns plasmócitos, eventuais células multinucleadas, congestão e discreta a leve hemossiderose.

Adicionalmente, o Bovino 33811 apresentou, nos linfonodos, no fígado e no baço, derrame serofibrinoso subcapsular, com êmbolos e trombos de fibrina, focos de necrose fibrinoide, infiltrado de neutrófilos e macrófagos, colônias bacterianas cocoides levemente basofílicas e corpúsculos de choque.

O Bovino 34163 apresentou *foam cells* isolados ou em aglomerados nos linfonodos, baço e fígado, bem como colangite e leve fibrose periportal, megalocitose e hepatócitos tumefeitos e em lise.

Infiltração histiocitária também esteve presente no intestino dos Bovinos 33751, 33305, 33424, 34163 e 33284, de forma leve a acentuada e difusa na lâmina própria da mucosa e, por vezes, ao redor de vasos na submucosa, acompanhadas ou não de eosinófilos e plasmócitos.

Nos rins, os infiltrados linfocitários perivasculares eram intersticiais e por vezes periglomerulares. Também havia ativação e proliferação de células mesangiais.

Ainda foram encontrados infiltrados linfocitários perivasculares em diversos outros órgãos, os quais estão detalhados no Quadro 4. As Figuras 21 a 27 ilustram as alterações histológicas encontradas nos rins, baço, intestino e coração.

O Quadro 5 demonstra os resultados laboratoriais de esfregaço sanguíneo e PCR de amostras de sangue e/ou tecidos de bovinos com lesões histológicas sugestivas de tripanossomíase.

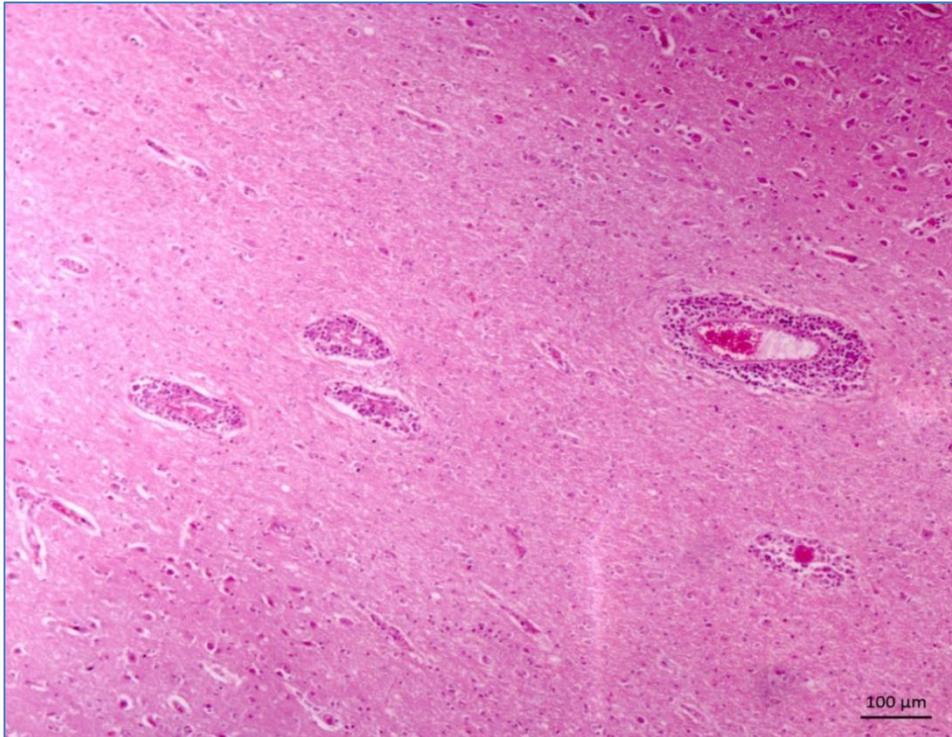


Figura 17. Sistema Nervoso Central. Córtex cerebral: infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e histiocitário perivascular. HE, obj. 10. Bovino 33204 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B), RJ.

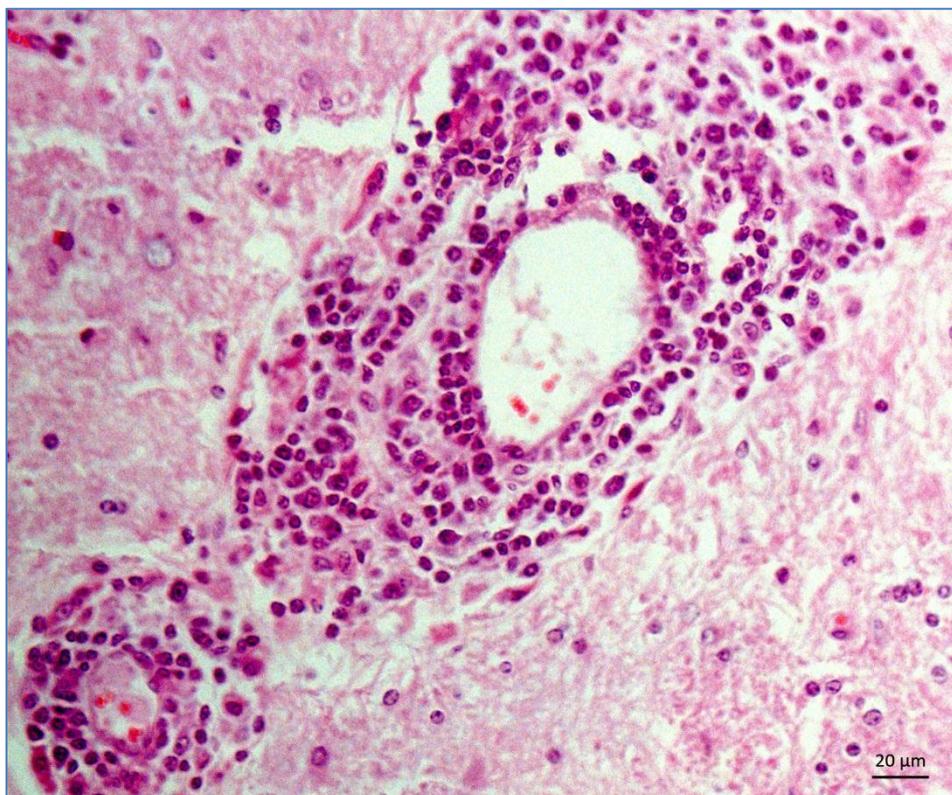


Figura 18. Sistema Nervoso Central. Núcleo lentiforme: infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e histiocitário perivascular. HE, obj. 40. Bovino 33204 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B), RJ.

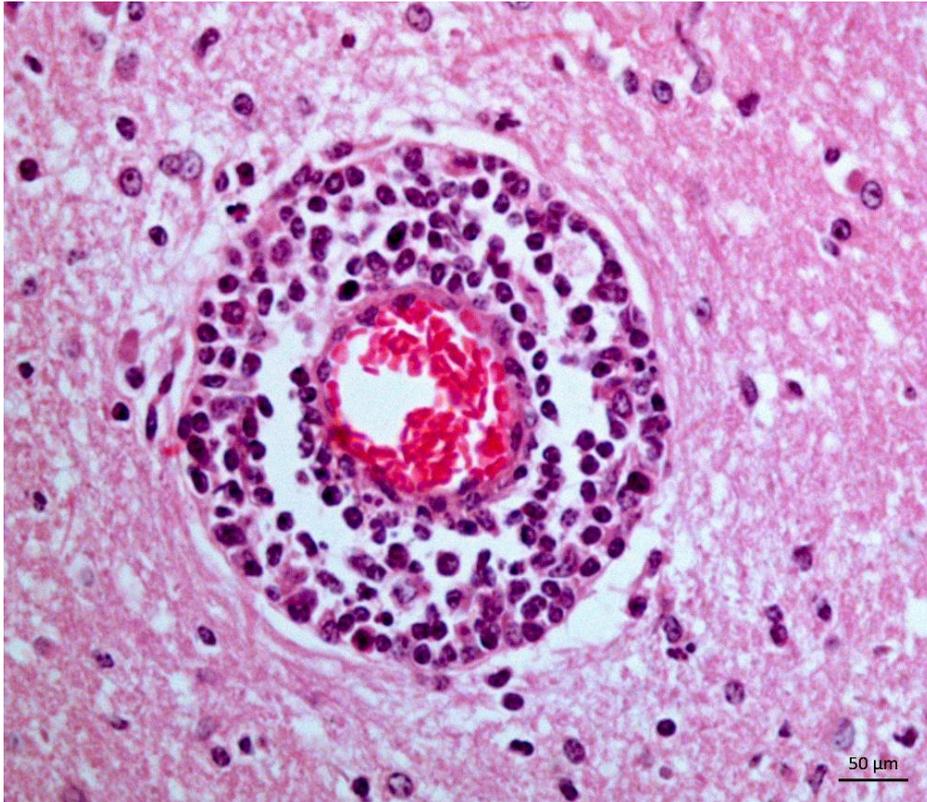


Figura 19. Sistema Nervoso Central. Córtex temporal: infiltrado inflamatório linfocitário perivascular. HE, obj. 63. Bovino 33228 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B), RJ.

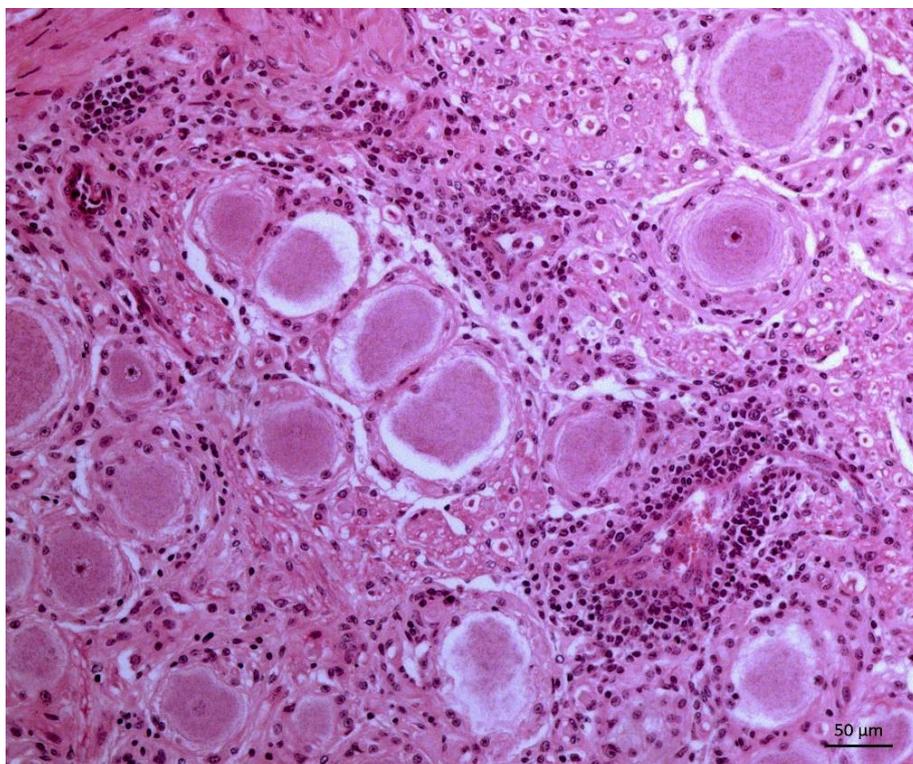


Figura 20. Sistema Nervoso Central. Gânglio trigeminal: infiltrado inflamatório linfocitário perivascular. HE, obj. 20. Bovino 33204 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B), RJ.

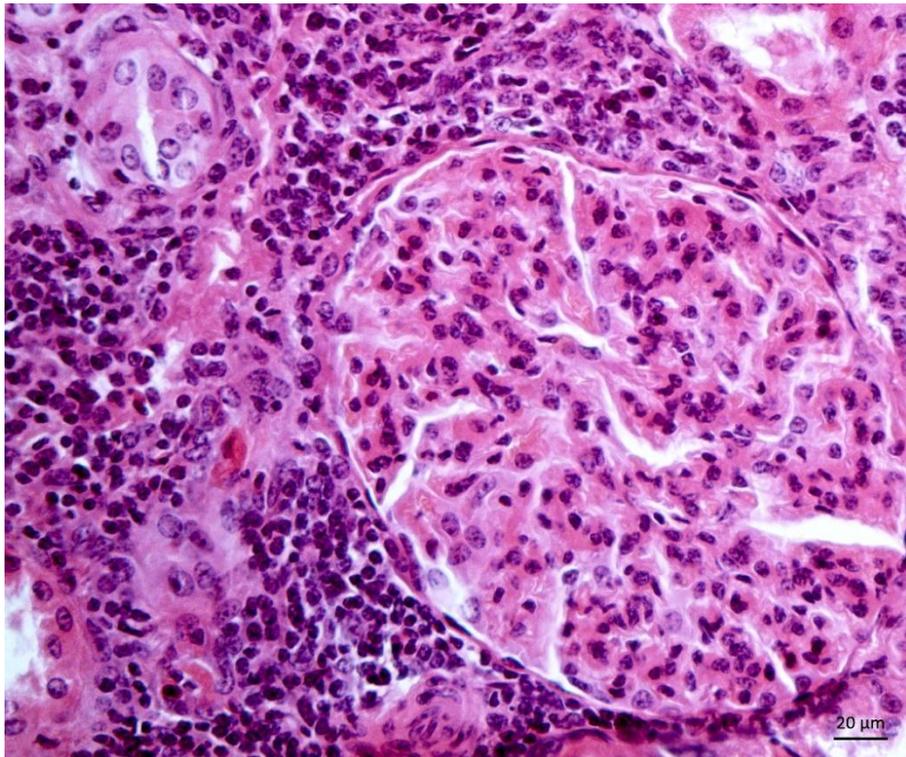


Figura 21. Rim: infiltrado inflamatório linfohistiocitário intersticial periglomerular. HE, obj. 40. Bovino 33204 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B) RJ.

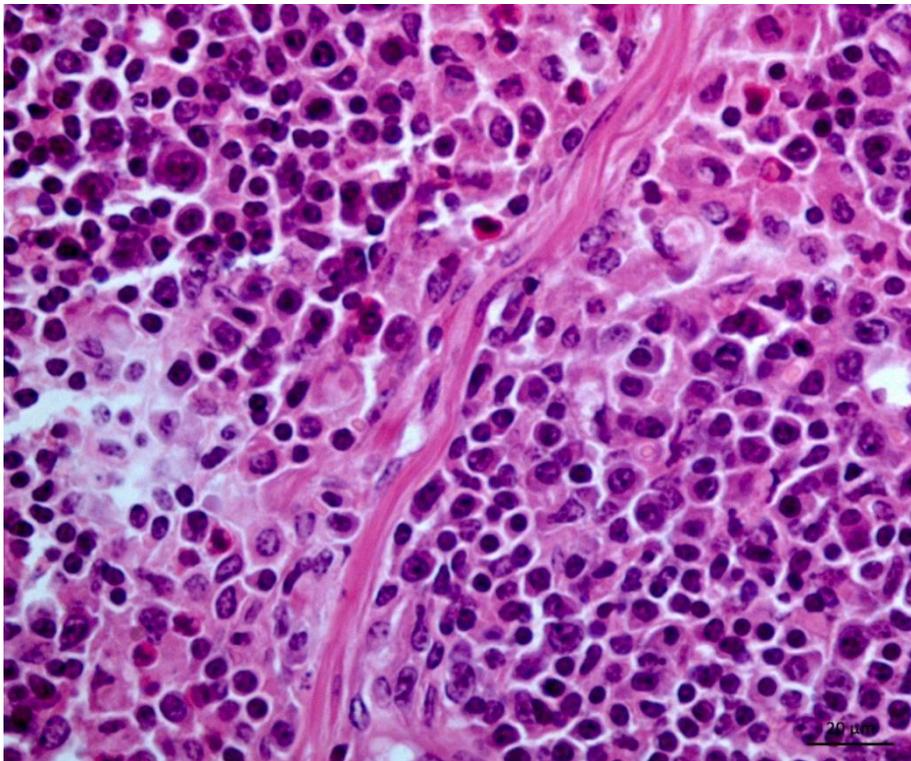


Figura 22. Baço: infiltrado composto por plasmócitos, histiócitos e eosinófilos. HE, obj. 63. Bovino 33204 de propriedade-foco de tripanossomíase. Areal (B), RJ.

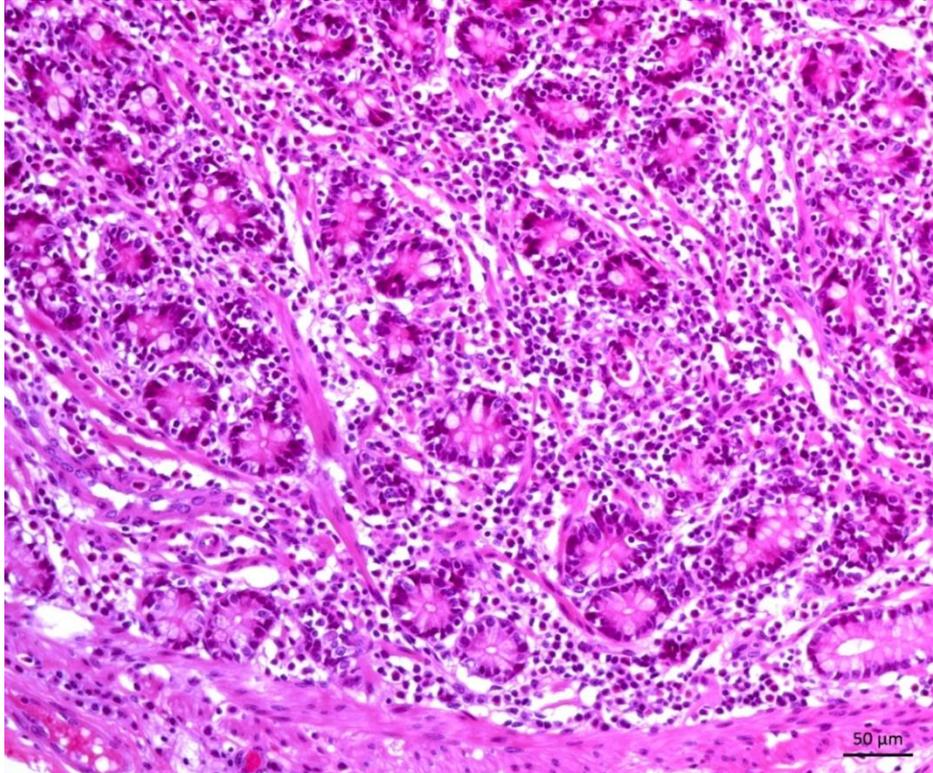


Figura 23. Intestino delgado: mucosa do jejuno com moderado infiltrado inflamatório linfocítico. HE, obj. 20. Bovino 33424 de propriedade-foco de tripanossomíase. Rio Claro (G), RJ.

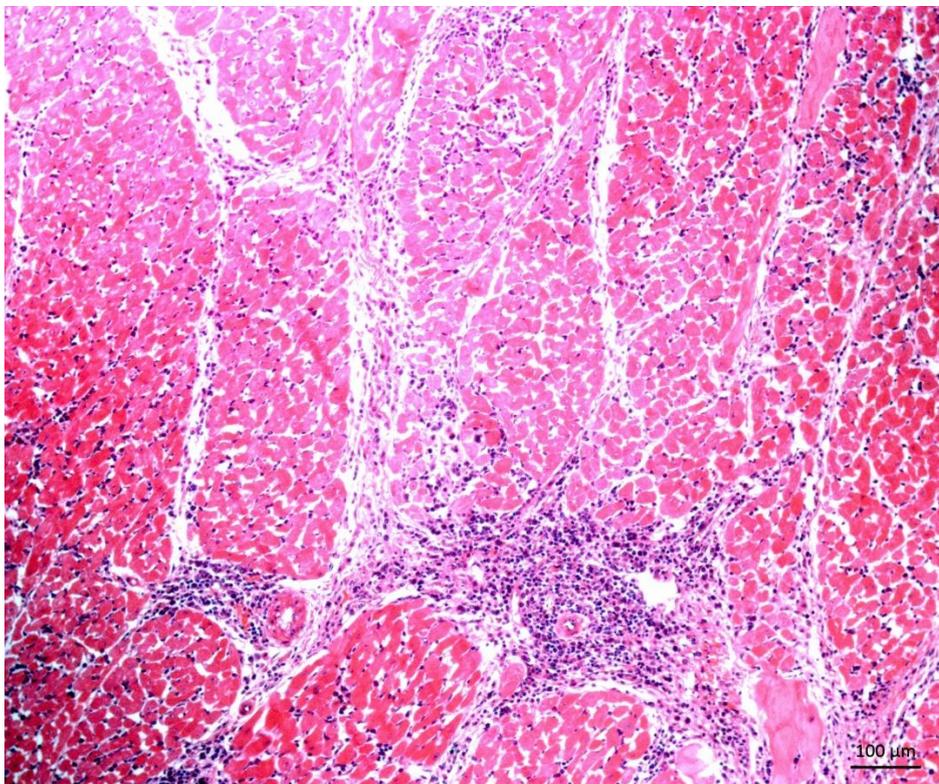


Figura 24. Coração. Infiltrado inflamatório linfohistiocitário intersticial multifocal. HE, obj 10. Bovino 33424 de propriedade-foco de tripanossomíase. Rio Claro (G), RJ.

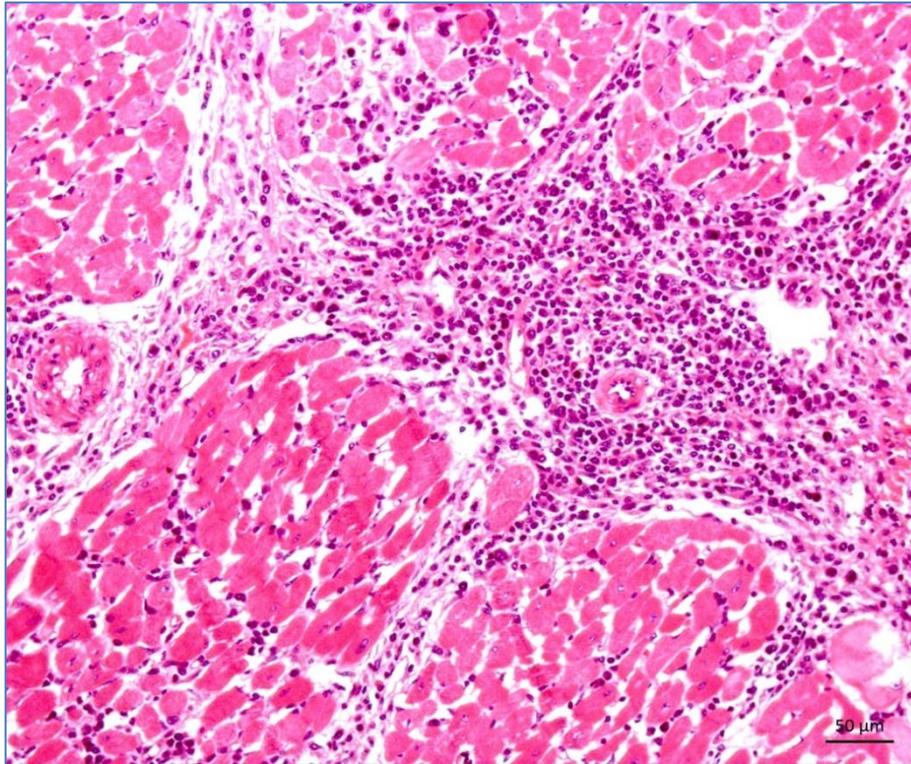


Figura 25. Coração. Infiltrado inflamatório linfohistiocitário intersticial multifocal. HE, obj 20. Bovino de propriedade-foco de tripanossomíase. Município de Rio Claro (G), RJ.

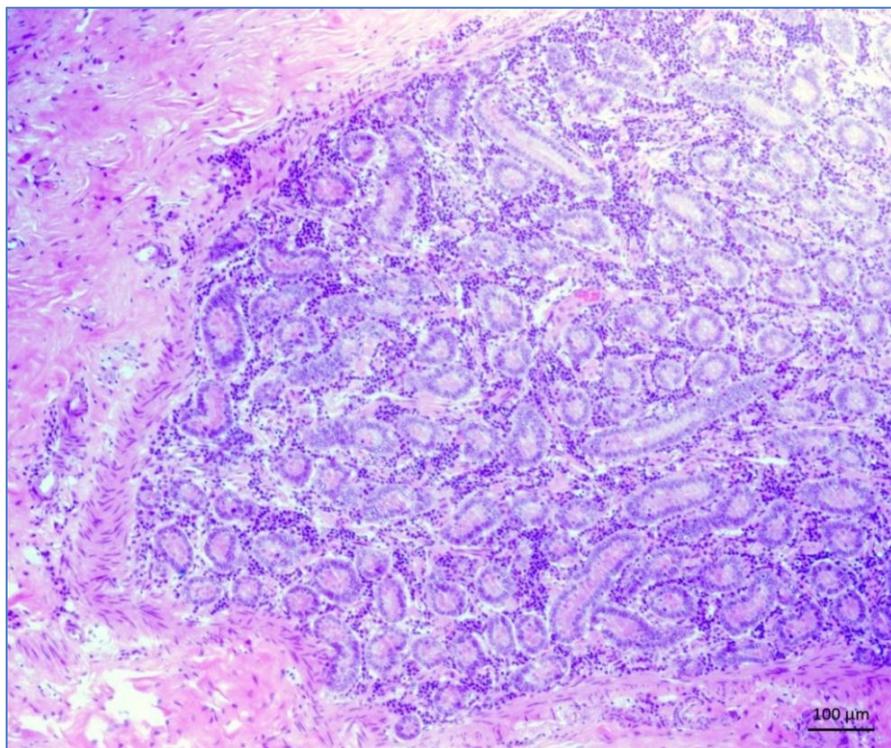


Figura 26. Intestino delgado: moderado infiltrado inflamatório linfocitário na lâmina própria da mucosa. HE, obj 10. Bovino 33424 de propriedade-foco de tripanossomíase. Rio Claro (G), RJ.

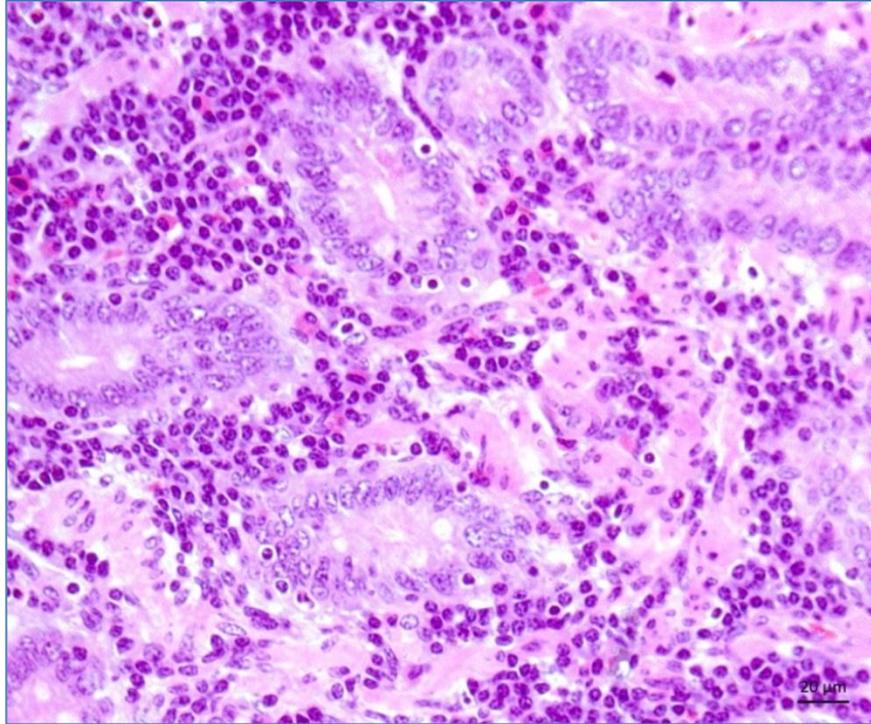


Figura 27. Intestino delgado: acentuado infiltrado inflamatório linfohistiocitário entre as criptas intestinais. HE, obj 40. Bovino 33424 de propriedade-foco de tripanossomíase. Rio Claro (G), RJ.

Quadro 3. Intensidade da perivasculite linfohistiocitária em diferentes áreas do sistema nervoso central de bovinos infectados por *Trypanosoma vivax*, no estado do Rio de Janeiro.

Bovinos Órgãos	33204- Areal	33206- Areal	33228- Areal	33751- Areal	33811- Areal	34985- Areal	34976- Piraí	33305-Rio Claro	33424-Rio Claro	34163- Barra Mansa	34671-Rio das Flores	33284-Santo Antônio de Pádua
Córtex frontal	++/+++	++/+++	++/+++	NC	-	-	NC	-	++	(+)	(+)	(+)
Córtex temporal	++/+++	+/>++	+++	++(+)	-	NC	NC	-	NC	NC	NC	-
Córtex parietal	++/+++	++/+++	++/+++	++	-	-	NC	NC	NC	NC	NC	-
Córtex occipital	++/+++	+++	++/+++	++	-	-	NC	NC	NC	NC	NC	-
Núcleos da base	++/+++	++/+++	+++	NC	-	(+)	NC	NC	++	-	(+)	-
Tálamo	+/>++	++/+++	+++	++/+++	-	NC	NC	NC	NC	-	NC	-
Hipocampo e amígdala	+++	++/+++	+++	+++	-	(+)	NC	NC	NC	-	+(+)	-
Hipotálamo	++/+++	++/+++	+++	++/+++	-	NC	NC	NC	NC	-	-	NC
Colículos	+/>++	++/+++	+/>++	+/>++	-	NC	NC	NC	NC	NC	+	(+)
Ponte e bulbo	++/+++	+/>++	+/>++	(+)/+	-	(+)	NC	NC	NC	-	(+)/+	(+)
Óbex	++	+	NC	NC	-	-	NC	NC	NC	-	+	-
Cerebelo	+/>+++	+++	+/>++	+++	-	-	NC	NC	NC	+++	-	++/+++
Plexo coroide	+	+	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-	NC	(+)
Gânglios trigeminais	+	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-	NC	(+)
Neurohipófise	+/>++	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-	NC	-
Medula cervical	(+)	(+)	+/>++	NC	NC	(+)	NC	NC	NC	NC	(+)	-
Medula torácica	(+)	NC	NC	NC	-	-						
Medula lombar	NC	NC	NC	-	-							
Meninges do encéfalo	+/>+++	+/>+++	+/>+++	(+)/+++	(+)/++	(+)	NC	NC	+/>++	(+)	(+)	+/>++
Meninges da medula	(+)	(+)	(+)/+	(+)	NC	(+)	NC	NC	NC	-	(+)	-

Lesões: - = ausente; (+) = discreta; + = leve; ++ = moderada; +++ = acentuada; NC = não coletado

Quadro 4. Intensidade da perivasculite linfohistiocitária e infiltração histiocitária em diferentes órgãos de bovinos infectados por *Trypanosoma vivax*, no estado do Rio de Janeiro.

Bovinos Órgãos	33204- Areal	33206- Areal	33228- Areal	33751- Areal	33811- Areal	34985- Areal	34976- Piraí	33305- Rio Claro	33424 Rio Claro	34163- Barra Mansa	34671-Rio das Flores	33284-Santo Antônio de Pádua
Coração	+	+	+	+ /+++	(+)	-	+	+	++ /+++	(+)	(+)	+(+)
Linfonodos	+	+	+	+	+	+ ^P	NC	NC	+	+ /+++	NC	+++
Fígado	- ^E	(+)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	(+) [*]
Rim	+	(+)	(+)	-	-	+	NC	+	+(+)	+	NC	++ ^{**}
Pulmão	-	-	NC	-	-	-	-	+	+	NC	-	-
Baço	-	+	+	+	-	+ ^P	+	NC	+ ^P	++ ^E	+	++ ^E
Músculo estriado	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-	NC	NC
Pré-estômagos	-	(+)	NC	NC	NC	NC	NC	-	+	-	NC	+ ^{abomaso}
Intestinos	-	-	NC	+	NC	NC	NC	+	+++	(+) /+++ ^E	NC	++(+) ^{EP}
Medula óssea	NC	+ ^{CM}	-	-	(+) ^{CM}	NC	NC	NC	NC	-	NC	NC
Bexiga	NC	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	(+)	NC	+(+)
Adrenal	NC	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	(+)	NC	NC	NC
Olho	-	NC	NC	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Lesões: - = ausente; (+) = discreta; + = leve; ++ = moderada; +++ = acentuada; NC = não coletado; E = eosinófilos; P = plasmócitos; * = leucocitoestase linfoplasmocitária; ** = ativação e proliferação de células mesangiais; CM = células mononucleares.

Quadro 5. Exames laboratoriais dos bovinos necropsiados oriundos de propriedades-foco, confirmadas para infecção por *Trypanosoma vivax*, no estado do Rio de Janeiro.

Bovinos e procedência	Esfregaço sanguíneo	PCR do sangue	PCR de tecidos (<i>pool</i> encéfalo, coração e baço)	Lesões histológicas sugestivas de tripanossomíase	Propriedade-foco
33204-Areal (B)	+	+	NC	++/+++	+
33206-Areal (B)	NC	-	+	++/+++	+
33228-Areal (B)	+	+	NC	++/+++	+
33751-Areal (B)	NC	-	+	++/+++	+
33811-Areal (B)	NC	-	+	(+)/++	+
34985-Areal (B)	NC	NC	+	(+)	+
34976-Piraí (A)	NC	NC	+	(+)	+
33305-Rio Claro (G)	NC	NC	NC	-	+*
33424-Rio Claro (G)	-	-	NC	++	+*
34671-Rio das Flores (L)	NC	NC	+	(+)	+
33284-Santo Antônio de Pádua (F)	-	-	+	(+)	+
34163-Barra Mansa (K)	NC	NC	NC	(+)	+*

PCR = reação em cadeia da polimerase; NC = não teve material; + = positivo; - = negativo; * = animais oriundos de propriedades-foco, com diagnóstico confirmado em outros animais

4.6 Co-morbidades

Os exames laboratoriais direcionados para o diagnóstico da infecção por *T. vivax*, também permitiram que fossem detectadas outras enfermidades concomitantes (Quadro 6).

A presença dos hemoparasitos *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e/ou *Babesia bigemina* foram detectadas, através da leitura dos esfregaços sanguíneos, em bovinos que apresentavam sinais clínicos provenientes de nove dos 11 focos identificados.

No Bovino 33811, do foco do município de Areal (B), foi detectada, através da histopatologia, lesões compatíveis com as de Salmonelose.

Amostras de sistema nervoso central dos 12 bovinos necropsiados foram testadas pela imunohistoquímica para descartar a raiva e através da PCR, para descartar infecção por Herpes vírus bovino tipo 5, e todas as amostras apresentaram resultados negativos, para ambas enfermidades.

Outras co-morbidades incluíram glossite ulcerativa, broncopneumonia, pneumonia intersticial e verminose.

Quadro 6. Co-morbidades detectadas em bovinos necropsiados, oriundos de propriedades-foco de infecção por *Trypanosoma vivax* no estado do Rio de Janeiro.

Co-morbidades/ focos	<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia bigemina</i>	<i>Salmonela spp</i>	Glossite ulcerativa	Broncopneumonia fibrinossupurativa	Pneumonia intersticial e Broncopneumonia exsudativa secundária	Verminose	Lesões hepáticas de ingestão de <i>Urochloa</i> (<i>Brachiaria</i>) sp. e encefalopatia hepática
B	X	X	X	X (33811)	X (33204)	X (34985)	-	-	-
E	X	-X	--	NC	NC	NC	NC	NC	NC
J	X	-	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC
C	X	-	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC
D	X	-	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC
I	X	-	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC
A	X	-	-	-	-	X (34976)	-	-	-
G	NC	NC	NC	-	-	-	X (34424)	-	-
K	X	X	X	-	-	-	-	-	X (34163)
H	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
F	X	-	-	-	-	-	-	X (33284)	-
L	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-

X: presença; -: lesão ausente; NC = não teve material. Propriedades dos municípios de B: Areal; E: Vassouras; J: Paraíba do Sul; C: Valença, D:Valença; I: Barra do Pirai; A: Pirai; G: Rio Claro; K: Barra Mansa; H: Cantagalo; F: Santo Antônio de Pádua; L: Rio das Flores.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo foi possível identificar 16 focos de tripanossomíase no estado do Rio de Janeiro. Esses dados indicam que a doença está se disseminando no estado.

A identificação dos focos e a confirmação do diagnóstico se basearam em um conjunto de dados clínico-epidemiológicos e laboratoriais, tais como diagnóstico parasitológico (esfregaço da capa leucocitária), diagnóstico molecular (cPCR), necropsia e histopatologia.

Verificou-se que a entrada de bovinos infectados de outros estados, onde já foi constatada a presença de *T. vivax*, ou de bovinos comercializados em leilões, foram as prováveis origens da entrada da tripanossomíase no estado do Rio de Janeiro. Esse trânsito de animais de áreas de risco também já foi responsável por surtos da doença em outros estados, conforme argumentado por Carvalho et al. (2008), Abrão et al. (2009) e Cuglovici et al. (2010) em Minas Gerais, por Batista et al. (2008) na Paraíba e por Cadioli et al. (2012) em São Paulo.

Fatores relatados em outros estudos (PAIVA et al., 2000; MADRUGA, 2009) que determinam ou contribuem para um aumento da parasitemia em animais infectados, como mudanças bruscas de manejo e parto, podem favorecer as manifestações clínicas agudas da enfermidade, como foi observado principalmente no foco de Areal, onde animais infectados recém-adquiridos, que chegaram na propriedade em aparente bom estado de saúde apresentaram sinais clínicos e morreram.

Uma grande variedade de fatores está envolvida na epidemiologia da transmissão das tripanossomíases, porém, moscas hematófagas dos gêneros *Stomoxys* sp. e *Tabanus* sp. foram identificadas nas propriedades estudadas, o que sugere que esses fatores são prováveis mecanismos responsáveis pela transmissão de *T. vivax* entre animais do mesmo rebanho, e um fator de risco para a disseminação da doença em áreas limítrofes às propriedades-foco. Esses mecanismos de transmissão também foram relatados por diversos autores (OTTE; ABUABARA, 1991; DESQUENES, 2004; CUGLOVICE et al. 2010; CADIOLI et al., 2012). Em face dessas observações, não descartamos a possibilidade de que outros municípios das áreas limítrofes às das propriedades-foco já identificadas possam estar com rebanhos infectados, ou pelo menos estão sob o risco de contrair a infecção.

Outro potencial agente de transmissão, citado por Desquesnes (2004) em comunicação pessoal de J. Favre é a *Hematobia irritans*; esses autores consideram que a proliferação dessa espécie pode ser responsável pela transmissão de *T. vivax* em fazendas leiteiras no Suriname; essa espécie também é endêmica no estado do Rio de Janeiro, e também já foi observada nas fazendas-foco.

O compartilhamento de agulhas durante vacinações e ou a aplicação de outros medicamentos também pode estar envolvido na disseminação da infecção (CORDOVES et al., 1992; BATISTA et al., 2008; GALIZA et al., 2011; VIEIRA et al., 2017). Neste estudo, o compartilhamento de seringas e agulhas entre os bovinos, especialmente na prática corriqueira da utilização do hormônio ocitocina, diretamente na veia mamária durante a ordenha, em todas as propriedades estudadas, foi um manejo altamente sugestivo de ter contribuído para a disseminação da doença dentro dos rebanhos. Portanto, é importante que haja um esclarecimento aos proprietários sobre o risco de compartilhar agulhas, a fim de evitar perdas econômicas associadas à infecção causada por este protozoário e mesmo por tantos outros agentes infecciosos de interesse sanitário.

Embora os sinais clínicos observados nos bovinos infectados por *T. vivax* em nosso estudo (mucosas pálidas, diminuição de apetite, diminuição da produção de leite,

emagrecimento, fraqueza e morte) sejam inespecíficos, eles foram semelhantes aos encontrados por outros autores em estudos de focos no Brasil (HOLMES et al., 1997; SILVA & DÁVILA 2001; BATISTA et al., 2008; CADIOLI et al., 2012; BOADA-SUCRE et al., 2016; FIDELIS Jr et al., 2016). De todo o modo, os sinais clínicos inespecíficos supracitados, especialmente a anemia e a fraqueza, embora não possibilitem a conclusão do diagnóstico dessa parasitose, quando associados aos dados de perda ou diminuição da produção, distúrbios reprodutivos, diarreia e sinais neurológicos, apontam para uma forte suspeita de tripanossomíase e são sugestivos o suficiente para conduzir o Veterinário em busca de uma confirmação por exames laboratoriais (parasitológicos, moleculares, necropsia e histopatologia).

O aparecimento de um quadro clínico neurológico representa um agravante no prognóstico da enfermidade (GERMANO et al., 2017), o que endossa os dados verificados neste estudo, no qual de nove bovinos com sintomatologia nervosa, somente um se recuperou clinicamente; tendo os demais evoluído para a morte. Essa evolução grave com sinais neurológicos que culminam com a morte de bovinos infectados por *T. vivax*, também foi observada nos estudos de Batista et al., (2007), Costa et al., (2009), Galiza et al., (2011) e Silva et al., (2009). A forma neurológica central, frequentemente relatada na tripanossomíase provocada por tripanosomassalivários no continente africano deve ser considerada como uma importante manifestação da enfermidade nas Américas.

Alterações reprodutivas, tais como abortamentos, também foram relatados em vacas infectadas por *T. vivax* no Pantanal e na Bolívia (SILVA et al., 2006), e em vacas no semi-árido da Paraíba (SILVA et al., 2007). Na África, aborto e anestro são alterações reprodutivas frequentes em rebanhos acometidos por tripanossomíases e são responsáveis por consideráveis perdas econômicas nos rebanhos daquele continente (RADOSTITIS et al., 2002; CONNOR; BOSSCHE, 2005); abortos relacionados com a infecção por *T. vivax* também ocorreram em vacas de propriedades do nosso estudo.

Vale ressaltar que na fase crônica da infecção, os sinais clínicos podem estar ausentes ou os bovinos exibem apenas sinais leves e inespecíficos, fato que dificulta ainda mais o diagnóstico e até mesmo a suspeita de tripanossomíase como causa do problema. Desse modo, a presença de animais assintomáticos no rebanho é fator de risco para a disseminação da infecção para os demais indivíduos e para a permanência do parasito na área, facilitando que a tripanossomíase evolua para sua forma enzoótica na região. Neste estudo, alguns animais apresentaram características sugestivas de fase crônica da infecção.

Em regiões endêmicas, como no Pantanal, a forma clínica predominante em rebanhos infectados por *T. vivax* é crônica (SILVA et al. 1996; PAIVA et al., 2000). Em propriedades acompanhadas no nosso estudo, alguns bovinos infectados, após episódios clínicos agudos iniciais, não apresentavam mucosas pálidas e anemia, e sim emagrecimento progressivo e diminuição leve a moderada da produção de leite. São justamente animais com essas características que podem se manter indefinidamente como fontes de infecção de *T. vivax* na propriedade, pois tendem a não provocar suspeita clínica, dada a inespecificidade apresentada. Estas observações demonstram que mesmo em focos de regiões não endêmicas, após um período de relativa adaptação, animais persistentemente infectados passam a apresentar manifestações clínicas da fase crônica, como nos bovinos das propriedades acima citadas.

Não se pode afirmar, categoricamente, se os sinais clínicos observados nos bovinos deste estudo, surgiram exclusivamente devido à infecção pelo *T. vivax* ou se intensificaram em decorrência de falhas de imunidade, por outras etiologias que possam ter deixado os bovinos naturalmente menos resistentes. As informações relatadas pelos Médicos Veterinários de que após o surgimento da enfermidade no rebanho alguns animais passaram a apresentar aumento de infestação por ectoparasitos, problemas de casco e mastites, e a constatação laboratorial de que alguns animais apresentavam co-morbidades (anaplasmose, babesiose,

verminose, broncopneumonia e salmonelose) pode reforçar os argumentos de imunossupressão, fato que também já foi relatado por outros autores (PAIVA et al., 2000; WELLS et al., 1984;). Em regiões onde a infecção é endêmica relata-se que os animais não apresentam doença aguda grave ou mortalidade elevada, o que sugere uma adaptação da relação parasito-hospedeiro (DESQUENES, 2004; CONNOR; BOSSCHE, 2005, PAIVA et al., 2000; SCHENK et al., 2001). Sinais clínicos agudos com taxas de mortalidade significativas foram vistos neste estudo, principalmente no foco B (Areal) e também foram relatadas por outros autores (BATISTA et al., 2008; GALIZA et al., 2011; CADIOLI et al., 2012;), em áreas não endêmicas. É de se supor que, assim como observado em outros estudos, sinais clínicos possam ser mais exacerbados quando já existem fatores predisponentes para uma imunossupressão ou doenças concomitantes e a presença do *T. vivax* em associação com outros agentes; e condições de manejos nutricionais e/ou sanitários precários não deve ser subestimada (PAIVA et al., 2000; WELLS et al., 1984).

As características morfológicas e medidas biométricas encontradas nos parasitos identificados nos focos do estado do Rio de Janeiro coincidem com outros isolados de *T. vivax* descritos em focos de tripanossomíases em bovinos no Brasil (D'ÁVILA et al., 1997; CARVALHO et al., 2008; SILVA et al., 1996; PAIVA et al., 2000; CUGLOVICI et al., 2010; GUERRA et al., 2008; PIMENTEL et al., 2011).

Os *primers* utilizados no presente estudo amplificaram fragmentos de DNA com aproximadamente 780 pb de comprimentos (GEYSEN et al., 2003) e são compatíveis com os descritos para isolados brasileiros de *Trypanosoma sp.* A PCR é um método sensível para detecção de *T. vivax*, que resulta em maior confiança no diagnóstico da tripanossomíase (MADRUGA et al., 2003; VIEIRA et al., 2017).

No presente estudo, a sensibilidade do diagnóstico parasitológico foi menor do que a do diagnóstico molecular, e resultados semelhantes também foram relatados em diversos estudos (BATISTA 2007 et al., 2007; CONNOR & BOSSCHE, 2005, GALIZA et al., 2011; PIMENTEL et al., 2012; VIEIRA et al., 2017), o que pode ser atribuído à cronicidade da enfermidade, fase em que a quantidade de parasitos na corrente sanguínea é escassa ou ausente para serem visualizados no exame parasitológico direto, enquanto que na fase aguda a sensibilidade é maior dependendo do nível de parasitemia (MADRUGA et al., 2006, CARVALHO et al., 2010).

Amostras de sangue negativas para *T. vivax* somente no exame parasitológico ou em ambos (parasitológico e molecular) também podem ocorrer em função de tratamento parasiticida prévio em animais infectados. O diagnóstico molecular também pode sofrer interferência devido à conservação prévia das amostras de sangue e/ou tecidos. A algumas amostras de sangue que resultaram negativas somente no exame parasitológico e positivas na PCR eram de animais que foram tratados com drogas antiparasitárias como o diminazeno. Resultados falso negativos na PCR também podem ocorrer devido ao inadequado armazenamento de amostras coletada a campo (DESQUENES, 2004).

Em quatro bovinos necropsiados (33206, 33751, 33811, 33284) exames parasitológicos e moleculares feitos com amostras de sangue resultaram negativos enquanto a PCR do tecido encefálico e do miocárdio foram positivas. Nos bovinos necropsiados 33424 do foco de Rio Claro (G) e no bovino 34163 do foco de Barra Mansa, apesar da PCR ter sido negativa, as lesões histológicas eram características da infecção por *T. vivax* e a propriedade era positiva, ou seja, o diagnóstico foi positivo em outros animais do rebanho.

Os métodos de diagnóstico parasitológicos muitas vezes são os únicos realizados, devido ao baixo custo e à maior facilidade de acesso por parte dos produtores e Médicos Veterinários que atuam no campo, o que, por vezes, dificulta o diagnóstico definitivo. Estes métodos sofrem influência também, além de tratamentos parasiticidas prévios, de animais na fase

crônica da infecção (CONNOR; BOSSCHE, 2005; MADRUGA et al., 2006) e os resultados negativos podem ter ocorrido devido à baixa parasitemia momentânea.

A tripanossomíase pode ser controlada pelo tratamento com aceturato de diminazene, com bons resultados quando administrado no início dos casos da doença (BATISTA et al., 2007). No entanto, em bovinos com sinais neurológicos os tratamentos com drogas antiparasitárias não são eficientes. A localização do parasito no sistema nervoso central dificulta a resposta ao tratamento específico (BATISTA et al., 2007; GERMANO et al., 2017). Em nosso estudo, os bovinos 33228, 33751 e 33811, do foco B (Areal) apresentaram sinais neurológicos e foram tratados com o Isometamidium, porém este tratamento não apresentou resultado e os bovinos evoluíram para morte.

Nos bovinos deste estudo não foram encontradas lesões macroscópicas significativas e específicas. As alterações macroscópicas encontradas como: estado nutricional em geral ruim, mucosas pálidas, linfonodos aumentados e aumento de volume do baço e polpa branca proeminente, também foram relatados por outros autores (BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008; GALIZA et al., 2011; GERMANO et al., 2018; RIET CORREA, 2007), tão pouco lesões hemorrágicas, como citadas por Gardine (1989).

Os resultados histopatológicos encontrados, com destaque para as lesões de caráter inflamatório e degenerativo do sistema nervoso central foram também evidenciados por diversos autores em ovinos e bovinos na região Nordeste do Brasil (BATISTA et al. 2007; BATISTA et al., 2008; GALIZA et al., 2011).

A meningoencefalite com predomínio de perivasculite linfocitocitária, foi a principal lesão encontrada nos bovinos deste estudo e ficou evidente que ocorreu com maior intensidade no cérebro em relação à medula, e foi nitidamente observada nas vacas que estavam na fase aguda da infecção e que apresentaram sinais neurológicos muito consistentes. Os infiltrados inflamatórios ao redor dos vasos foram mais intensos na substância branca com relação à substância cinzenta, como relatado também por Batista et al. (2008). E também ficou evidente que as lesões eram mais intensas no sentido rostro-dorsal e se atenuavam em direção ao sentido rostro-caudal.

Entre os animais estudados, aqueles do foco B- Areal apresentaram lesões no SNC intensas e evidentes quando comparados aos outros animais. Esses achados, aliados aos sinais clínicos e laboratoriais, bem como a perda de produção, nos permite inferir que esse foco B-Areal, a infecção estava inicialmente na fase aguda, enquanto que nas demais propriedades as características eram de infecção em fase crônica.

Além do sistema nervoso central também foram observadas lesões inflamatórias em diversos órgãos, porém foram mais constantes no coração, baço, linfonodos, intestino delgado, rim e fígado. A miocardite linfocitocitária intersticial e perivascular foi uma lesão presente em praticamente todos os animais necropsiados que se encontravam em fase aguda da infecção. Lesões semelhantes foram citadas em estudos experimentais em ovinos (BATISTA et al., 2006) e em bovinos (KIMETO et al., 1990). Em dois animais com lesão de miocardite, o diagnóstico de infecção por *T. vivax* através da cPCR foi realizado em fragmentos do coração coletados durante a necropsia, o que evidencia a especificidade da lesão histológica encontrada neste órgão em casos de tripanossomíase.

No baço e linfonodos, em geral, foram observadas rarefação centro-folicular, infiltração linfocitocitária difusa e leve a moderada, e nos rins alguns animais apresentaram infiltrados linfocitocitários perivascularares intersticiais ou por vezes periglomerulares, semelhantes aos achados de Batista et al. (2007).

Outro achado histológico frequente em animais que apresentaram diarreia foi infiltração histiocitária leve a acentuada e difusa nos intestinos, principalmente na lâmina própria da mucosa, porém esta lesão não estava associada à parasitose intestinal, e ainda não havia sido relatada em outros estudos.

As perdas econômicas relatadas pelos proprietários foram relevantes, principalmente nos focos onde ocorreram números elevados de animais com sinais clínicos e mortalidade. Esta característica de impacto econômico foi relatada por outros autores que estudaram focos de tripanossomíases em rebanhos bovinos, de diferentes regiões do Brasil (ABRÃO et al., 2009 SILVA et al. 2004; SEKONI et al, 1994).

A presença de rebanhos infectados por *T. vivax* descritos neste trabalho no estado do Rio de Janeiro, demanda que maior atenção deve ser dada à compra e maior controle com relação ao trânsito de animais das regiões em que o parasito está presente.

O quadro clínico causado pela infecção por *T. vivax* e encontrado nos bovinos deste estudo pode ser semelhante a outras enfermidades. Sinais como anemia, fraqueza, emagrecimento progressivo e diarreia também podem aparecer em doenças como a anaplasmose, babesiose, paratuberculose, deficiência de cobre/excesso de molibdênio, deficiência de cobalto, verminoses ligadas à deficiência de fósforo, hemoncose, tuberculose, intoxicação por *Pteridium aquilinum*, outras doenças caquetizantes e intoxicação por flúor.

No caso dos animais deste estudo, os dados epidemiológicos, clínico-patológicos e laboratoriais permitiram realizar o diagnóstico diferencial com clareza.

Enfermidades que causam sinais neurológicos, como a raiva, várias causas de poliencefalomalácia (meningoencefalite por herpes vírus tipo 5, intoxicação por chumbo, intoxicação por sal/privação hídrica e deficiência de tiamina), febre catarral maligna e cetose nervosa, também devem ser consideradas como diagnóstico diferencial (PAIVA et al., 2000; CONNOR & BOSSCHE, 2005; RADOSTITIS et al., 2002; RIET-CORREA, 2007; VALI et al., 2015). O quadro clínico-epidemiológico e anatomopatológico dos bovinos deste estudo não condizia com estas enfermidades. Mesmo assim o diagnóstico laboratorial (histopatológico, imunohistoquímico e molecular) para descartar raiva e herpervirose foi realizado e resultou negativo.

Na região do Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul, Paiva et al. (2011) observaram que as mortes e sinais clínicos que ocorreram naquela região, em animais infectados por *T. vivax*, foram atribuídas a outras causas etiológicas primárias como idade avançada, estado nutricional de regular a ruim, deficiências minerais e nutricionais, intoxicação pelas plantas *Solanum malacoxylon* e *Crotalaria* sp. e fotossensibilização secundária à intoxicação por *Enterolobium contortisiliquun*. Porém, o Pantanal é uma região considerada endêmica o que difere das características epidemiológicas dos casos estudados no Rio de Janeiro. O quadro clínico-patológico encontrado nos bovinos deste estudo foi atribuído, primariamente, a infecção por *T. vivax*, e não foram encontradas evidências de que as outras lesões encontradas tenham sido primárias, tendo sido consideradas apenas co-morbididades as quais foram identificadas nos exames laboratoriais.

Nos focos adicionais, a suspeita de infecção por *T. vivax*, a coleta e o envio de material para confirmação laboratorial ocorreu devido a informações e conhecimento, por parte de Médicos Veterinários, da existência deste estudo.

6. CONCLUSÕES

A identificação de 16 focos de tripanossomíase em bovinos, causada por *Trypanosoma vivax*, é um indicativo da disseminação desse agente no estado do Rio de Janeiro, a exemplo do que tem ocorrido em outros estados do Brasil.

A morfometria do protozoário identificado nas propriedades estudadas no estado do Rio de Janeiro foi compatível com *T. vivax* e coincide com as características de outros isolados de *T. vivax* relatados em bovinos no Brasil.

O compartilhamento de seringas e agulhas durante vacinações e a aplicação de medicamentos, especialmente de ocitocina na veia mamária durante a ordenha, foi uma prática corriqueira nas propriedades estudadas, e esse manejo foi um altamente sugestivo de ter contribuído para a disseminação da doença dentro dos rebanhos estudados.

Mucosas pálidas, diminuição de apetite, diminuição significativa na produção de leite, emagrecimento progressivo, fraqueza, alterações reprodutivas, diarreia e sinais neurológicos são sinais clínicos frequentes em rebanhos acometidos por tripanossomíases.

Na fase crônica da infecção os sinais clínicos podem estar ausentes ou os bovinos exibem apenas sinais leves e inespecíficos, e o exame parasitológico pode resultar falso-negativo, o que dificulta ainda mais o diagnóstico e até mesmo a suspeita de tripanossomíase como causa do problema.

A presença de animais assintomáticos no rebanho é fator de risco para a disseminação da infecção para os demais indivíduos e para a permanência do parasito na área.

A tripanossomíase causada por *T. vivax* deve ser incluída no diagnóstico diferencial de enfermidades que cursam com sinais neurológicos, visto que bovinos que apresentam a forma neurológica central da doença têm o prognóstico agravado, e mesmo tratados com parasiticidas específicos, quase sempre evoluem para morte. A sensibilidade do diagnóstico parasitológico realizado em amostras de sangue foi menor quando comparada à sensibilidade do diagnóstico molecular pela PCR

O diagnóstico molecular de infecção por *T. vivax* pode ser realizado em amostras de tecidos como coração e sistema nervoso central.

Sistema nervoso central, coração, baço, linfonodos, rim, e intestinos são considerados órgãos de eleição para coleta e realização de exames histopatológicos para caracterização das lesões como sugestivas de infecção por *T. vivax*, com destaque para o sistema nervoso central e coração.

As lesões histológicas de caráter inflamatório (meningoencefalite perivascular linfocitocitária) encontradas no sistema nervoso central dos animais deste estudo ocorreram com maior intensidade no cérebro em relação à medula, foram mais intensas no sentido rostro-dorsal e se atenuavam em direção ao sentido rostro-caudal, bem como foram mais acentuadas na substância branca em relação à substância cinzenta.

A tripanossomíase em rebanhos bovinos no estado do Rio de Janeiro traz preocupação devido ao seu potencial em causar prejuízos econômicos.

7. REFERÊNCIAS

- ABRÃO, D.C.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; RIBEIRO, M.F.B. Aspectos clínicos e patológicos da infecção natural em bovinos leiteiros por *Trypanosoma vivax* em Minas Gerais, Brasil. **Ciência Anim. Bras. Supl.1**, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria: 666 – 671. 2009.
- ABRÃO, D.C.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; RIBEIRO, M.F.B. Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no estado de Minas Gerais. **Ciência Anim. Bras. Supl.1**, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria: 672 – 676. 2009.
- BALDACCHINO, F.; MUENWORN, V.; DESQUENNES, M.; DESOLI, F.; CHAROENVIRIYAPHAP, T.; DUVALLET, G. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Mucidae): a review. **Parasite**, 20: 26. 2013.
- BARBOSA, J.C.; BASTOS, T.S.A.; RODRIGUES, R.A.; MADRID, D.M.C.; FARIA, A.M.; BESSA, L.C.; LINHARES, G.F.C. Primeiro surto de tripanossomose bovina detectado no Estado de Goiás, Brasil. **Ars. Veterinaria**, Jaboticabal, SP. II Simpósio Internacional de Medicina Veterinária Preventiva, V.31 (2): 100. 2015.
- BARBOSA, J.D. 2015. Comunicação Pessoal. Universidade Federal do Pará. Pará, PA.
- BASTOS, T.S.A.; MADRID, D.M.C.; FARIA, A.M.; BESSA, L.C.; SOUZA, A.M.; LINHARES, G.F.C. Detecção de *Trypanosoma vivax* por diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico realizadas à campo. **Ars. Veterinaria**, Jaboticabal, SP. II Simpósio Internacional de Medicina Veterinária Preventiva, V.31 (2): 40. 2015.
- BASTOS, T.S.A.; FARIA, A. M.; MADRID, D. M. C.; BESSA, L. C.; LINHARES, G. F. C.; FIDELIS JUNIOR, O. L.; SAMPAIO, P. H.; CRUZ, B. C.; CRUVINEL, L. B.; NICARETTA, J. E.; MACHADO, R. Z.; COSTA, A. J.; LOPES, W. D. Z. Primeiro surto e casos subsequentes de *Trypanosoma vivax* no Estado de Goiás, Brasil, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 26 (3): 366-371. 2017.
- BATISTA J.S.; RIET-CORREA F.; BARBOSA R.C.; GUERRA J.L. Infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 26 (1):31-37. 2006.
- BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M.M.G.; MADRUGA, C.R.; SIMÕES, S.V.D.; MAIA, F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet. Parasitol.**, 143:174-181. 2007.
- BATISTA, J.S.; BEZERRA, F.S.B.; LIRA, R.A.; CARVALHO, J.R.G.; NETO, A.M.R.; PETRI, A.A.; TEIXEIRA, M.M.G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.**, 28 (1): 63-69. 2008.
- BATISTA, J.S.; FREITAS, C.I.A.; DA SILVA, J.B.; CAVALCANTE, T.A.; DE PAIVA, K.A.R.; LOPES F.C.; LIRA R. Avaliação clínica e índices reprodutivos em vacas leiteiras

naturalmente infectadas por *Trypanosoma vivax*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, V 38 (5): 3031-3038. 2017.

BEZERRA F.S.B.; BATSTA J.S. efeitos da infecção por *Trypanosoma vivax* sobre a reprodução: uma revisão. **Acta Veterinariae Brasílica**, v2. (3): 61-66, 2008.

BOADA-SUCRE, A.A.; ROSSI SPADAFORA, M.S.; TAVARES-MARQUES, L.M.; FINOL, H.J.; REYNA-BELLO, A. *Trypanosoma vivax* adhesion to red blood cells in experimentally infected sheep. **Pathol. Res. Int.**, 4503214. 2016.

BOLÍVAR A.M.; GARCÍA-LUGO P.; GRISANTE G., ROJAS A.; MGTEIXEIRA M.; AÑEZ N. Detección de infecciones subclínicas por *Trypanosoma vivax* en bovinos de fincas ganaderas de Mérida, Venezuela. **Bol. Mal. Salud. Amb.** 46 (1), Maracay. 2006.

BOULHOSA, J. L. **Boletim DEMA**, v., p., jul-nov., 1946.

CADIOLI, F.A.; BARNABÉ, P.A.; MACHADO, R.Z.; TEIXEIRA, M.C.A.; ANDRÉ, M.R.; SAMPAIO, P.H.; FIDELIS JUNIOR, O.L.; TEIXEIRA, M.M.G.; MARQUES, L.C. Primeiro relato de surto por *Trypanosoma vivax* em vacas leiteiras no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 21 (2):118-124. 2012.

CARVALHO, A.U.; ABRÃO, D.C.; FILHO, E.J.F.; PAES, P.R.O.; RIREIRO, M.F.B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 60:769-771. 2008.

CLAUS M.P.; ALFIERI A.F.; MÉDICI K.C.; LUNARDI M.; ALFIERI A.A. Bovine herpesvirus 5 detection by virus isolation in cell culture and multiplex-pcr in central nervous system from cattle with neurological disease in brazilian herds. **Brazilian Journal of Microbiology** 38: 485-490. 2007.

CONNOR, R.J.; BOSSCHE, V.D. African animal trypanosomoses. pag. 251-296. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. **Infectious Diseases of Livestock**. Oxford University Press (SA), Vol. 1. Cap. (12). 2005.

CORDOVES, C.O.; FERNANDES, C.; GARCIA-AVILA, I. & BROCHE G.R. *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905). Lista de transmisores mecânicos en Cuba. **Rev. Cubana Cienc. Vet.** 13 (2): 219-221. 1982.

CUGLOVICE, D.A.; BARTHOLOMEU, D.C.; REIS-CUNHA J.L.; CARVALHO, A.U.; RIBEIRO, M.F.B. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais, state, Brazil. **Vet. Parasitol.**, 169: 320-326. 2010.

D'ÁVILA, A.M.R.; RAMIREZ, L.; SILVA, R.A.M.S. Morphological and biometrical differences among *Trypanosoma vivax* isolates from Brazil and Bolivia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 92 (3): 357-358. 1997.

D'ÁVILA, A.M.R.; HERRERA, H.M. , SCHLEBINGER T.; SOUZA S.S.; TRAUB-CSEKO Y.M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology** 117: 1-13. 2003.

DA SILVA A.S.; OLIVEIRA, C. B.; ZANETTE, R. A.; SOARES, C. D. M.; CORADINI, G.; POLENZ, C. H.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. 35 (3): 373-376. 2007.

DA SILVA, A.S.; COSTA, M.M.; POLENZ, M.F.; POLENZ, C.H.; TEIXEIRA, M.M.G.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S.G. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, 39 (8): 2550-2554. 2009.

DESQUESNES, M. Livestock Trypanosomoses and Their Vectors in Latin America. CIRAD-EMVT Publication, OIE, Paris, p. 174. 2004.

FIDELIS JUNIOR, O.L.; SAMPAIO, P.H.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; MARQUES, L.C.; CADIOLI, F. A. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, 5 (1): 69-81. 2016.

FIKRU, R.; HAGOS, A.; ROGE, S.; REYNA-BELLO, A.; GONZATTI, M. I.; MERGA, B.; GODDEERIS, B. M; BÜSCHER, P. A Proline Racemase Based PCR for Identification of *Trypanosoma vivax* in Cattle Blood. PLOS ONE: www.plosone.org., 9 (1): 1-7. 2014.

GALIZA, G.J.N.; GARCIA, H.A.; ASSIS, A.C.O.; OLIVEIRA, D.M.; PIMENTEL, L.A.; DANTAS, A.F.M.; SIMÕES, S.V.D.; TEIXEIRA, M.M.G.; RIET-CORREA, F. High mortality and lesions of the central nervous system in trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. **Vet. Parasitol.**, 182: 359-363. 2011.

GARCIA H.A.; RODRIGUES A.C.; BENGALY Z.; MINERVINO A. H.; RIET-CORREA F.; MACHADO R.Z.; PAIVA F.; BATISTA J.S.; NEVES L.; HAMILTON P.B.; TEIXEIRA M.M.G. Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. **Parasites & Vectors**, 7: 210. 2014.

GARDINER P.R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Adv. Parasitol.** 28: 229-317. 1989.

GARDINER P.R.; ASSOKU R.K.G.; WHITELAW D.D.; MURRAY M. Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection in ayrshire cattle. **Veterinary Parasitology** 31 (3-4): 187-197. 1989.

GERMANO, P. H. V.; SILVA, A. A.; EDLER, G. E. C.; LOPES, L. O. Aspectos patológicos e clínicos de uma bezerra Holandesa infectada naturalmente por *Trypanosoma* sp. na região do Alto Paranaba MG. Ver. **Acad. Ciênc. Anim.**, 15 (2): 609-610. 2017.

GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR-RFLP Using Ssu-rDNA amplification as na easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. **Vet. Parasitol.**, 110 (3-4): 171-180. 2003.

GUERRA, R.M.S.N.C.; FEITOSA JUNIOR, A.B.; SANTOS, H.P.; ABREU-SILVA, A.N.; SANTOS, A.C.G. Morfometriado *Trypanosoma vivax* em bezerros do estado do Maranhão, Brasil. **Ciência Rural**, 38 (3): 833-835. 2008.

GUERRA, N. R.; MONTEIRO M.F.M.; SANDES H.M.M.; CRUZ N.L.N.; RAMOS C.A.N.; SANTANA V.L.A.; SOUZA M.M.A.; ALVES L.C. Detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de Imunofluorescência indireta. **Pesq. Vet. Bras.** 33 (12): 1423-1426. 2013.

HOARE, C. A. *The trypanosomes of mammals*. Oxford:Blackwell, 1972. 749 p.

JONES, T. C.; HUNT, R. D. **Veterinary Pathology**. 6 ed. Philadelphia: Lea & Febinger, 1997. 1792 p.

JONES; DÁVILA 2001 - *Trypanosoma vivax* out of Africa. Review. Trends in Parasitology. 17 (2): 99-101.2001.

KESSLER, R.H.; SCHENK. M.A.M. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos., ed. Campo Grande: EMBRAPA CNPGC, 157p. 1998.

KIMETO, B.A.; MUGERA G.M.; NIAGA.P.N. Haemorrhagic Pancarditis in Cattle Infected with *Trypanosoma vivax*. Veterinary Parasitology, 34: 295-301. 1990.

LEGER M., VIENNE M. Epizootie a trypanosomes chez lês bovines de la Guayane Francais. Bulln Societé **Pathol Exotique**. 12: 216-258.1919.

LIMA E.F.; RIET- CORREA F.; DE CASTRO R.S.; ALBÉRIO A.B.G.; GOMES A.B.; LIMA F.S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 25 (4):250-264. 2005.

LINHARES, G.F.C.; DIAS FILHO, F.C.; FERNANDES, P.R.; DUARTE, S.C. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins: relato de caso. **Ciência Animal Bras.**, 7 (4): 455-460. 2006.

LOPES, S.T.P.; PRADO, B.S.; MARTINS, G.H.C.; BESERRA, H.E.A.; SOUSA FILHO, M.E.C.; EVANGELISTA, L.S.M.; CARDOSO, J.F.S.; MINEIRO, A.L.B.B.; OUZA, J.A.T. *Trypanosoma vivax* em bovino leiteiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, 46 (1): 287-292. 2018.

MADRUGA, C.R. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanosoma (duttonella) vivax* no Brasil. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. Ouro Preto, MG. **Rev. Bras. Parasitol.Vet.**, 13 (1): 46-47. 2004.

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.

MADRUGA C.R. Epidemiologia do *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**. 1: 1-10. 2009.

MASAKE, R. A.; MAJIWA, P. A.; MOLOO, S. K.; MAKAU, J. M.; NJUGUNA, J. T.; MAINA, M.; KABATA, J.; OLE-MOIYOI, O. K.; NANTULYA, V. M. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, New York, 85: 193-205. 1997.

MASSARD, C.L.; RESENDE H. E. B.; BRITO D. B.; LANDY, M. Tripanossomíase animal: *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* Ziemann, 1905 em *Bubalus bubalis* no Amapá, Brasil. IV **Cong. Soc. Bras. Parasitol.** Universidade Estadual de Campinas, SP. 1-4. 1979.

ONO M.S.B.; SOUTO P.C.; CRUZ J.A.L.O.; GUERRA N.R.; GUIMARÃES J.A.; DANTAS A.C.; ALVES L.C.; RIZZO H. Surto de *Trypanosoma vivax* em rebanhos bovinos na Zona da Mata do estado de Pernambuco: relato de caso. **Medicina Veterinária (UFRPE), Recife**, 11 (2): 96-101. 2017.

OSÓRIO A.L.A.R.; MADRUGA C.R.; DESQUENES M.; SOARES C.O.; RIBEIRO L.R.R.; DA COSTA S.C.G. *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax*: its biology, epidemiology, Pathogenesis, and introduction in the New World - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 103 (1): 1-13. 2008.

OTTE, M.J.; ABUARA, J.Y. Transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. **Acta Trop.**, 49 (1): 73-76. 1991.

OTTE, M.J.; ABUARA, J.Y., WELLS E.A. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. **Trop. Anim. Helth. Prod.** 26: 146-156. 1994.

PAIVA, F.; LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO, L.; MORI, A.E.; BRUM, K.B.; BERNARDO, K.C. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil: I Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revta Bras. Parasitol. Vet.**, 9 (2):135-141. 2000.

PEDROSO P.M.O., COLODEL E.M., PESCADOR C.A., ARRUDA L.P., DRIEMEIERZ D. Aspectos clínicos e patológicos em bovinos afetados por raiva com especial referência ao mapeamento do antígeno rábico por imuno-histoquímica. **Pesq. Vet. Bras.** 29 (11): 899-904. 2009.

PEREGRINE, A.S.; MAMMAN, M. Pharmacology of Dimmenazene: a review. **Acta Tropical**, 54: 185-203. 1993.

PIMENTEL, D.S.; RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; BORBA, M.L.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C. Primeiro relato e caracterização molecular de *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado de Pernambuco, Brasil. **Vet. Parasitol.**, 185:286-289. 2012.

RADOSTITIS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. **Veterinary Medicine, a text book of the disease of cattle, sheep, goats, pigs and horses.** 8th Ed. Ballieri Tindall, London, UK. 2002.

RIET-CORREIA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R. **Doenças de Ruminantes e Equídeos.** Vol. 2. 3^o Ed. 696 -701. 2007.

RODRIGUES A., FIGHERA R.A., SOUZA T.M., SCHILD A.L., SOARES M.P., MILIANO J., BARROS, C.S.L. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesq. Vet. Bras.** 25 (4): 239-249. 2005.

SERRA-FREIRE, M.N. Oiapoque - outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, 4:30-31. 1981.

SCHENK, M.A.M., MENDONÇA, C.L., MADRUGA, C.R., KOHAYAGAWA, A., ARAÚJO, F. R. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesq. Vet. Bras.** 21 (4): 157-161, 2001.

SEKONI, V. O.; NJOKU, C. O.; KUMI-DIAKa. L.; SAROR, D. I. Pathological changes in male genitália of cattle infected with *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense*. **British Vet. J.** 146: 175-180. 1990.

SEKONI, V. O.; REKWOT, P. I.; BAWA E. K. Effects of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infections the reaction time and sêmen characteristics of Zebu (Bunaji) x Friesian crossbreed bulls. **Theriogenology** 61: 55-62. 1994.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brasil. **Anim. Trop. Med. Parasitol.** 66: 25-32. 1972.

SILVA, R.A.M.S.; DA SILVA, J.A.; SCHENEIDER, R.C.; FREITAS, J.; MESQUITA, D.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; D'ÁVILA, A.M.R.; PEREIRA, M.E.D. Outbreak of tripanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 91 (5): 561-562. 1996.

SILVA, R.A.M.S.; DA SILVA, J.A.; FREITAS, J., FREITAS J., MORALES G., EULERT E., YBANEZ R., MONTENEGRO A., D'ÁVILA, A.M.R., RAMIREZ, L. **Tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax* no Brasil e Bolívia: sintomas clínicos, diagnósticos e dados epizootiológicos.** EMBRAPA. Corumbá, MS. 17 p. 1997.

SILVA, R.A.M.S.; Andrew SEIDL, A.; RAMIREZ, L., DÁVILA A.M.R. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle.** Corumbá: Embrapa Pantanal, 141p., 2002.

SILVA R.A.M.S., SANCHEZ V. ; D'ÁVILA A.M.R. **Métodos de Diagnósticos Parasitológicos das Tripanosomoses Bovinas e Equinas.** Embrapa Pantanal, Corumbá. 141p. 2003.

SILVA R.A.M.S., PELLEGRIN A.O., LIMA E.S.S., RAMIREZ. L. & DÁVILA A.M.R. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia.** Doc. 75, Embrapa Pantanal, Corumbá, MS. 30p. 2004.

SILVA R.A.M.S., LIMA E.S.S., RAMIREZ. L. **Quimioterapia das Tripanosomoses ocorrentes no Pantanal.** Embrapa Pantanal, Corumbá, MS. 26p. 2004.

SOUZA, M. C. **Estudos de infecções experimentais por *Trypanosoma (Duttonella) vivax* Ziemann, 1905, em animais domésticos.** 1980, 121p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1980.

VALI, V.E.O.; KIUPEL, M.; BIENZLE, D. Hematopoietic system, pag. 121-124. In: Maxie M. G., Jubb K. V. F., Kennedy P. C & Palmer N. C., (Eds), **Pathology of Domestic Animals: Vol 3. 6th ed.** ed. Elsevier. New York. 2015.

VIEIRA, O.L.E.; MACEDO, L.O.; SANTOS, M.A.B.; SILVA, J.B.A.; MENDONÇA, C.L.;

FAUSTINO, M. A.G.; RAMOS, C. A. N.; ALVES, L. C.; RAMOS, R.A.N.; CARVALHO, G.A. Detecção e caracterização molecular de *Trypanosoma (Duttonella) vivax* em gado leiteiro no estado de Sergipe, no Nordeste do Brasil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, 26 (4): 516-520. 2017.

WELLS E. A., RAMIREZ, L.E., BETANCOURT. A. *Trypanosoma vivax* in Colombia: Interpretation of field results. *Trop. Anim. Health.* 14: 141-150. 1982.

ANEXOS

ANEXO A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, _____

propriedade: _____ telefone: _____, recebi explicações sobre o projeto “ *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Rio de Janeiro” do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, autorizo a realização de necropsias em animais que evoluírem para a morte e de coleta de sangue total dos bovinos da propriedade, estando ciente que minha identidade será preservada e que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na realização dos exames.

Em ____/____/____

Assinatura: _____

ANEXO B: QUESTIONÁRIO

1. Foco: (letra/mês/ano):
2. Identificação da propriedade: (endereço/ localidade, município/proprietário):
3. Espécies de produção/quantidade:
4. Tipo de exploração: () corte / () leite / () mista
5. Uso de ocitocina na ordenha com compartilhamento de agulhas: () sim / () não.
6. Sistema de manejo: () intensivo / () semi-intensivo / () extensivo
7. Manejo nutricional e mineralização:
8. Histórico de entrada de animais (origem) e/ou participação em eventos com aglomeração de animais nos últimos 12:
9. Propriedades adjacentes com casos semelhantes: () sim / () não. Relatar:
10. Infestação por ectoparasitos: () sim / () não; Tipo e intensidade:
11. Esquema de utilizado de drogas endo e ectoparasitárias:
12. Presença de moscas na propriedade: () sim / () não; intensidade:
13. Histórico do início do problema
 - Número de animais que apresentaram sinais clínicos:
 - Idade e fase de produção dos animais acometidos:
 - Todos os animais que adoecem morrem?
 - Quantos animais se recuperaram após apresentarem sinais clínicos:
 - Evolução desde os primeiros sinais clínicos até a morte ou até a recuperação:
14. Sinais clínicos relatados e observados durante as visitas:
() apatia / () mucosas pálidas / () queda de produção / () perda de peso / () diminuição ou perda de apetite / () fraqueza / () emagrecimento progressivo / () diarreia / () cegueira / () opacidade de córnea / () ataxia / incoordenação motora / () tremores musculares / () sialorreia / opacidade de córnea / () lacrimejamento / () aborto / () repetição de cios / () natimortos / () nascimento de crias fracas / () morte / () outros:
15. Percentual de mortes:
16. Percentual de animais que se recuperaram:
17. Percentual de animais com sinais neurológicos: Duração dos sinais neurológicos: Recuperação ou morte:
18. Recidivas de sinais clínicos em animais aparentemente curados: () sim / () não; Intervalo de tempo:
19. Fatores associados com a recorrência da doença:
20. Outras enfermidades e/ou problemas sanitários concomitantes: () sim / () não; Quais:
21. Tratamento de animais para hemoparasitoses: Qual produto/doses/datas: