

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**

**Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu***

**Mestrado em Medicina Veterinária**

**Giovanna Stefani Nosberto Castelli**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TRIPANOSSOMÍASES EM  
GADO LEITEIRO NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

**São Paulo**

**2022**

**Giovanna Stefani Nosberto Castelli**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TRIPANOSSOMÍASES EM  
GADO LEITEIRO NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da  
Universidade– Santo Amaro – UNISA,  
como requisito final para obtenção do  
título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili

**São Paulo**

**2022**

C344d Castelli, Giovanna Stefani Nosberto

Diagnóstico molecular de tripanossomíases em gado leiteiro no estado de Minas Gerais / Giovanna Stefani Nosberto Castelli. – São Paulo, 2022.

52 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina Veterinária) - Universidade Santo Amaro, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

1. Tripanossomíase. 2. Bovinos. 3. Doenças parasitárias. I. Marcili, Arlei, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**PARECER N.31/2021**

**Projeto de Pesquisa: "Diagnóstico molecular de tripanossomíases em gado leiteiro no estado de Minas Gerais"**

**Pesquisador Responsável:** Prof. Arlei Marcili

Giovanna Stefani Nosberto Castelli

**Curso:** Medicina Veterinária

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, deliberando pela **Dispensa** do Projeto **"Diagnóstico molecular de tripanossomíases em gado leiteiro no estado de Minas Gerais"**.

São Paulo, 16 de setembro de 2021.



**PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONOFRIO**

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
UNISA - Universidade Santo Amaro

**Giovanna Stefani Nosberto Castelli**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TRIPANOSSOMÍASES EM  
GADO LEITEIRO NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade– Santo Amaro – UNISA, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili

São Paulo, 27 de janeiro de 2022

**Banca examinadora:**

---

Profº Dr. Arlei Marcili  
Orientador  
Universidade Santo Amaro

---

Profº Drª. Andrea Pereira da Costa  
Universidade Estadual do Maranhão

---

Profº Dr. Herbert de Souza  
Universidade Santo Amaro

Conceito Final: \_\_\_\_\_

Aos amigos e familiares,  
que tornaram o caminho mais leve  
e compreenderam a ausência.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Santo Amaro pela oportunidade de realização de mais um dos meus sonhos.

Ao meu orientador, **Profº Dr. Arlei Marcili** por continuar comigo nessa caminhada. Pela paciência, por todo suporte, pelo conhecimento compartilhado, pelos puxões de orelha e pela amizade construída.

À Fazenda Zuniga, em especial aos animais que fizeram parte do estudo, a veterinária e proprietária **Eveline Zuniga** pela doação das amostras e ao **Profº Herbert de Sousa** pela colaboração nas coletas.

À minha família por todo incentivo e apoio nesses 28 anos de existência, em especial à minha mãe **Sidinéia Nosberto** e meus amados avós, “**dona Maria**” e “**seu Dito**” que sempre tornaram tudo possível em meu caminho.

Aos meus filhos de 4 patas por todo amor oferecido diariamente.

Ao **Ryan Emiliano**, por toda disponibilidade e pelas horas compartilhadas no laboratório. Você é uma das pessoas que eu agradeço por ter cruzado nessa caminhada.

Aos colegas de pesquisa, USP e UNISA, em especial a **Jaciara, Isabella e Thiago**, por toda partilha de conhecimento e companheirismo.

À minha companheira de mestrado, Joysse Wedja por ter partilhado as angústias e as risadas em meio as dificuldades nesses dois anos. Acho que nós conseguimos!

Ao Departamento de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP, pelo uso do laboratório para que parte dos experimentos fossem executados.

Aos professores do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro - UNISA, em especial ao professor **Osimar Sanches** (*in memoriam*), uma das inúmeras vidas perdidas durante a pandemia da COVID-19.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

“É junto dos bão que a gente fica mió!”

**Guimarães Rosa**

## RESUMO

Tripanossomíase é o nome dado as doenças causadas por um grupo de protozoários pertencentes ao gênero *Trypanosoma*. A tripanossomíase bovina é considerada uma doença com grande importância econômica principalmente pelas perdas econômicas provocadas na pecuária. Na América do Sul, *Trypanosoma vivax* é o agente etiológico mais importante para os bovinos. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* em vacas leiteiras de um rebanho localizado em Serranos, município de Minas Gerais. Coletou-se amostras de sangue de 185 animais para diagnóstico molecular através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e diagnóstico parasitológico utilizando meio de cultura constituído por uma fase líquida de meio LIT e por uma fase sólida BAB para *Trypanosoma* spp. Todas as amostras de sangue foram negativas no diagnóstico molecular utilizando os marcadores específicos baseados no gene de Catepsina L-like (0/185). No diagnóstico parasitológico houve o crescimento em 1,62% das hemoculturas (3/185). Os isolados positivos foram caracterizados através da região V7V8 SSUrDNA e no gene de Catepsina L-like, alinhadas e analisadas no BLASTN. As sequências obtidas foram comparadas no GenBank sendo que os isolados nº 107 e nº109 demonstraram um percentual de 100% de similaridade com *T. theileri* na região V7V8 e pelo gene de Catepsina L-like 98,78% e 99,69% de similaridade respectivamente. As sequências obtidas do isolado nº112 demonstraram 99,98% de similaridade com *T. theileri* na região V7V8 e 97% Catepsina L-like.

**Palavras-chave:** Tripanossomíase. *Trypanosoma*. Ruminantes. Doenças parasitárias. Catepsina L-like.

## ABSTRACT

Trypanosomiasis is the name given to diseases caused by a group of protozoa belonging to the genus *Trypanosoma*. Bovine trypanosomiasis is considered a disease with great economic importance, mainly due to the economic losses caused in livestock. In South America, *T. vivax* is the most important etiologic agent for cattle. The objective of this work was to verify the presence of *T. vivax* and *T. theileri* infection in dairy cows from a herd located in Serranos, Minas Gerais. Blood samples were collected from 185 animals for molecular diagnosis by polymerase chain reaction (PCR) and parasitological diagnosis using culture medium consisting of a liquid phase of LIT medium and a solid phase BAB for *Trypanosoma* spp. All blood samples were negative in molecular diagnosis using specific markers based on the Cathepsin L-like gene (0/185). In the parasitological diagnosis, there was a growth in 1.62% of blood cultures (3/185). Positive isolates were characterized through the V7V8 SSUrDNA region and the Cathepsin L-like gene, aligned and analyzed in BLASTN. The sequences obtained were compared in GenBank and isolates nº 107 and nº 109 showed a percentage of 100% similarity with *T. theileri* in the V7V8 region and by the Cathepsin L-like gene 98.78% and 99.69% of similarity, respectively. The sequences obtained from isolate nº112 showed 99.98% similarity with *T. theileri* in the V7V8 region and 97% Cathepsin L-like.

**Keywords:** Trypanosomiasis. *Trypanosoma*. Ruminants. Parasitic diseases. L-like cathepsin

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                          |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Figura 01 – Tripanossomatídeos pertencentes as secções Salivaria e Stercoraria .....     | p. 20 |
| Figura 02 – Morfologia apresentada pelas espécies da família Trypanosomatidae .....      | p. 21 |
| Figura 03 – Sustentador de úbere utilizado pelas vacas lactantes na Fazenda Zuniga ..... | p. 31 |
| Figura 04 – Manta térmica utilizada nos bezerros na Fazenda Zuniga .....                 | p. 31 |
| Figura 05 – Mapa do município de Serranos, estado de Minas Gerais .....                  | p. 33 |

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Primers utilizados para diagnóstico molecular de *T. vivax* e *T. theileri* baseados no gene de Catepsina L-like. .... p. 34

Tabela 02. Resultados obtidos no diagnóstico molecular pela PCR-TthCATL e PCR-TviCATL em amostras de sangue e pela hemocultura em uma fazenda produtora de leite no Estado de Minas Gerais. .... p. 36

Tabela 03. Similaridade encontrada com *T. theileri* dos isolados na análise BLASTN da região V7V8 e do gene de Catepsina L-like..... p. 37

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BAB – Blood Ágar Base

BLASTn - Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool

CatL – Catepsina L-*like*

CBT - Código de identificação na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos;

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid

FFLB - Fluorescent Fragment Length Barcoding

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas

Km - Quilômetro

LIT – Liver Infusion Tryptose

MG – Minas Gerais

Min – Minutos

Pb – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

SSU rDNA – Ácido desoxirribonucleico da pequena subunidade ribossomal (Small Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid);

TGF – Fator de crescimento transformante

°C – Graus Celsius

% – Porcento

® – Marca Registrada

## SUMÁRIO

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                              | 16 |
| 2. JUSTIFICATIVA.....                            | 29 |
| 3. OBJETIVOS .....                               | 30 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....                      | 31 |
| 4.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....           | 31 |
| 4.2 ÁREA DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS ..... | 31 |
| 4.3 ISOLAMENTO <i>Trypanosoma</i> spp. ....      | 34 |
| 4.4 EXTRAÇÃO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....       | 34 |
| 4.5 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO .....           | 34 |
| 5. RESULTADOS .....                              | 36 |
| 6. DISCUSSÃO .....                               | 38 |
| 7. CONCLUSÃO .....                               | 41 |
| REFERÊNCIAS .....                                | 42 |
| ANEXO A – TERMO DE DOAÇÃO                        |    |

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças nos animais afetam de forma significativa o desenvolvimento da pecuária e a morbidade e a mortalidade causada por protozoários representam um desafio à pesquisa e aos programas de saúde (SILVA et al., 2002; AUTY et al., 2015).

As tripanossomíases são enfermidades causadas por protozoários cosmopolitas, que acometem os seres humanos e os animais e pertencem ao gênero *Trypanosoma*. Alguns tripanossomas são altamente patogênicos aos seus hospedeiros, sendo algumas espécies consideradas parasitas importantes na medicina veterinária pelas doenças que causam e pelas perdas econômicas significativas na pecuária (CALZOLARI et al., 2018).

Na América do Sul, os tripanossomas de maior importância na pecuária são: *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi equiperdum*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma theileri* (SILVA et al., 2002)

A tripanossomose causada por *T. vivax* (Ziemann, 1905) é uma doença altamente debilitante que ocasiona perdas econômicas e afeta de forma significativa a pecuária (RODRIGUES et al., 2013; CADIOLI et al., 2012; DYONISIO et al., 2020). No Brasil, foi relatada pela primeira vez em 1946, desde então vem sendo registrada em estados das diversas regiões do país, causando inúmeros prejuízos associado tanto as mortes dos animais quanto ao déficit reprodutivo (BATISTA et al., 2007; CARVALHO et al., 2008).

*T. vivax* é o protozoário causador da tripanossomose bovina sendo transmitido, na América Central e do Sul, de forma mecânica principalmente por dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus sp.* e *Stomoxys sp.* A doença pode ser transmitida também de forma iatrogênica (LOPES et al., 2018).

Os sinais clínicos observados nos animais infectados são anemia, febre, perda de peso, queda na fertilidade e aborto, sintomatologia comum a outras hemoparasitoses o que acaba dificultando o diagnóstico e o tratamento correto (CARVALHO et al., 2008; ANDRADE et al., 2019).

*Trypanosoma theileri* é um tripanossoma cosmopolita e depende principalmente dos artrópodes como vetores, sendo destaque a família

Tabanidae (RODRIGUES et al., 2006). O parasita se desenvolve no tubo digestivo do vetor, que excreta junto com as fezes as formas infectantes que são capazes de infectar o hospedeiro através da penetração das mucosas ou em lesões na pele (WELLS, 1976).

*T. theileri* é considerado um parasita não patogênico, tendo uma maior parasitemia em animais imunocomprometidos, como em casos de vacas prenhas, lactantes e animais com doenças concomitantes (RODRIGUES et al., 2005)

Neste contexto, visando contribuir para a amplificação do conhecimento sobre a expansão dos parasitas, bem como para o crescimento e aprimoramento da bovinocultura no estado de Minas Gerais o objetivo do trabalho foi realizar a detecção molecular de *T. vivax* e *T. theileri* em um rebanho de vacas leiteiras da raça Holandesa, localizado em Minas Gerais.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Gênero *Trypanosoma*

O gênero *Trypanosoma* pertence ao filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, (HONIBGERG, 1963)

O filo Euglenozoa é composto por organismos eucariotos unicelulares que apresentam variadas formas de vida (organismos de vida livre, parasitas facultativos e parasitas obrigatórios) e são classificados em três classes: Kinetoplastea, Euglenoidea e Diplonemea (KOSTYGOV et al., 2021).

A classe Kinetoplastea é dividida em duas subordens: Trypanosomatina e Bodonina, e é composta por protozoários flagelados que apresentam mitocôndria única e uma estrutura constituída por DNA circular (kDNA) denominada cinetoplasto que fica localizado na base flagelar. (BICUDO; MENEZES, 2016).

Os bodonídeos apresentam dois flagelos localizados em lados opostos, cuja diversidade compreende diferentes espécies de vida livre e ainda importantes parasitas de peixes (ZIKOVA, 2003). Já os tripanossomatídeos se caracterizam por possuírem flagelo único e por serem parasitas obrigatórios, cujos hospedeiros variam desde organismos vegetais, invertebrados e vertebrados de diferentes ordens (KAUFER et al., 2017) e são transmitidos por invertebrados hematófagos de diversas ordens e famílias, como mosquitos, moscas, triatomíneos, pulgas e carrapatos, enquanto as espécies parasitas de anfíbios e peixes são transmitidas por sanguessugas e insetos (HOARE, 1972; HAMILTON et al., 2007; SIMPSON et al., 2006)

A depender das formas que apresentam durante seu desenvolvimento, os tripanossomatídeos são sistematicamente agrupados em diversos gêneros distintos. Quatorze destes gêneros (*Angomonas*, *Bleptomonas*, *Jaenimonas*, *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Kentomonas*, *Lafontella*, *Lotmaria*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Strigomonas*, *Novymonas*, *Zelonia* e *Wallacemonas*) compreendem protozoários monoxênicos, onde requerem apenas um hospedeiro em seu ciclo de vida, e cinco gêneros heteroxênicos: *Phytomonas*, que alterna seu ciclo entre insetos fitófagos e hospedeiros vegetais

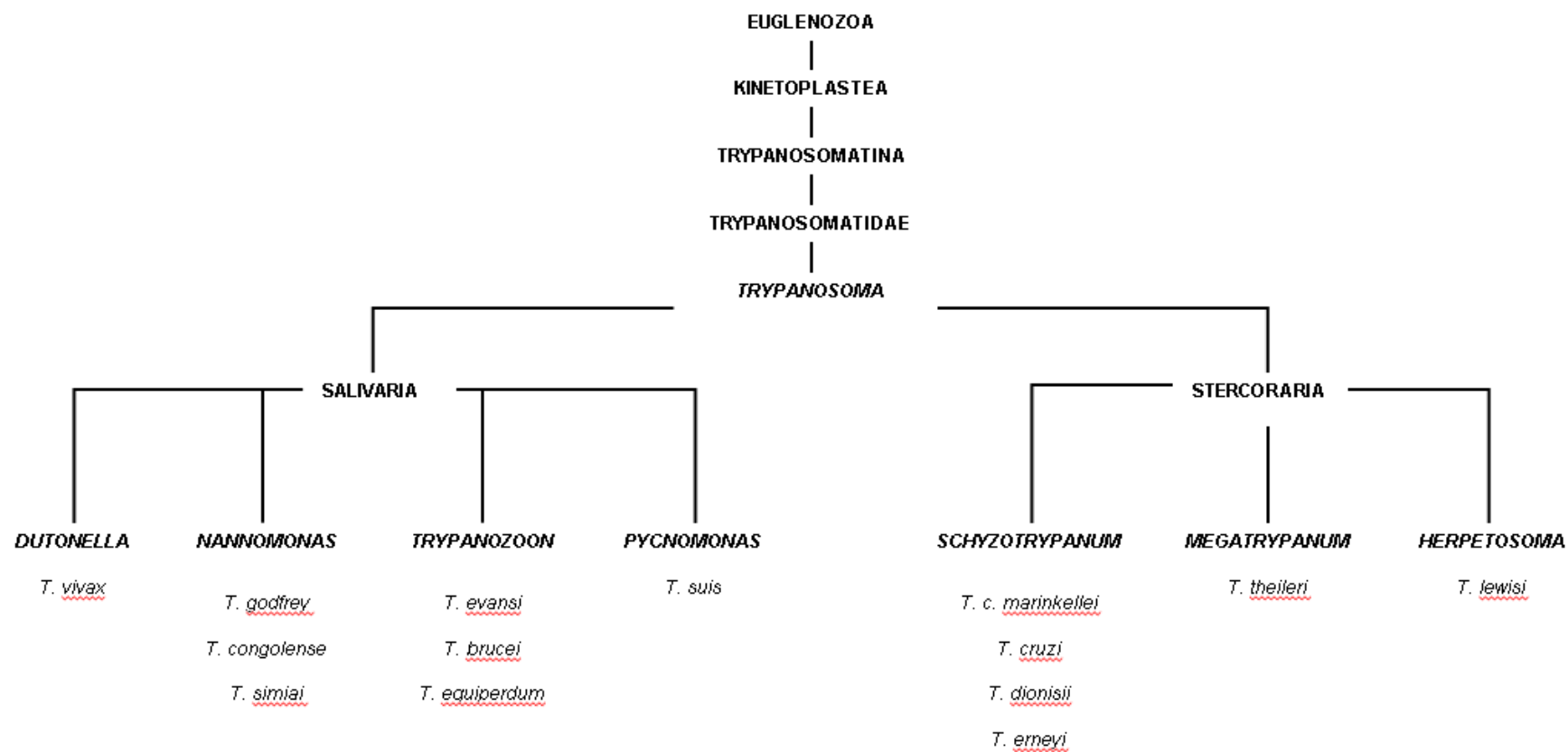
e ainda *Leishmania*, *Porcisia*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma* que alternam entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (geralmente insetos hematófagos) (WALLACE, 1966; VOTÝPKA et al., 2013; VOTÝPKA et al., 2014; KOSTYGOV et al., 2014; HAMILTON et al., 2015; YURCHENKO et al., 2016; BARRATT et al., 2017; KAUFER et al., 2017; ESPINOSA et al., 2018).

O gênero *Trypanosoma* é dividido em duas secções: Salivaria e Stercoraria, de acordo com o local de desenvolvimento do parasita no hospedeiro invertebrado e da via de eliminação da sua forma infectante (HOARE, 1964), conforme apresentado na figura 01.

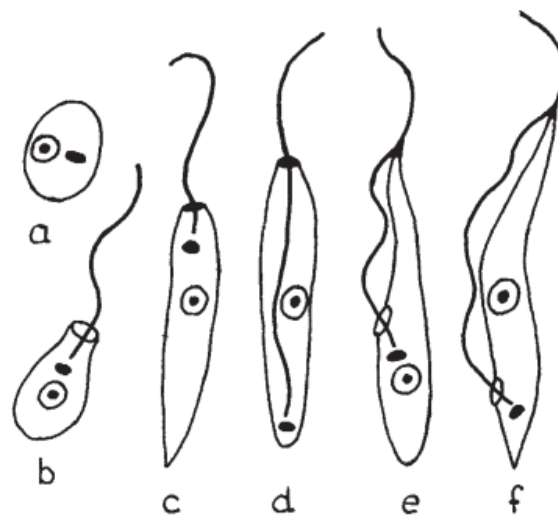
A secção Stercoraria inclui os subgêneros *Schizotrypanum* (espécie-tipo *Trypanosoma cruzi*), *Herpetosoma* (*Trypanosoma lewisi*) e *Megatrypanum* (*Trypanosoma theileri*), se caracterizando por um padrão de desenvolvimento que ocorre exclusivamente no tubo digestivo do inseto vetor, na qual as formas tripomastigotas metacíclicas são eliminadas através das fezes dos vetores infectados (HOARE, 1964; VICKERMAN et al., 1988; ACOSTA et al., 2014).

Na secção Salivaria as espécies se desenvolvem no tubo digestivo e nas glândulas salivares do vetor (exceto *T. vivax* que se desenvolve apenas nas glândulas salivares) e são transmitidas de forma inoculativa através do repasto sanguíneo. Essa secção compreende os subgêneros *Trypanozoon* (espécie tipo *Trypanosoma brucei*), *Pycnomonas* (espécie tipo *Trypanosoma suis*), *Nannomonas* (espécie tipo *Trypanosoma congolense*), e *Duttonella* (espécie tipo *Trypanosoma vivax*) (HOARE, 1964; CORTEZ et al., 2006).

**Figura 01.** Tripanossomatídeos pertencentes as secções Salivaria e Stercoraria.



Morfologicamente as espécies da família Trypanosomatidae podem se apresentar sob 6 formas, variando conforme o gênero: a forma amastigota (a), choanomastigota (b), promastigota (c), opisthomastigota (d), epimastigota (e), e trypomastigota (f), que se distinguem de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante (WALLACE, 1966).



**Figura 1:** Morfologia apresentada pelas espécies da família Trypanosomatidae . (Fonte: WALLACE, 1966)

### ***Trypanosoma vivax***

*T. vivax* é um parasita pleomórfico cuja forma varia durante o ciclo biológico, sendo que a forma tripomastigota é encontrada na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados, principalmente bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos, e a forma epimastigota é encontrada nos dípteros do gênero *Glossina* (moscas tsé-tsé), único hospedeiro invertebrado onde há a multiplicação do parasito (MARTINS et al., 2008).

Morfologicamente este protozoário se caracteriza pela presença de membrana ondulante desenvolvida, flagelo livre e um grande cinetoplasto situado na extremidade posterior, variando entre uma forma circular e elíptica, sendo uma importante característica diagnóstica em esfregaços sanguíneos (HOARE, 1972; OSÓRIO et al., 2008; GONZATTI et al., 2013).

A primeira ocorrência autóctone de *T. vivax* na América ocorreu em 1919 em uma fazenda na Guiana Francesa (BATISTA et al., 2006) sendo que a teoria mais aceita é que o parasita tenha sido introduzido nas Américas em 1830 através de um rebanho bovino oriundo do Senegal trazido para os territórios da Guiana Francesa e das Ilhas de Martinica e Guadalupe (WELLS, 1984).

No Brasil o parasita foi relatado pela primeira vez em bovinos no estado do Pará em 1946 e posteriormente em um búfalo no mesmo estado (SHAW; LAINSON, 1972). Com o aumento do comércio e transporte de bovídeos os surtos da doença passaram a ser recorrentes em diversos estados do Brasil, tais como Tocantins (LINHARES et al., 2006), Maranhão (GUERRA et al., 2008; PEREIRA et al., 2018), Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008) e Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009), conforme detalhado na tabela 01.

O parasita se desenvolve na probóscide do vetor biológico (*Glossina* spp.), onde as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas no esôfago e faringe. Estas formas se multiplicam e sofrem nova diferenciação em tripomastigotas metacíclicas que por sua vez é a forma infectante transmitida através do repasto sanguíneo (HOARE, 1972; OSÓRIO et al., 2008)

As moscas do gênero *Glossina* (Diptera: Glossinidae) são restritas à região da África Subsaariana, exceto por duas regiões na península arábica. As espécies são divididas em 3 grupos de acordo com a sua distribuição geográfica: *G. morsitans* encontradas nas Savanas, *G. palpalis* encontrada nas áreas ripícolas e *G. fusca* encontradas nas áreas florestadas (GUARNERI; SILVA-CARDOSO; ATELLA, 2012; ORJI et al., 2015)

Na América Central e do Sul, *T. vivax* adaptou-se a transmissão mecânica, onde as formas sanguíneas do tripanossoma são transferidas de um mamífero para outro principalmente através de dípteros hematófagos pertencentes as famílias Tabanidae, Stomoxidae e Hippoboscidae, o que

permitiu a disseminação da infecção e a manutenção do parasita na ausência do seu vetor biológico (HOARE, 1972; PAIVA et al., 2000; BATISTA et al., 2007). Sabe-se que o patógeno tem um tempo de sobrevivência reduzido no aparelho bucal do vetor mecânico e que a transmissão é diretamente afetada pelo nível de parasitemia dos hospedeiros vertebrados (GONZATTI et al., 2013).

Carrapatos da espécie *Rhipicephalus (boophilus) microplus* e *Amblyomma cajennense* e piolhos da espécie *Haematopinus tuberculatus* também já foram detectados positivos para a presença do parasito, entretanto seu papel no ciclo de transmissão mecânica de *T. vivax* é ainda desconhecido (BOLIVAR, 2013; DYONISIO et al., 2020).

Outra forma de transmissão é a iatrogênica, através de fômites, que ocorre principalmente pelo compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas entre os animais, hábito muito comum durante a aplicação de ocitocina em vacas leiteiras (BATISTA et al., 2012).

Os animais infectados variam de uma infecção crônica assintomática a uma doença altamente debilitante com alterações hematológicas, sinais neurológicos e óbito, variando em função de fatores associados ao parasita e ao hospedeiro, como imunidade, escore corporal e quantidade de formas infectantes inoculada (VENTURA et al., 2001; ANDRADE et al., 2019), sendo que o período de incubação da doença é variável, em cabras e ovelhas dura em torno de 4 a 12 dias e em bovinos de 9 a 14 dias (CHAMOND et al., 2010; DAGNACHEW; TESSEMA, 2015).

Os bovinos parasitados por *T. vivax* apresentam alta parasitemia durante a fase aguda da infecção, com sinais clínicos poucos específicos como redução na produção leiteira, apatia, anemia profunda, prostração, perda de peso, hipoglicemia, linfadenopatia, abortamentos, cegueira, sinais neurológicos caracterizados por tremores musculares, incoordenação motora e hipermetria (BATISTA et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; SILVA et al., 2009; BATISTA et al., 2012). Animais em fase crônica podem apresentar edema e severa caquexia (SILVA et al., 1996).

Nas fêmeas, a tripanossomíase por *T. vivax* causa anestro temporário ou permanente, partos distócicos, aborto, filhotes com baixo escore corporal e

declínio na produção de leite (OGWU et al., 1984; RODRIGUES et al., 2013). Estudos recentes em ovelhas demonstraram que a prenhez causa um aumento da infecção, levando a uma parasitemia elevada e persistente, seguida de hipertermia. Distúrbios hormonais também são presentes e ocasionados pela degeneração do hipotálamo, hipófise e gônadas, o que resulta na diminuição da secreção de hormônios essenciais nos processos reprodutivos, um exemplo é a progesterona, que apresentou níveis séricos reduzidos em animais infectados (SILVA et al., 2013).

Nos machos *T. vivax* causa lesões principalmente em testículo e epidídimo, o que pode resultar em diminuição da libido, retardo da puberdade, queda na qualidade do sêmen e diminuição do volume seminal (SEKONI; REKWOT; BAWA, 2004).

### ***Trypanosoma theileri***

A espécie tipo do subgênero *Megatrypanum* é o *T. theileri* (Leveran 1902), parasita que infecta bovídeos domésticos e silvestres, porém relatos recentes indicam que a espécie se adaptou a um novo hospedeiro, os morcegos (RAMÍREZ; 2014).

*T. theileri* possui ampla distribuição mundial e elevada prevalência no Brasil, além de uma grande diversidade gênica (RODRIGUES et al., 2010). O parasito foi registrado pela primeira vez em bovinos no continente africano em 1902 (AMARAL et al., 2021).

As espécies deste grupo apresentam significativa especificidade pelo seu hospedeiro vertebrado. É considerado sinônimo de *T. theileri* as espécies que parasitam exclusivamente bovinos e *T. theileri-like* os que parasitam as espécies de *Artiodactyla* que não bovinos (AMARAL et al., 2021).

Morfologicamente, *T. theileri* é considerado um tripanosoma grande, podendo chegar a 100 µm de comprimento, apresenta região posterior afilada, um grande cinetoplasto localizado próximo ao núcleo, uma membrana ondulante bem desenvolvida e flagelo livre longo (HOARE, 1964)

No Brasil, estudos demonstraram pelo menos 5 genótipos principais de *T. theileri*, distribuídos em duas linhagens principais, TthI e TthII. A linhagem TthI compreende os genótipos IA, de búfalos e IB de bovinos das regiões Sudeste e Centro Oeste, e o genótipo IC restrito a bovinos da região Sul do país. A linhagem TthII compreende os genótipos bovinos IIA, restritos às regiões Norte e Nordeste e a linhagem IIB encontrada nas regiões Centro-oeste, Norte e Nordeste (RODRIGUES et al., 2003).

A espécie *T. theileri* possui distribuição cosmopolita, sendo o parasita de bovinos mais prevalente no mundo, com exceção da Antártida (RODRIGUES et al., 2003), sendo descritos em diversas regiões do Brasil, possivelmente relacionado a grande distribuição do vetor, os tabanídeos e dos seus hospedeiros naturais, os bovinos domésticos (BOSE, 1993; RODRIGUES et al., 2005; PACHECO et al., 2018). Já relataram a ocorrência de formas epimastigotas de um tripanosomatídeo na hemolinfa de um carrapato do bovino *Rhipicephalus (boophilus) microplus* no estado do Rio Grande do Sul e através de evidências morfológicas tratava-se de *T. theileri* (MARTINS et al., 2008).

Os tabanídeos (Tabanidae – Diptera) são os vetores naturais de *T. theileri* e o desenvolvimento do parasita no vetor é característico dos tripanossomas da secção estercoraria, ou seja, restrito ao intestino e a transmissão para o hospedeiro ocorre através da penetração das formas tripomastigotas metacíclicas (originadas a partir da diferenciação celular de formas epimastigotas no intestino do inseto vetor) pela lesão da picada, abrasões na pele ou a ingestão das fezes ou do próprio vetor (BOSE et al., 1987).

Diversas observações de *T. theileri* em linfonodos, baço, rins e cérebro sugerem que essa espécie possa ter locais de desenvolvimento extravascular, evadindo assim da resposta imune dos hospedeiros (BRAUN; ROGG; WALSER, 2002; TIZARD, 1980).

Segundo Lee et al (2013) o parasita tem a capacidade de invadir células fagocíticas e não fagocíticas, induzir o aumento de níveis de cálcio intracelular e expressar o fator de transformação do crescimento do tipo 1 (TGF-1) em células de mamíferos, levando a uma forte conservação evolutiva no processo de invasão celular.

O período de incubação é variável (1-3 semanas), sendo o nível de parasitemia determinado pela resposta imunológica do animal. Geralmente a infecção por *T. theileri* resulta em uma parasitemia baixa, o que dificulta a sua visualização em esfregaços sanguíneos, e embora sejam considerados não patogênicos, esses parasitas possuem uma patogenia potencial para hospedeiros imunocomprometidos, animais submetidos a grande estresse físico e nutricional, que apresentem infecções concomitantes com outros hemoparasitas ou parasitas gastrointestinais e para vacas em período gestacional, na qual a parasitemia pode se tornar elevada e resultar em abortamentos e/ou morte do recém-nascido (VILLA et al., 2008; MARTINS et al., 2008; RODRIGUES et al., 2005).

## DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da tripanossomíase pode ser realizado com base nos sinais clínicos associados a métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. O diagnóstico clínico é baseado em sinais como: febre, anemia, palidez das mucosas, lacrimejamento, emagrecimento e diminuição da produtividade, porém esses sintomas podem ser confundidos com outras hemoparasitoses, como babesiose e anaplasmose (HOARE, 1972; OSÓRIO et al., 2008; SNAK; OSAKI, 2019), por isso para diagnóstico definitivo é necessário a utilização de metodologias de maior acurácia.

Dentre os testes parasitológicos mais empregados no Brasil é possível citar o esfregaço sanguíneo, o método de microhematócrito de Woo, método de esfregaço sanguíneo com a camada leucocitária de *Buffy coat* e o aspirado de linfonodo, esta utilização é justificada pela facilidade de realização a campo e pelo menor custo, porém possuem uma baixa especificidade e sensibilidade principalmente quando a carga parasitária é baixa (WOO, 1970; MURRAY, 1977; SILVA et al., 2002; CORTEZ et al., 2009)

As principais técnicas sorológicas utilizadas atualmente são o teste imunoenzimático de ELISA e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). O teste de ELISA indireto é bastante utilizado por ser simples e útil para avaliação de um número grande de animais (OSÓRIO et al., 2008; GONZATTI et al., 2013).

A RIFI tem mostrado boa sensibilidade, mesmo assim recomenda-se a associação de dois métodos diagnósticos, haja visto que a presença de anticorpos não significa necessariamente que a infecção esteja ativa no animal (BASSI et al., 2018).

Para o diagnóstico molecular pode ser utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando marcadores de microssatélites (MASIGA et al., 1992; MORLAIS et al., 2001), técnicas de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) baseadas em distintas enzimas de restrição (GEYSEN; DELESPAUX; GEERTS, 2003), técnicas de marcação de polimorfismo com sondas de fluorescência intituladas FFLB (fluorescent fragment length barcoding) (HAMILTON et al., 2011) e ainda técnicas de amplificação convencional e em tempo real (FIDELIS JUNIOR et al., 2019).

As metodologias de amplificação molecular podem estar baseadas em diversos marcadores, como genes ribossomais, genes dos espaçadores internos ITS e ainda em genes responsáveis por codificar proteínas de alta função biológica como proteínas de transporte de glicose e proteínas envolvidas na invasão celular e evasão da resposta imune como a catepsina L-like (DESQUESNES et al., 2001; MADRUGA et al., 2006; CORTEZ et al., 2009).

## **TRATAMENTO**

O tratamento depende do uso racional de medicamentos disponíveis no mercado, sendo importante o diagnóstico correto e a identificação do parasita envolvido na infecção para evitar o estabelecimento da resistência aos antiparasitários (STEVENSON et al., 2000)

No Brasil os dois medicamentos mais utilizados no tratamento da tripanossomose em bovinos, ovinos e caprinos são o aceturato de diminazeno e o cloreto de isometamidium (GONZATTI et al., 2013; GERMANO et al., 2018), entretanto o tratamento não assegura eliminação completa do parasita, podendo haver reativação da infecção em situações de comprometimento imunológico (LINHARES et al., 2006) e mesmo assim nenhuma droga nova foi desenvolvida para o tratamento da tripanossomose nos últimos 50 anos.

Alguns estudos já demonstram a resistência com recidiva clínica ao tratamento com acetato de diminazeno, sendo o cloreto de isometamidium atualmente a droga de escolha (CADIOLI et al., 2012; GIORDANI et al., 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA

No Brasil, o leite é um dos seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, sendo essencial na alimentação e na geração de emprego e renda para a população. O país é o terceiro maior produtor mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e Índia e detém o segundo maior rebanho de vacas ordenhadas do mundo (JUNG; JÚNIOR, 2016).

Na produção regional a região Sudeste do Brasil lidera em números de vacas ordenhadas com mais de 4,7 milhões de animais e o estado de Minas Gerais lidera esse dado com um rebanho de aproximadamente 3,1 milhões de vacas, sendo responsável pela produção de 6,509 bilhões de leite inspecionado, participando de 25,5% na produção nacional (EMBRAPA, 2021)

Muitos aspectos relacionados à sanidade dos rebanhos são essenciais para obtenção de bons índices de produtividade, maior segurança e qualidade para o consumidor final e as doenças que atingem a reprodução animal estão disseminadas pelos rebanhos brasileiros desempenhando um papel importante nos distúrbios reprodutivos (RODRIGUES et al., 2013).

A tripanossomíase possui um alto impacto econômico e social, e esse impacto vem aumentando gradativamente devido ao deslocamento de animais e a presença de vetores mecânicos, o que favorece a disseminação do agente (GIORDANI et al., 2016). Sabe-se que vacas infectadas com *Trypanosoma theileri* apresentam maiores taxas de abortamento quando comparadas as vacas não infectadas (KINGSTON et al., 1982).

Dada a importância da produção de leite no país, a necessidade de aumentar a produção e melhorar a qualidade do leite para um mercado consumidor cada vez mais exigente, surge a preocupação dos produtores para o êxito da atividade leiteira (OLIVEIRA; SILVA 2012; COSCIONI; PEGORO, 2005).

Nesse sentido, a adoção de medidas de biossegurança e monitoramento de doenças na propriedade são de suma importância para as medidas de controle, além da prevenção e da promoção do bem-estar animal.

### 3. OBJETIVOS:

#### GERAL:

- Diagnóstico parasitológico e molecular de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* em bovinos de uma fazenda produtora de leite, localizada na região sul do Estado de Minas Gerais.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS:**

##### **4. 1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Santo Amaro – Unisa sob o parecer nº 31/2021.

##### **4. 2. ÁREA DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

Para o estudo foram coletadas amostras sanguíneas de 185 vacas da raça holandesa mantidas na Fazenda Zuniga, produtora de leite há mais de 20 anos, localizada em Serranos - MG.

O município de Serranos localiza-se no sul do estado de Minas Gerais (21° 13' 36" de latitude sul e 44° 05' 09" de longitude oeste), e compreende uma área de 330 km<sup>2</sup>, apresentando um território montanhoso e uma população estimada em 1.996 habitantes segundo o último censo do IBGE (2010).

A propriedade possui 160 hectares de extensão e atualmente possui 210 animais criados sob o sistema de Compost Barn, onde os animais são criados em um grande galpão possibilitando que os animais caminhem e que possam descansar de forma livre.

A propriedade conta também com um programa voltado para o bem-estar animal, onde as vacas lactantes utilizam um sustentador de úbere e os bezerros mantas térmicas.

**Figura 3.** Sustentador de úbere utilizado nas vacas em lactação.

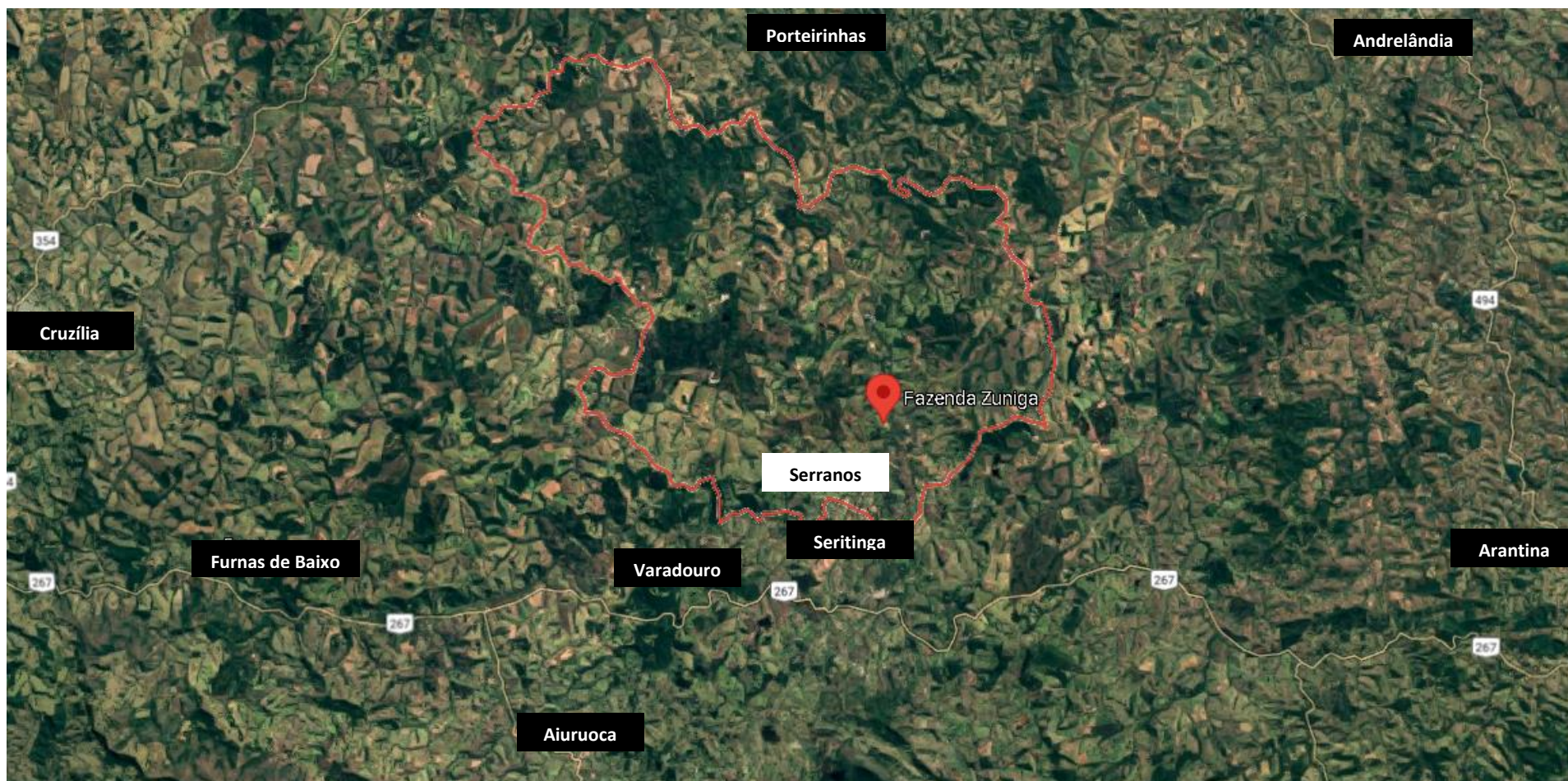


**Figura 4.** Manta térmica utilizada nos bezerros.



As amostras de sangue foram coletadas das veias mamárias para os animais em lactação e da caudal para as não lactantes, acondicionadas em tubos do tipo vacutainer com EDTA e disponibilizadas para a análise através de uma carta de doação (anexo 1), pela médica veterinária e dona da propriedade, Dra. Eveline Zuniga.

Figura 05 – Mapa da localização geográfica do município de Serranos, Estado de Minas Gerais.



### 4. 3. ISOLAMENTO DE *Trypanosoma* spp.

Amostras de sangue coletadas por punção foram inoculadas em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (*blood agar* base com 10% sangue de coelho) e fase líquida de meio LIT (*Liver infusion triptose*), contendo soro fetal bovino e antibióticos (CAMARGO, 1964) em estufa com temperatura a 28°C e analisados uma vez por semana pelo período de 3 meses.

### 4. 4. EXTRAÇÃO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O DNA foi extraído diretamente do sangue utilizando o kit PureLink Genomic DNA (Thermo Fisher) conforme as especificações do fabricante e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro miniaturizado do tipo Nanodrop.

Para detecção de *T. vivax* e *T. theileri* utilizou-se marcadores baseados no gene de catepsina L-like e realizada corrida eletroforética em gel de agarose à 1,5% (CORTEZ et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010)

Tabela 01. Primers utilizados para diagnóstico molecular de *T. vivax* e *T. theileri* baseados no gene de Catepsina L-like.

|                    | Primer   | Pb   | PCR              | Referência             |
|--------------------|----------|------|------------------|------------------------|
| <i>T. vivax</i>    | DTO155   | ~500 | 94° desnaturação | Cortez et al., 2009    |
|                    | TviCatL1 |      | 56° anelamento   |                        |
|                    |          |      | 72° extensão     |                        |
| <i>T. theileri</i> | DTO155   | ~273 | 94° desnaturação | Rodrigues et al., 2010 |
|                    | TthCatL1 |      | 65° anelamento   |                        |
|                    |          |      | 72° extensão     |                        |

### 4. 5. PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

O DNA extraído dos isolados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com Sybr Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific). Os amplificadores foram purificados utilizando o ExoSAP-IT® (Applied Biosystems), e os fragmentos de DNA amplificados e purificados foram

submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator® (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer® (Perkin Elmer). As reações de sequenciamento foram 30 ciclos: 15 s 96°C; 15 s 50°C; 4 min 60°C, com um ciclo inicial de 1 min 96°C.

As sequências obtidas nos dados brutos de sequenciamento foram refinadas no software SeqMan e alinhadas através das ferramentas do software ClustalX com edição e ajustes manuais realizados no software GeneDoc (THOMPSON et al., 1997; NICHOLAS et al., 1997). As sequências gênicas alinhadas foram analisadas no BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997) no intuito de verificar sequências com elevada homologia.

## 5. RESULTADOS

As análises moleculares pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas nas 185 amostras de DNA extraídas de sangue dos animais e testadas com os marcadores baseados no gene de catepsina L-like para *T. theileri* (TthCatL) e *T. vivax* (TviCatL) sendo todas negativas.

Na hemocultura houve o crescimento de *Trypanosoma* spp. em 1,62% (3/185). As características morfológicas eram sugestivas *T. theileri*. Os isolados passaram pelo processo de criopreservação, posteriormente realizou-se a extração de DNA e diagnóstico molecular através da PCR utilizando os marcadores do gene de catepsina L-like para *T. theileri*, obtendo resultado positivo para os três isolados.

Tabela 02. Resultados obtidos no diagnóstico molecular pela PCR-TthCATL e PCR-TviCATL em amostras de sangue e pela hemocultura em uma fazenda produtora de leite no Estado de Minas Gerais.

| Diagnóstico          | Nº animais positivos |
|----------------------|----------------------|
| <i>TviCatL</i> - PCR | 0% (0/185)           |
| <i>TthCatL</i> - PCR | 0% (0/185)           |
| Hemocultura          | 1,62% (3/185)        |

Os isolados positivos (3/185) foram caracterizados através da região V7V8 SSUrDNA e no gene de Catepsina L-like e as sequências foram alinhadas e analisadas no Blastn e as sequências gênicas obtidas foram comparadas com outras sequências obtidas do GenBank, sendo que os isolados nº 107 e nº109 demonstraram um percentual de 100% de homologia com *T. theileri* na região V7V8 e pelo gene de Catepsina L-like 98,78% e 99,69% de similaridade respectivamente. As sequências obtidas do isolado nº112 demonstraram 99,98% de similaridade com *T. theileri* na região V7V8 e 97% Catepsina L-like.

A partir das sequências de DNA do gene V7V8 SSU rRNA verificou-se que os três isolados pertencem ao genótipo TthII e pelas sequências do gene de Catepsina os isolados nº 109 e nº 112 pertencem a linhagem IIF. O isolado nº

107 a sequência ainda não foi posicionada, não sendo possível afirmar a linhagem correta.

Tabela 03. Similaridade encontrada com *T. theileri* dos isolados na análise BLASTN da região V7V8 e do gene de Catepsina L-like.

| <i>Marcador</i>  | Nº isolado | Identificação da propriedade | Nº de acesso (GenBank) | Similaridade |
|------------------|------------|------------------------------|------------------------|--------------|
| <i>V7V8</i>      | CBT320     | 107                          | T. theileri JX178182   | 100%         |
|                  | CBT 321    | 109                          | T. theileri JX178182   | 100%         |
|                  | CBT 322    | 112                          | T. theileri jJX178182  | 99,88%       |
| <i>Catepsina</i> | CBT320     | 107                          | T. theileri MK393794   | 98,78%       |
|                  | CBT 321    | 109                          | T. theileri AB930159   | 99,69%       |
|                  | CBT 322    | 112                          | T. theileri AB930159   | 97%          |

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no estudo confirmaram a circulação de *T. theileri* no rebanho de fêmeas bovinas estudado (3/185) e atualmente existem poucos relatos sobre a epidemiologia e a importância clínica desse patógeno nos rebanhos brasileiros.

O primeiro relato de *T. theileri* no Brasil ocorreu no estado de São Paulo, por Carini em 1911 e posteriormente em 1980 ele foi detectado parasitando um bezerro (CORREA et al., 1980).

Alguns relatos mais recentes no país ocorreram no estado do Rio Grande do Sul, na qual uma propriedade localizada no município de Caçapava do Sul realizou um estudo com 37 animais, tendo 9 animais positivos (24,3%) e todos os animais positivos eram assintomáticos apresentando um bom score corporal (BRUM et al., 2012).

No estado de Rondônia entre os anos de 2012 e 2013 Pacheco et al. (2018) verificou uma prevalência em 4,06% das hemoculturas e 12,19% na PCR específica para *T. theileri* baseado no gene da Catepsina L-like. Outro relato com 68 bovinos oriundos de propriedades de pequeno porte realizado no extremo sul do Estado de São Paulo demonstrou uma positividade de 17,6% na PCR utilizando o mesmo marcador e 5,8% no diagnóstico parasitológico (AMARAL et al., 2021).

Os resultados obtidos no presente estudo foram de 1,62% (3/185) de positividade no diagnóstico parasitológico e todos os animais negativos no diagnóstico molecular. Essa diferença de sensibilidade entre as técnicas pode ser justificada pela baixa parasitemia da infecção causada por *T. theileri* e pelo fato de o meio de cultura fornecer condições para o crescimento e desenvolvimento do parasita levando a um aumento da carga parasitária na hemocultura.

As análises de diversidade genética de *T. theileri* dos isolados obtidos na Fazenda Zuniga demonstraram através da sequência do gene V7V8 sSU rDNA a presença do genótipo ThII e dois dos isolados (nº 109 e nº 112) pertencem a linhagem IIF, genótipos previamente identificados em bovinos nos Estados

Unidos, Vietnam, Japão e Sri Lanka (FISHER et al., 2013; YOKOYAMA et al., 2015; SUGANUMA et al., 2019).

As infecções de *T. theileri* são caracterizadas por uma baixa parasitemia e por ser considerado um parasita não patogênico em casos de suspeita de tripanossomíase bovina muitas vezes não se investiga a presença desse parasita como agente causador da infecção, dessa forma uma investigação pode ser importante para minimizar os prejuízos econômicos que essa doença silenciosa pode gerar na pecuária.

Mesmo nenhum animal do estudo sendo positivo no diagnóstico molecular específico para *T. vivax* no estado de Minas Gerais é possível verificar a expansão da doença que nos últimos anos foi diagnosticada em diversas mesorregiões do estado, mesmo com baixo número de animais afetados nos rebanhos (REIS et al., 2019).

O primeiro relato da ocorrência de *T. vivax* no estado de Minas Gerais ocorreu no ano de 2007, no município de Igarapé. A região era considerada livre da doença e os estudos epidemiológicos no Brasil eram voltados para as áreas endêmicas, principalmente a região do Pantanal (CARVALHO et al., 2008). Após esse primeiro relato surtos de tripanossomíase foram relatados no mesmo estado (CUGLOVICI et al., 2010; FRANGE et al., 2013; REIS et al., 2019).

*T. vivax* já foi relatado em diversos estados brasileiros como Pará (SHAW; LAINSON, 1972), Mato Grosso (PAIVA, 2000), Paraíba (BATISTA et al., 2007), Tocantins (LINHARES et al., 2006), Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008), Maranhão (GUERRA et al., 2008. PEREIRA et al., 2018), São Paulo (CADIOLI et al., 2012), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009), Pernambuco (GUERRA et al., 2013), Alagoas (ANDRADE et al., 2019) e outros.

No Brasil, o comércio de animais após a abertura das rodovias nos anos 90 interligando as regiões Norte e Centro-oeste foi apontado como responsável pela disseminação do parasito no Pantanal e há um consenso que o transporte de animais é o principal fator de risco para distribuição da tripanossomose (DÁVILA E SILVA, 2000; MADRUGA 2009).

Ainda não há evidências da possível introdução de *T. vivax* nos rebanhos brasileiros, mas é possível que tenha ocorrido pela compra de animais de outras regiões endêmicas portadores da doença na forma subclínica, que permitiu a expansão da doença dentro das propriedades pelo uso compartilhado de agulhas, prática comum na atividade leiteira principalmente pela aplicação de ocitocina exógena.

## **7. CONCLUSÃO**

Foi verificada a circulação de *T. theileri*, genótipo TthII e linhagem IIF no rebanho de vacas leiteiras da Fazenda Zuniga, no município de Serranos – Minas Gerais.

## REFERÊNCIAS

ACOSTA, A et al., Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in Wild and Domestic Animals in an Atlantic Rainforest Fragment and Surroundings in the State of Espírito Santo, Brazil, *J. Med. Entomol.* 2014; 51(3):686–693.

ANDRADE, A et al. Diagnostic, Clinical and Epidemiological aspects of dairy cows naturally infected by *Trypanosoma vivax* in the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v. 41, 2019.

ALTSCHUL, S.F et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(17): 3389-4021.

AUTY, H et al. Cattle trypanosomosis: the diversity of trypanosomes and implications for disease epidemiology and control. *Rev Sci Tech.* 2015 Aug;34(2):587-98. doi: 10.20506/rst.34.2.2382

BARRATT, J. et al. Isolamento do novo tripanossomatídeo, *Zelonia australiensis* sp. nov. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Fornece Suporte para uma Origem Gondwana de Parasitismo Dixenoso em Leishmaniinae. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 2017.

BASSI, P. B. et al. Parasitological and immunological evaluation of cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Experimental Parasitology**, v. 185, 2018.

BATISTA, J. S. et al. Infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, 2006.

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

BATISTA, J. S. et al. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, 2012

BOLIVAR, A. M. Detección de *Anaplasma marginale* y *Trypanosoma vivax* en garrapatas de ganado bovino empleando la reaccion en cadena de la polimerasa. **REDVET Revista Eletronica de Veterinária**, v. 14, n. 3, 2013

BÖSE, R. et al. Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. **Parasitol Res** 73, 421–424 (1987). <https://doi.org/10.1007/BF00538199>

BÖSE, R. et al. Characterization of Megatrypanum trypanosomes from European Cervidae. **Parasitol.** 1993;107:55- 61

BRAUN, U. et al. Trypanosoma theileri in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. **Veterinary Research**, v. 150, p. 18-19, 2002.

BRUM, I. et al. *Trypanosoma theileri* in cattle herd of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 2, p. 197–199, 2012

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

CALZOLARI, M. et al. Isolation of a Trypanosome Related to Trypanosoma theileri (Kinetoplastea: trypanosomatidae) from phlebotomus perfiliewi (diptera). **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2018, p. 1-8, 15 jul. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/2597074>.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, 6:93-100, 1964

CARINI, A. Présence de trypanosomes chez bovidés, à São Paulo. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 4, p. 191-192, 1911.

CARVALHO, A. et al. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, jun. 2008.

CHAMOND, N. et al. *Trypanosoma vivax* Infections: Pushing Ahead with Mouse Models for the Study of Nagana. I. Parasitological, Hematological and Pathological Parameters. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, 2010.

CORTEZ, A. et al. Cathepsin L-like genes of Trypanosoma vivax from Africa and South America – characterization, relationships and diagnostic implications. **Molecular And Cellular Probes**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 44-51, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003>

CORTEZ, A. P. et al. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitology**, v. 133, n. 02, 2006

COSCIONI, A. C.; PEGORO, L. M. C. A nutrição e a reprodução de bovinos de leite. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, documentos 139, 2005, 15p.

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

DA SILVA, A. S. et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2550–2554, 2009.

DAGNACHEW, S.; TESSEMA, M. B. *Trypanosoma vivax*. **African Journal of Basic & Applied Science**, v. 7, n. 1, p. 41–64, 2015.

DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Animal Trypanosomiasis in South America: Current Status, Partnership, and Information Technology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, n. 1, p. 199–212, 2006.

DE ANDRADE, A. Q. et al. Diagnostic, Clinical and Epidemiological aspects of dairy cows naturally infected by *Trypanosoma vivax* in the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, 2019.

DE M. BICUDO, C. E.; MENEZES, M. Phylogeny and Classification of Euglenophyceae: A Brief Review. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 4, 2016.

GUERRA, R. M. S. N. C. et al. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, 2008.

DE SOUZA PIMENTEL, D. et al. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2–4, abr. 2012.

DESQUESNES, M. et al. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, 2001.

DOS SANTOS AMARAL, D. et al. Diagnóstico parasitológico e molecular de *Trypanosoma theileri* em bovinos amostrados no extremo sul de São Paulo, SP, Brasil. **Brazilian Journal of Global Health**, v. 01, n. 03, p. 32–34, 2021.

DYONISIO, G.H.S. et al. Molecular Diagnosis and Prevalence of *Trypanosoma vivax* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) in Buffaloes and Ectoparasites in the Brazilian Amazon Region. *J Med Entomol*. 2021 Jan 12;58(1):403-407. doi: 10.1093/jme/tjaa145. PMID: 32696974.

EMBRAPA. **Anuário do Leite: saúde única e total**. 2021

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, 2018.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO STAT - Livestock Primary. Roma, Italy, 2019. Disponível em: . Acesso em: 28 mar. 2019

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

FRANGE, R.C.C. Tripanossomíase em vacas na microrregião de Uberaba - MG: estudo soropidemiológico e relato de surto. 2013. Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos) - Universidade de Uberaba, Uberaba - MG. Disponível em [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SMOC-AAQNS4/rodrigo\\_melo\\_meneses.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SMOC-AAQNS4/rodrigo_melo_meneses.pdf?sequence=1), acesso em agosto 2016.  
» [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SMOC-AAQNS4/rodrigo\\_melo\\_meneses.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SMOC-AAQNS4/rodrigo_melo_meneses.pdf?sequence=1)

GERMANO, P. H. V. et al. Tripanossomose bovina: Revisão. **Pubvet**, v. 12, n. 8, 2018.

GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR–RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 110, n. 3–4, jan. 2003

GIORDANI, F. et al. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology**, v. 143, n. 14, 2016.

GONZATTI, M. I., et al. *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In: GONZATTI, M. I., et al. **Trypanosomes and Trypanosomiasis**. Springer, p. 261-285 Vienna, 2014.

GUARNERI, A. A.; SILVA-CARDOSO, L.; ATELLA, G. Interação Parasito-Vetor (Tripanossomatídeos). **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**, 2012.

GUERRA, R. M. S. N. C. et al. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. *Ciência Rural*, v. 38, n. 3, jun. 2008.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol Phylogenet Evol*, n. 44, p. 15–25, 2007

HAMILTON, P. B. et al. Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 11, n. 1, jan. 2011.

HOARE, C. A. *The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph*. Oxford: Blackwell, 1972.

HONIGBERG, B. M.. Evolutionary and Systematic Relationships in the Flagellate Order Trichomonadida Kirby\*. **The Journal Of Protozoology**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 20-63, fev. 1963. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1963.tb01635.x>

JÚNIOR, A. A. M.; JUNG, C. F. Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Ágora**, v. 19, n. 1, p. 34, 2017.

JUNIOR, O. L. F. et al. Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 2, 2019.

KAUFER, A. et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.

KINGSTON, N.; SWIFT, B.; NELMS, G. Experimental and natural transplacental transmission of *Trypanosoma theileri* and its possible effects on the bovine fetus.

**Journal of the helminthological society of Washington**, v. 49, p. 161-164, 1982.

KOSTYGOV, A.Y.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A; MALYSHEVA, M.N; FROLOV, A.O; YURCHENKO, V. Molecular revision of the genus *Wallaceina*. *Protist* 165: 594–604; 2014.

LEE, Y. F. et al. Evidence of intracellular stages in *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in non- phagocytic mammalian cells. **Veterinary Parasitology**, v. 191, p. 228– 239, 2013.

LINHARES, G. F. C.; FILHO, F. C. D.; FERNANDES, P. R.; DUARTE, S. C. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 455–460, out. 2006.

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

MADRUGA, C. R. et al. Comparação de métodos de extração do DNA e avaliação de reações da polimerase em cadeia (PCR) para o diagnóstico de *Trypanosoma (Dutonella) vivax*. *Circular Técnica* 34, 2006.

MADRUGA, C. R. EPIDEMIOLOGIA DO *Trypanosoma vivax* NO BRASIL. **Ciência Animal Brasileira**, [S. l.], v. 1, 2009. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/7668>. Acesso em: 14 jan. 2022.

MARTINS, J.R.; LEITE, R.C.; DOYLE, R.L.. Tripanosomatídeos semelhantes a *Trypanosoma theileri* no carrapato dos bovinos *Boophilus microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Veterinário**. (Online), Jaboticabal, v. 17, n. 2, pág. 113-114, junho de 2008.

MARTINS, C. F. et al. *Trypanosoma vivax* infection dynamics in a cattle herd maintained in a transition area between Pantanal lowlands and highlands of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, 2008.

MASIGA, D. K. et al. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 7, nov. 1992.

MURRAY, M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE**, v. 71, n. 4, 1977

MORLAIS, I. New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. **Acta Tropica**, v. 80, n. 3, dez. 2001.

OGWU, D. et al. Effects of experimental on fertility of heifers. **Theriogenology**, v. 22, n. 6, 1984.

OLIVEIRA, L. F. T.; SILVA, S. P. S. Mudanças Institucionais e Produção Familiar na Cadeia Produtiva do Leite no Oeste Catarinense. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 50, n. 4, p.705-720, 2012

ORJI, C. U. et al. Molecular identification of tsetse fly (Diptera: Glossinidae) species based on mitochondrial DNA (COII and CytB) sequences. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 19, p. 1605–1613, 2015.

OSÓRIO, A. L. A. R. et al. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, 2008

PACHECO, T.A et al. Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma (Megatrypanum ) theileri* in cattle in Brazil's western Amazon region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 579-583, 16 ago. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-296120180049>.

PAIVA, F. et al. *Trypanosoma vivax* em bovinos no pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: i – acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 135–141, 2000.

PEREIRA, H.D et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.5, p. 896-901, 2018.

RAMÍREZ, J. D. et al. Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 22, p. 250–256, 2014.

RODRIGUES, C. M. F. et al. Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 1–2, 2013.

RODRIGUES, C.M.F et al. Degeneração folicular em ovários de cabras experimentalmente infectadas com *Trypanosoma vivax* do semi-árido brasileiro. **Veterinary Parasitology**, 191 (1-2), 146-153. 2013 doi: 10.1016 / j.vetpar.2012.08.001

RODRIGUES, A.C. et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. **Vet Parasitol.** v.116(3) p. 185-207, 2003.

RODRIGUES, A. C. et al. Phylogeny of *Trypanosoma* ( *Megatrypanum* ) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*, [S.L.], v. 132, n. 02, p. 215, 3 out. 2005. **Cambridge University Press** (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182005008929>.

RODRIGUES, A.C. et al. Cysteine proteases of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for 20 phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. **Parasitology International**, [S.L.], v. 59, n. 3, p. 318-325, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2010.03.002>.

SEKONI, V. O.; REKWOT, P. I.; BAWA, E. K. Effects of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infections on the reaction time and semen characteristics of Zebu (Bunaji) × Friesian crossbred bulls. **Theriogenology**, v. 61, n. 1, 2004.

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

SILVA, R. A. M. S. et al. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 5, 1996.

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

SILVA, R.A.M.S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A.M.R. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia, Diagnóstico e Controle. EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Corumbá, Brasil, 2002. 140 p.

SILVA, A. S. DA et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2550–2554, nov. 2009.

SIMPSON, A.G.B., STEVENS, J.R., LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.** v.22(4), p.168-174, 2006.

SNACK, A.; OSAKI, S. C. Uma revisão sobre três importantes agentes causadores de aborto em bovinos: *Neospora caninum*, *Leptospira* sp. e *Trypanosoma vivax*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 6, n. 1, 2018.

STEVENSON, P. et al. Comparison of the isometamidium-based trypanocidal drugs Samorin® and Veridium® in cattle under field conditions at Nguruman, Kenya. **Acta Tropica**, v. 77, n. 2, 2000.

SUGANUMA, K. et al. Molecular characterization of a new *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle. **Parasitology Research**, v. 118, n. 6, p. 1927–1935, 2019.

THOMPSON, J.D. et al. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** 1997; 25(24): 4876-82.

TIZARD, I. R, Studies on the generation of biologically active substances by *Trypanosoma theileri* in vitro. **Research in Veterinary Science**, v. 28, p. 178-184, 1980.

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

VICKERMAN, K. et al. Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. **Biology of the Cell**, v. 64, n. 2, 1988.

VILLA, A. et al. Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. Annals Of The New York **Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 1149, n. 1, p. 352-354, dez. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1428.016>.

VOTÝPKA, J. et al. Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) Parasitizing Fleas (Insecta: Siphonaptera) and Description of a New Genus Blechomonas gen. n. **Protist**, v. 164, n. 6, 2013.

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Exp Parasitol**.v.18, p.124-193, 1966.

## ANEXO A

## Termo de doação

Pelo presente termo, a **Fazenda Zuniga**, vem entregar em doação ao projeto de pesquisa intitulado "Diagnóstico molecular de tripanossomíases em gado leiteiro no estado de Minas Gerais" sob responsabilidade do Prof. Dr. Arlei Marcili, perfazendo o total de **185 (cento e oitenta e cinco) amostras de sangue total de bovinos**, acondicionados em tubo tipo vacutainer, com EDTA, acompanhado da ficha clínica dos respectivos animais.

São Paulo, 21 de Janeiro de 2021

  
Arlei Zuniga