

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FELIPE EDUARDO FIORIN

**PREVALÊNCIA DE *TRYPANOSOMA EVANSI* E *TRYPANOSOMA VIVAX* EM
BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA**

LAGES

2020

FELIPE EDUARDO FIORIN

**PREVALÊNCIA DE *TRYPANOSOMA EVANSI* E *TRYPANOSOMA VIVAX* EM
BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Orientador: Prof. Dr. Joandes Henrique Fontequê.

LAGES

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC

Fiorin, Felipe Eduardo

Prevalência de Trypanosoma evansi e Trypanosoma vivax em
Bovinos da Raça Crioula Lageana / Felipe Eduardo Fiorin. –
Lages, 2020. 81 p.

Orientador: Joandes Henrique Fonteque

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2020.

1. Trypanosoma evansi. 2. Trypanosoma vivax. 3. Raça nativa.
4. PCR. 5. RIFI. I. Fonteque, Joandes Henrique. II. Universidade
do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação.
III. Título

FELIPE EDUARDO FIORIN

PREVALÊNCIA DE *TRYPANOSOMA EVANSI* E *TRYPANOSOMA VIVAX* EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal.

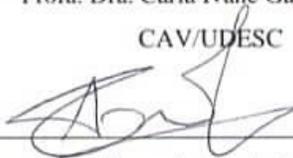
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Joandes Henrique Fonteque
CAV/UDESC

Membros:

Profa. Dra. Carla Ivane Ganz Voguel
CAV/UDESC



Dr. Alexandre Floriani Ramos
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Lages, 14 de dezembro de 2020.

Dedico este trabalho a Deus, e meus pais Gilmar e
Silvia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos concedidas a mim, por me proteger e guiar.

Agradeço imensamente a minha família, meu pai Gilmar Fiorin e minha mãe Silvia Aline Kasteller Fiorin que sempre foram meus alicerces e minha fonte de inspiração para sempre ir em busca de meus objetivos. Meu irmão João Pedro Fiorin e cunhada Bruna Ferranti que mesmo não tendo apreço pela área profissional que segui, nunca deixaram de me apoiar e me incentivar. Ao meu finado vô Matheus Fiorin que sem dúvida, foi a pessoa que desde criança, me incentivou à vida no campo, e amor pelos animais, me fazendo mais tarde, escolher ser quem hoje sou. Não há palavras para expressar o que sinto. Obrigado por serem meu porto seguro. Amo vocês!

A minha namorada Ketlyn Alissa de Lima companheira de vida e trabalho. Obrigado pelo apoio e por não me deixar desanimar nas intempéries da vida.

A toda minha família que sempre me apoiou e incentivou para que continuasse sempre buscando o melhor, em especial, ao meu tio Norival Fiorin e minha tia Mirna Fiorin os quais sempre estiveram presentes em minha vida, nunca medindo esforços para estarem a par de todo meu percurso, sempre me incentivando, me motivando. Meu muito obrigado!

Ao professor e amigo Dr. Joandes Henrique Fonteque, pelas oportunidades durante a pós-graduação. Agradeço a confiança depositada em mim, obrigado pelas orientações, pelos ensinamentos, pelas cobranças. Sem dúvida, mudou meu jeito de pensar, dentro e fora do meio acadêmico. Meu muito obrigado.

A minha colega, e que sem dúvida foi meu alicerce durante a pós-graduação, Msc. Mariana da Silva Casa, que durante este trajeto, foi minha segunda orientadora, sempre pronta a me auxiliar, por muitas vezes, bem a mais do que realmente estava ao seu alcance. Nunca conseguirei lhe agradecer por tudo que tem me ajudado. Serei eternamente grato. Muito obrigado.

Agradeço ainda, a minha amiga, colega de profissão e supervisora de estágio curricular, Msc. Ronise Tochetto. Muito do que conquistei até aqui, foi através do seu auxílio. Obrigado por ser meu exemplo de pessoa, e exemplo profissional.

Ao CAV/UEDESC por ser minha segunda casa, desde a graduação, por proporcionar formação de qualidade. Orgulho em fazer parte dessa instituição. E a todos seus funcionários.

Ao professor Dr. Luiz Claudio Miletto, por aceitar ser meu coorientador. Agradeço por todos os ensinamentos na área de pesquisa e da biologia molecular, junto a sua equipe.

Ao colega de pesquisa, Msc. Luiz Flávio Nepomuceno, pela paciência e dedicação nos ensinamentos de análises laboratoriais, sendo fundamental na execução da metodologia, além de correções referentes a demais assuntos laboratoriais. Muito obrigado.

Aos meus amigos e colegas de profissão, Thaís Coelho Valente, Rubens Peres Mendes, e Laís Muniz Arruda Pereira por toda ajuda e apoio, sem vocês não teria conseguido. Obrigada pela disponibilidade e empenho em me ajudar prontamente.

Agradeço também a colega Graziela Vieira Fontequê, pela ajuda durante a realização das padronizações e análises laboratoriais, além do apoio e motivação durante todo o percurso desta fase, muito obrigado.

Agradeço ao Dr. Nelson de Araújo Camargo (in memoriam) por todo o esforço e dedicação em sua trajetória junto a criação e manutenção da raça Crioula Lageana.

Agradeço ainda a todas as pessoas que de forma direta ou indireta me auxiliaram na conclusão deste projeto, em especial ao amigo Leonardo Bergmann Griebeler, o qual disponibilizou muito de seu tempo e empenho durante este trajeto.

A todos meus amigos que sempre estiveram me dando forças, e a todas as pessoas que contribuíram para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, muito obrigado.

A todos os proprietários que disponibilizaram suas propriedades e seus animais, e permitiram que eu realizasse meu projeto, muito obrigado.

Agradeço ainda a Associação Brasileira dos Criadores de Bovinos da Raça Crioula Lageana (ABCCL), por todo o apoio em prol da pesquisa com esta raça de extrema importância no cenário regional e nacional, que é a Crioula Lageana.

Agradecer também ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), pela oportunidade de estar seguindo a carreira acadêmica, na instituição que me formou. Sou muito grato.

Agradecimento a Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

A todos os animais, em especial aos bovinos e equinos, por despertar em mim a sede de conhecimento e amor pela minha profissão, que me faz ter cada dia mais certeza do caminho escolhido.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.” Martin Luther King

RESUMO

Estudos sobre o comportamento das infecções por *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* são vastos, no entanto em raças nativas são escassos. Algumas raças bovinas possuem a característica de ser tripanotolerantes, e para essa investigação, torna-se importante identificar a prevalência dos agentes, para posteriormente determinar características referentes a susceptibilidade, tolerância ou resistência, sendo ferramenta importante em programas de prevenção e controle de surtos em populações. Foram utilizados 310 bovinos da raça Crioula Lageana, machos e fêmeas adultos e jovens. A prevalência foi determinada pela RIFI e PCR para a detecção de *T. evansi* e *T. vivax* e realizados o exame físico, hemograma e bioquímica sérica. O teste t, para dados paramétricos ou o teste de Mann-Whitney, para os dados não paramétricos, foram utilizados para verificar as diferenças nas médias das variáveis clínicas, hematológicas e bioquímicas de animais positivos e negativos. A prevalência para *T. evansi* e *T. vivax* foi baixa, sendo 8% pela PCR e 4% pela RIFI para *T. evansi*; e 8% pela RIFI para *T. vivax*, mantendo a população em situação de instabilidade enzoótica. Animais positivos para o agente *T. evansi*, apresentaram aumento nos movimentos ruminais; aumento do número de eosinófilos e diminuição de monócitos, ambos estando dentro dos valores de referência para a espécie. Constatou-se também aumento da atividade da GGT e diminuição de albumina, estando abaixo dos valores de referência em ambos os grupos e menor concentração de triglicérides quando comparado aos animais negativos, porém permanecendo acima dos valores considerados normais. Obteve-se aumento de plaquetas e diminuição de colesterol em animais positivos para o agente *T. vivax*, ambos permanecendo dentro dos valores de referência para a espécie. Conclui-se que a prevalência foi baixa e as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas não podem ser relacionadas à infecção em bovinos da raça Crioula Lageana.

Palavras-chave: Tripanossomíase. Infecção. Raça Nativa.

ABSTRACT

Studies on the behavior of infections by *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* are vast, however in native breeds they are scarce. Some bovine breeds have the characteristic of being trypanotolerant, and for this investigation, it is important to identify the prevalence of the agents, to later determine characteristics related to susceptibility, tolerance or resistance, being an important tool in programs of prevention and control of outbreaks in populations. 310 bovines of the Crioula Lageana breed, male and female adults and young, were used. The prevalence was determined by RIFI and PCR for the detection of *T. evansi* and *T. vivax* and physical examination, blood count and serum biochemistry were performed. The t-test, for parametric data or the Mann-Whitney test, for non-parametric data, were used to verify the differences in the means of the clinical, hematological and biochemical variables of positive and negative animals. The prevalence for *T. evansi* and *T. vivax* was low, being 8% by PCR and 4% by RIFI for *T. evansi*; and 8% by RIFI for *T. vivax*, keeping the population in a situation of enzootic instability. Animals positive for the agent *T. evansi*, showed an increase in ruminal movements; increase in the number of eosinophils and decrease in monocytes, both being within the reference values for the species. There was also an increase in GGT activity and a decrease in albumin, being below the reference values in both groups and a lower concentration of triglycerides when compared to negative animals, but remaining above the values considered normal. There was an increase in platelets and a decrease in cholesterol in animals positive for the agent *T. vivax*, both remaining within the reference values for the species. It was concluded that the prevalence was low and the clinical, hematological and biochemical changes cannot be related to infection in Crioula Lageana cattle.

Palavras-chave: Trypanosomiasis. Infection. Native Race.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Prevalência de *T. evansi* em bovinos da raça Crioula Lageana, pelas técnicas de PCR e RIFI, no estado de Santa Catarina, Brasil.....49
- Gráfico 2.** Número de casos positivos e negativos diagnosticados pelos métodos PCR e RIFI para o agente *T. evansi*, bovinos da raça Crioula Lageana, no estado de Santa Catarina, Brasil.....50
- Gráfico 3.** Prevalência de *T. vivax* em bovinos da raça Crioula Lageana, determinada pela técnica reação de imunofluorescência indireta (RIFI), no estado de Santa Catarina, Brasil.....69
- Gráfico 4.** Número de casos positivos e negativos obtidos pelos métodos PCR e RIFI para o agente *T. vivax*, em bovinos da raça Crioula Lageana, no estado de Santa Catarina, Brasil.....70

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Avaliação de concordância e teste de Cohen's Kappa para confiabilidade entre as avaliações pelos métodos PCR e RIFI para o agente *T. evansi*, bovinos da raça Crioula Lageana, no estado de Santa Catarina, Brasil.....50
- Tabela 2.** Médias e desvios-padrão dos valores do exame físico de da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da PCR.....51
- Tabela 3.** Médias e desvios-padrão dos valores do exame físico de da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da RIFI.....51
- Tabela 4.** Médias e desvios-padrão dos valores do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da PCR, no estado de Santa Catarina, Brasil.....52
- Tabela 5.** Médias e desvios-padrão dos valores do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da RIFI, no estado de Santa Catarina, Brasil.....53
- Tabela 6.** Médias e desvios-padrão dos valores do bioquímico de bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da PCR, no estado de Santa Catarina, Brasil.....54
- Tabela 7.** Médias e desvios-padrão dos valores do bioquímico em bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da RIFI.....54
- Tabela 8.** Avaliação de concordância e teste de Cohen's Kappa para confiabilidade entre as avaliações pelos métodos PCR e RIFI para o agente *T. vivax*, em bovinos da raça Crioula Lageana no estado de Santa Catarina, Brasil.....70
- Tabela 9.** Médias e desvios-padrão dos valores do exame físico de da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. vivax*, avaliados pela técnica da RIFI.....71
- Tabela 10.** Médias e desvios-padrão dos valores do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de bovinos da raça Crioula Lageana no estado de Santa Catarina, Brasil negativos e positivos para a infecção natural por *T. vivax* pela técnica da RIFI.....71

Tabela 11. Médias e desvios-padrão dos valores da bioquímica sérica de bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por <i>T. vivax</i> através da técnica da RIFI.....	72
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
RBCs	Contagem de Hemácias
TWBCs	Contagem Total de Leucócitos
CK	Creatina Quinase
dL	Decilitro
dpi	Dias Pós Inoculação
FA	Fosfatase Alcalina
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
GGT	Gamaglutamiltransferase
g	Gramma
°C	Graus Celsius
PCV	Hematócrito
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
kg	Kilograma
LDH	Lactato Desidrogenase
µm	Micrometro
µL	Microlitro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Molaridade
MR	Movimentos Ruminais
ng	Nanogramma

PTP	Proteína Total Plasmática
%	Por cento
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
UV	Ultravioleta
U	Unidade
VCM	Volume Corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 HIPÓTESES	21
4 REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1 RAÇA CRIOLA LAGEANA	22
4.2 TRIPANOSSOMÍASE	23
4.2.1 Taxonomia e Características Gerais	23
4.3 <i>TRYPANOSOMA EVANSI</i>	23
4.3.1 Morfologia, Etiologia e Epidemiologia	23
4.3.2 Transmissão, Vetores e Hospedeiros	24
4.3.3 Patogenia e Sinais Clínicos	25
4.3.4 Alterações Hematológicas e Bioquímicas	26
4.4 <i>TRYPANOSOMA VIVAX</i>	26
4.4.1 Morfologia, Etiologia e Epidemiologia	26
4.4.2 Transmissão, Vetores e Hospedeiros	28
4.4.3 Patogenia e Sinais Clínicos	29
4.4.4 Alterações Hematológicas e Bioquímicas	31
4.5 DIAGNÓSTICO – <i>T. EVANSI</i> E <i>T. VIVAX</i>	32
4.5.1 Testes Parasitológicos	32
4.5.2 Testes Sorológicos	33
4.5.2.1 Imunofluorescência	33
4.5.2.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	33
4.5.3 Testes Moleculares	34
4.5.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	34
4.6 CONTROLE E TRATAMENTO – <i>T. VIVAX</i> E <i>T. EVANSI</i>	34
5 PREVALÊNCIA DE <i>Trypanosoma evansi</i> EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA	42
5.1 INTRODUÇÃO	43
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44

5.2.1 Determinação do Tamanho Amostral	44
5.2.2 Animais e Obtenção das Amostras	44
5.2.3 Exame Físico.....	45
5.2.4 Extração de DNA.....	45
5.2.5 Análise Molecular.....	45
5.2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	45
5.2.5.2 Imunofluorescência indireta (RIFI)	46
5.2.6 Hematologia.....	47
5.2.7 Bioquímica sérica	47
5.2.8 Análise Estatística	48
5.2.9 Comitê de Ética	48
5.3 RESULTADOS	48
5.3.1 Prevalência	48
5.3.2 Exame Físico.....	50
5.3.3 Avaliação Hematológica.....	51
5.3.4 Avaliação Bioquímica.....	53
5.4 DISCUSSÃO.....	54
5.5 CONCLUSÃO	58
5.6 REFERÊNCIAS.....	58
6 PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO NATURAL POR <i>Trypanosoma vivax</i> EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA	62
6.1 INTRODUÇÃO	63
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
6.2.1 Determinação do Tamanho Amostral	65
6.2.2 Animais e Obtenção das Amostras	65
6.2.3 Exame Físico.....	66
6.2.4 Extração de DNA.....	66
6.2.5 Análise Molecular.....	66
6.2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	66
6.2.5.2 Imunofluorescência indireta (RIFI)	67
6.2.6 Hematologia.....	68
6.2.7 Bioquímica sérica	68
6.2.8 Análise Estatística	68

6.2.9 Comitê de Ética	69
6.3 RESULTADOS	69
6.3.1 Prevalência	69
6.3.2 Exame Físico.....	71
6.3.3 Hematologia.....	71
6.3.4 Bioquímica sérica	72
6.4 DISCUSSÃO.....	73
6.5 CONCLUSÃO	77
6.6 REFERÊNCIAS.....	77
7 CONCLUSÃO.....	81

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros bovinos trazidos ao Brasil no século XVI por colonizadores, sofreram ao longo do tempo seleção natural e adaptaram-se às condições adversas do Planalto Catarinense dando origem a raça Crioula Lageana (*Bos taurus*). Esses animais caracterizam-se pela rusticidade e baixa exigência nutricional, sendo produtivos mesmo em condições climáticas e nutricionais adversas (MARIANTE e CAVALCANTE, 2000).

Com a introdução de raças bovinas exóticas no século passado, a raça Crioula Lageana quase foi extinta, contudo, devido à sua rusticidade, e aos núcleos de conservação *in situ*, estes animais ainda são capazes de sobreviver e produzir em condições precárias, diferentemente daqueles geneticamente melhorados. Portanto, o estudo da prevalência de enfermidades faz-se necessário para identificar importantes agentes potencialmente causadores de prejuízos econômicos (BIANCHINI et al., 2006).

As Tripanossomíases, causadas pelos agentes *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*, são enfermidades economicamente importantes em todo o mundo, sendo relatada ocorrência em bovinos, bubalinos, equinos e caprinos. No Brasil, acarretam perdas econômicas significativas, associadas à mortalidade e diminuição nas taxas produtivas (LOPES et al., 2016).

Estudos com prevalência de Tripanossomíases na região Sul do Brasil não são reportados, e neste contexto, torna-se imprescindível esta avaliação, visto que rebanhos apresentando instabilidade enzoótica para os agentes, podem desencadear surtos, visto que os animais ficam mais susceptíveis à doença clínica (SMITH, 2000).

Algumas raças bovinas possuem característica de serem tripanotolerantes, que é a capacidade de um indivíduo manter-se produtivo apesar de estar infectado, podendo ser importante ferramenta de controle, por meio de cruzamentos em programas de melhoramento genético, em regiões onde a doença está presente (DOKO et al., 1991).

Para o esclarecimento de questões como esta tornam-se importantes os trabalhos que determinem a prevalência e a resposta dos exemplares da raça Crioula Lageana frente às doenças, sendo passo fundamental para entender a manifestação destas infecções neste grupo racial. Importante lembrar que animais portadores assintomáticos em fase crônica do *Trypanosoma* sp., são potenciais fontes de infecção para outros animais (VENTURA et al., 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência de *T. evansi* e *T. vivax* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em bovinos da raça Crioula Lageana e correlacionar as variáveis clínicas, hematológicas e bioquímicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a prevalência de *T. evansi* e *T. vivax* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em bovinos da raça Crioula Lageana.
- Correlacionar os dados do exame físico, hemograma e bioquímica sérica dos animais positivos e negativos ao *T. evansi* e *T. vivax*.
- Comparar os testes de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

3 HIPÓTESES

Acredita-se que a prevalência dos agentes da Tripanossomíase seja baixa em bovinos da raça Crioula Lageana, sendo considerados portadores assintomáticos, sem o desenvolvimento da doença clínica.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 RAÇA CRIOULA LAGEANA

A introdução de bovinos em Santa Catarina ocorreu após a vinda de jesuítas para o Rio Grande do Sul, e posteriormente após a invasão das Missões pelos Bandeirantes (ARAÚJO, 1990).

Sugere-se que muitos animais tenham se espalhado pelo caminho, sendo que na região do Planalto Catarinense, com o tempo, passaram a formar rebanhos nos campos de Lages. Com a colonização do Planalto Catarinense, houve a introdução de novos bovinos, cruzando com bovinos ali existentes, dando origem a raça conhecida como Crioula Lageana, que era até o início do século passado a raça predominante na região (MARIANTE e CAVALCANTE, 2000).

Os animais que habitaram a Serra Catarinense por quase cinco séculos, sofreram seleção natural, em meio às condições pouco favoráveis, com invernos rigorosos e pouco alimento, resultando em uma raça naturalizada com excelente adaptação às condições ambientais, sendo por muito tempo o esteio da pecuária na região (MARIANTE e CAVALCANTE, 2000).

Com a vinda de materiais genéticos de bovinos europeus e zebuínos para a região no final do século passado, o gado Crioulo quase foi levado à extinção (MARTINS et al., 2009). Atualmente, a população desses bovinos encontra-se reduzida a um efetivo de poucos animais concentrados em algumas propriedades (VEIGA et al., 2009).

Devido ao trabalho de preservação e resgate de animais realizados por proprietários existentes na região de Lages-SC a raça Crioula Lageana manteve-se como importante fonte de estudos (CAMARGO; MARTINS, 2005). Porém, são ainda poucas as pesquisas realizadas com raças naturalizadas no Brasil, e nisso, inclui-se a Crioula Lageana (TEIXEIRA et al., 2012). Levantamentos epidemiológicos vem sendo realizados com relação a certas enfermidades que são potenciais causadoras de prejuízos à raça. Estas informações são base para determinação de dados sobre a sanidade animal, sendo ainda fundamento para a elaboração de planos de melhoramento genético, além de controle e profilaxia de patógenos e doenças (FINO et al., 2013).

É importante destacar que programas de melhoramento genético, e conservação de recursos genéticos animais estão ancorados nas pesquisas das raças naturalizadas, de modo que a preservação genética de bovinos da raça Crioula Lageana é imprescindível para o Planalto Catarinense (MARTINS et al., 2009).

Além disso, estes estudos visam avaliar a distância entre populações, possibilitando também, o direcionamento de acasalamentos ou cruzamentos que favorecerão a manutenção de máxima variabilidade genética (EGITO et al., 2001).

4.2 TRIPANOSSOMÍASE

4.2.1 Taxonomia e Características Gerais

Espécies incluídas no gênero *Trypanosoma*, causadores de doenças chamadas Tripanossomíases, pertencem ao filo Protozoa, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e subordem Trypanosomatina, infectando seres de todas as classes de vertebrados. A espécie *Trypanosoma vivax* pertence ao subgênero *Duttonella*. A espécie *Trypanosoma evansi* pertence ao Subgênero Trypanozoon (DESQUESNES et al., 2013b).

4.3 *TRYPANOSOMA EVANSI*

4.3.1 Morfologia, Etiologia e Epidemiologia

O *T. evansi* é um protozoário flagelado, caracterizado por possuir núcleo visível, grânulos no citoplasma e flagelo emergindo paralelo ao corpo e correndo ao longo da sua membrana ondulante. (RODRIGUES et al., 2005).

É o agente etiológico da doença conhecida como “surra” na África e na Ásia e “mal das cadeiras” na América do Sul (DESQUESNES et al., 2013a).

O primeiro tripanossoma patogênico descoberto foi o *T. evansi*. A doença causada pelo agente tem sido observada há muitos séculos, mas somente em 1880, Griffith Evans descobriu organismos móveis semelhantes a espirilos no sangue de cavalos e camelos doentes. Evans relatou parasitas em esfregaços sanguíneos frescos e os reconheceu como protozoários (FATHUDDIN et al., 2017)

O *T. evansi* possui distribuição geográfica ampla, ocorrendo na África, Índia, Malásia, Indonésia, China, Rússia, Filipinas, América Central e América do Sul. Causa doença clínica em

animais de áreas de clima tropical, especialmente África e América Latina (DESQUESNES et al., 2013b).

A hipótese é que este protozoário tenha sido introduzido nas Américas através de animais domésticos infectados, importados do Velho Mundo, por colonizadores espanhóis (DESQUESNES et al., 2013a).

No Brasil, a doença foi inicialmente observada na Ilha de Marajó, entre 1827 e 1830, local este, onde se iniciaram epizootias graves, afetando principalmente equinos, tendo prevalência variada de acordo com a região (HERRERA et al., 2004).

A doença é considerada enzoótica em equinos do Pantanal Mato-Grossense. Devido ao contato com cavalos, cães assumem papel relevante como reservatório, bem como capivaras, quatis, marsupiais e tatus (SILVA et al., 2002).

No Pantanal, ocorreram surtos com alta mortalidade (50,5% a 75%) em equinos, (SILVA et al., 1995) e casos de infecção natural por *T. evansi* no Rio Grande do Sul (CONRADO et al., 2005). No Estado de Santa Catarina *T. evansi* foi descrito afetando bovinos (SILVA et al., 2008).

4.3.2 Transmissão, Vetores e Hospedeiros

O *T. evansi* pode ser transmitido mecanicamente por insetos hematófagos dos gêneros *Simulium*, *Tabanus*, *Stomoxys*, *Haematopota* e *Lyperosia* (DESQUESNES et al., 2013a), e ainda por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), sendo considerados vetores e reservatórios (AQUINO, 2007).

A transmissão mecânica dos hemoflagelados está diretamente ligada a sobrevida no aparelho bucal dos insetos vetores, tendo infectividade maior nos primeiros minutos após a alimentação. Não ocorre desenvolvimento cíclico no vetor (AQUINO, 2007).

O agente permanece na probóscide sob forma tripomastigota podendo ter viabilidade de até oito horas. A inoculação é realizada através da picada do vetor, atingindo a circulação sanguínea. A fase de multiplicação segue-se com período pré-patente de quatro a 10 dias, originando depois a parasitemia. O parasito pode ser transmitido também via mucosa e transplacentária (BAZZOLI et al., 2002).

Os hospedeiros comumente observados são camelos na África, equinos, muares, bovinos, caprinos, suínos, caninos, búfalos, elefantes, capivaras, coatis, antas, veados e pequenos roedores silvestres na Ásia e América Central e do Sul (DESQUESNES et al., 2013a).

4.3.3 Patogenia e Sinais Clínicos

A patogenia consiste em várias etapas, iniciada no local da picada, invadindo a circulação sanguínea e linfática, levando a picos de febre e induzindo a resposta inflamatória (DESQUESNES et al., 2013a) ocorrendo a liberação de toxinas (fosfolipases). Estas toxinas hidrolisam a membrana dos eritrócitos, levando a estresse oxidativo e lise, reduzindo também a produção de células pela medula óssea (SILVA et al., 2002).

Existem diferenças consideráveis na severidade dos sinais clínicos causados pela infecção em diferentes áreas geográficas de ocorrência, dependendo da virulência da cepa e da susceptibilidade do hospedeiro (DESQUESNES et al., 2013b).

A doença é caracterizada por rápida perda de peso, graus variáveis de anemia, febre intermitente, edema de regiões distais de membros, letargia, inapetência, emagrecimento progressivo, lacrimejamento, hifema e abortamento. Sinais neurológicos centrais, como locomoção atáxica, andar em círculos, déficit propioceptivo, decúbito esternal e decúbito lateral permanente são descritos na fase terminal (DESQUESNES et al., 2013b).

Nos estágios crônicos, apresentam fraqueza, mucosas pálidas ou ictéricas, nódulos linfáticos superficiais intumescidos e incoordenação motora com paralisia de membros pélvicos (SILVA et al., 2010).

A anemia observada é de natureza hemolítica, resultado da eritrofagocitose no baço, no fígado, pulmões, nódulos linfáticos, na medula óssea e na circulação sanguínea (SILVA et al., 2010).

Entre cinco a sete dias pós infecção são produzidos anticorpos capazes de destruir os tripanossomas ocasionando queda na parasitemia. Os tripanossomas que sobrevivem, multiplicam-se novamente até serem destruídos por nova resposta imunológica. O ciclo pode se repetir indefinidamente até levar a morte do animal (GRESSLER et al., 2010).

4.3.4 Alterações Hematológicas e Bioquímicas

A anemia moderada a severa classifica-se como hipocrômica macrocítica (CONNOR e VAN DEN BOSCHE, 2004) com presença de macrócitos, corpos de Howell-Jolly, células de Burr e estomatócitos (ABDUL-MAJEED et al., 2007).

Na fase aguda, há leucocitose com linfocitose, seguida de leucopenia durante a fase crônica (ABDUL-MAJEED et al., 2007). Neutropenia, linfocitose e eosinopenia podem ser observados no hemograma de animais parasitados. Por outro lado, leucocitose acompanhada por aumentos de neutrófilos, eosinófilos e monócitos, juntamente com diminuição de linfócitos e basófilos são descritos (TEIXEIRA, 2010).

A concentração de proteína total sérica diminui em infecções agudas, devido a redução de albumina. Na fase crônica, pode ocorrer aumento da concentração de proteína devido ao aumento de globulina (KENIKO, 1997, TEIXEIRA, 2010).

Pode haver aumento da bilirrubina e atividade enzimática da lactatodesidrogenase (LDH), devido a leve distúrbio hepático, disfunção muscular ou insuficiência renal. Pode ocorrer diminuição da atividade enzimática da fosfatase alcalina (FA) (HILALI et al., 2006) e aumento da alaninoaminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST) em animais parasitados (TAIWO et al., 2003).

Diminuição da concentração de glicose (TAKEET e FAGBEMI, 2009) e aumento do colesterol podem ocorrer em consequência da disfunção hepática secundária (ADEJINMI e AKINBOADE, 2000).

A diminuição da concentração de creatinina e uréia, relacionadas à degeneração tubular, nefrite intersticial e infiltração mononuclear dos glomérulos renais pode estar presente (DAMAYANTI et al., 1994).

4.4 *TRYPANOSOMA VIVAX*

4.4.1 Morfologia, Etiologia e Epidemiologia

O *T. vivax* é um protozoário pleomórfico, apresenta corpo achatado e alongado, tendo extremidades afiladas e cinetoplasto grande pós-nuclear, maior em comparação a outras espécies

patogênicas. O flagelo surge próximo ao cinetoplasto emergindo ao lado do corpo, seguindo ao longo da membrana ondulante (OSÓRIO et al., 2008).

Há variação de morfologia entre fases de desenvolvimento, onde a tripomastigota é achatada, tendo forma de foice, núcleo grande e central, cinetoplasto grande e extremidade posterior arredondada (OSÓRIO et al., 2008).

Em isolados africanos, encontra-se *T. vivax* em suas formas tripomastigotas e epimastigotas tetracíclicas. Na América do Sul, o *T. vivax* é encontrado apenas em sua forma tripomastigota, não havendo presença do ciclo no vetor (GUERREIRO, 2005, DESQUESNES et al., 2013b).

A infecção por *T. vivax* é marcada por picos de parasitemias, com variação em número de parasitos, e a distribuição de suas formas evolutivas segue sempre um padrão distinto (OSÓRIO et al., 2008).

Acredita-se que o *T. vivax* foi introduzido na América Latina, por meio de bovinos importados da África no final do século XIX (BATISTA et al., 2008).

Possui grande distribuição na África, principalmente em regiões onde se encontra a mosca “tsé-tsé”, porém, está disseminado em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (SIMUKOKO et al., 2011).

Acomete bovinos, ovinos, caprinos, equinos, camelos, antílopes selvagens e búfalos africanos (DESQUESNES et al., 2013b). Algumas raças de ruminantes domésticos são relativamente tolerantes à tripanossomiase, apresentando resistência natural permanecendo na condição de portadores assintomáticos, tendo capacidade de manter a produção mesmo infectados (FIORAVANTI et al., 2020) o que é denominado como tripanotolerância (MATTIOLI; WILSON, 1996).

A dissipação do agente no continente Americano ocorreu no século XIX após à importação de animais pelos colonizadores, e bovinos do Senegal para Guiana Francesa e Ilhas de Martinica e Guadalupe (PAIVA et al., 2000).

No Brasil, foi diagnosticado inicialmente em búfalos no Estado do Pará nos anos 70. Posteriormente disseminou-se para as demais regiões do país (BATISTA et al., 2012).

No município de São Pedro, estado do Rio Grande do Sul, ocorreu o primeiro caso diagnosticado de *T. vivax* em bovino apresentando sinais clínicos neurológicos (SILVA et al., 2009).

4.4.2 Transmissão, Vetores e Hospedeiros

O *T. vivax* pertence à seção salivaria, fazendo a transmissão do tipo inoculativa, pelas glândulas salivares dos vetores, sendo altamente patogênicos para humanos e animais (DESQUESNES et al., 2013b).

O ciclo de vida envolve um hospedeiro invertebrado, sendo o vetor biológico, a mosca do gênero *Glossina*, e um hospedeiro vertebrado, normalmente mamíferos ungulados (BATISTA et al., 2012).

A mosca “tsé-tsé” ingere as formas tripomastigotas, onde multiplicam-se e transformam-se em epimastigotas no esôfago e faringe. Posteriormente, migram em direção à hipofaringe, onde multiplicam-se nas glândulas salivares, transformando-se novamente em tripomastigotas, e após em formas infectantes, chamadas tripomastigotas metacíclicas (DESQUESNES et al., 2013b). A mosca faz repasto sanguíneo, inoculando formas infectantes no hospedeiro, e que na circulação sanguínea fazem multiplicação por fissão binária (SILVA et al., 2009).

A espécie *Glossina* spp., conhecida como moscas “tsé-tsé”, estão restritas somente na África tropical, responsáveis pela forma cíclica de transmissão. A transmissão mecânica na África pode ocorrer também por outros dípteros sugadores sendo observado a presença de *T. vivax* fora da região onde existe a “tsé-tsé” (BATISTA et al., 2012).

Em condições experimentais com tabanídeos, demonstrou-se que as transmissões mecânica e cíclica podem coexistir a campo (DESQUESNES et al., 2013b).

A habilidade do vetor em transmitir os tripanossomas mecanicamente é normalmente calculada em minutos, dependendo da sobrevivência dos parasitas nas peças bucais (SILVA et al., 2002).

A transmissão nas Américas ocorre primariamente pela picada de moscas dípteras hematófagas dos gêneros *Tabanus* spp. (mutuca) e *Stomoxys* spp. (mosca dos estábulos) e inoculação das formas tripomastigotas presentes no aparelho bucal dos vetores, ou ainda, por meio inoculativo através de instrumentos contaminados (BATISTA et al., 2012).

Bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, caninos, entre outros, são susceptíveis à infecção causada pelo *T. vivax* (PAIVA et al., 2000), porém equídeos, ratos e camundongos são considerados refratários à infecção (CHAMOND et al., 2010).

A transmissão transplacentária é relatada em cordeiros, oriundos de ovelhas inoculadas experimentalmente com *T. vivax* no terço final da gestação. Na América Latina, a transmissão transplacentária foi descrita no Brasil (BATISTA et al., 2012) e na Venezuela, sendo demonstrado a ocorrência de infecção perinatal, podendo ocorrer antes ou após o parto (MELÉNDEZ; WILLIAM, 1993).

A adaptação à transmissão mecânica por insetos na América restringe-se à variação antigênica do parasito, relacionada com sua patogenicidade, indicando que o surgimento de sinais clínicos graves deve-se à intensidade da parasitemia e não a variedade antigênica (DESQUESNES et al., 2013b).

4.4.3 Patogenia e Sinais Clínicos

A patogenia depende de fatores relacionados ao hospedeiro como espécie, idade, raça tripanotolerante, susceptibilidade do animal e a virulência do isolado, ocorrendo flutuações irregulares (BATISTA et al., 2008).

Em bovinos o período pré patente varia de nove a 14 dias pós inoculação (dpi) para os isolados virulentos e de três a 59 dias em isolados de menor patogenicidade (ADAMU et al., 2007).

A parasitemia pode durar de uma semana a dois meses, até formas tripomastigotas tornarem-se indetectáveis no sangue. Períodos de recorrência podem ocorrer (MATTIOLI; WILSON, 1996). Em algumas situações ocorrem níveis elevados de parasitemia pela manhã e baixos no período da tarde no mesmo dia (OSÓRIO et al., 2008).

Touros infectados experimentalmente com *T. vivax* para avaliar danos testiculares, mostraram que a parasitemia ocorreu entre quatro a cinco dias pós inoculação (dpi) e o pico da parasitemia aconteceu no sexto dia (ADAMU et al., 2007).

No Brasil, a presença de *T. vivax* na circulação sanguínea ocorreu a partir do terceiro dpi em 100% dos bezerros infectados experimentalmente, com pico no quinto dpi, persistindo com variações de parasitemia até o 30º dpi em animais apresentando sinais subclínicos (SCHENK et al., 2001).

A infecção pode ser superaguda, aguda ou crônica. A infecção superaguda caracteriza-se por parasitemia alta, persistente, podendo levar ao óbito nas três primeiras semanas de infecção. O quadro agudo é marcado por elevada parasitemia, durando entre duas semanas a dois meses após

infecção, com a presença de febre intermitente (BATISTA et al., 2012). No quadro crônico, em animais que não morrem, as variáveis hematológicas podem retornar aos valores fisiológicos em torno de seis a oito semanas, podendo ser observadas recorrências da parasitemia com baixas concentrações, estendendo-se por meses ou anos (MATTIOLI; WILSON, 1996).

Na América do Sul a grande maioria das infecções são crônicas e muitas vezes assintomáticas, com raros surtos da doença clínica (ADAMS, et al., 2010). Os principais sinais clínicos são febre, inapetência, palidez de mucosas, anorexia, fraqueza progressiva, linfadenomegalia, taquipneia, taquicardia, perda de peso, diminuição da produção de leite, abortamento e hemorragia visceral principalmente no trato gastrointestinal (BATISTA et al., 2012). Outros sinais incluem ceratite, opacidade da córnea, secreção nasal e ocular (CADIOLI et al., 2012), edema subcutâneo da cabeça, epistaxe, sialorreia (BATISTA et al., 2007), alterações neurológicas como tremores musculares e incoordenação motora (BATISTA et al., 2012), miocardite com hidro pericárdio e hemorragias no epicárdio (CHAMOND et al. 2010), diarreia, nascimento de bezerros fracos com morte perinatal (BATISTA et al., 2012).

T. vivax deve ser considerado causador de distúrbios reprodutivos em bovinos e ovinos. Em machos, leva a perda da libido, atraso na idade de puberdade e baixa qualidade de sêmen secundária a danos testiculares e nos epidídimos. Em fêmeas, induz ao anestro temporário ou permanente, ciclos estrais acíclicos, morte fetal e abortamento (BATISTA et al., 2012).

Os animais que se recuperaram podem tornar-se reservatórios, com baixas ou indetectáveis contagens sanguíneas do parasito em esfregaços, na visualização em microscópio (BARAL, 2010).

Pode ainda, haver equilíbrio entre parasita e hospedeiro, fator denominado como tripanotolerância, com o animal mantendo-se clinicamente hígido mesmo na presença do agente. Existem algumas raças de bovinos resistentes ao *T. vivax*, devido a origem genética e ambiental, variando em relação às condições de estresse, idade, infecções intercorrentes, nutrição e variação antigênica (SCHENK et al., 2001). A tripanotolerância possui caráter genético, estando presente em bovinos das raças Sheko (Etiopia) (DESTA, AYALEW, HEGDE, 2012) e N'Dama (África Ocidental) (DOKO et al., 1991).

4.4.4 Alterações Hematológicas e Bioquímicas

O parasita determina anemia leve a grave (BATISTA et al., 2008) que ocorre devido a produção de fator hemolítico (IGBOKWE, 1994); efeito direto dos protozoários sobre os eritrócitos; fragilidade osmótica por ação da febre ou deposição de imunocomplexos na superfície de hemácias (WILLIAMS et al., 1996). A anemia hemolítica pode ser desencadeada, em razão de mecanismos imunomediados, aumento de citocinas ou diminuição da oferta de ferro para a produção de eritropoietina (OSÓRIO et al., 2008).

Pode ainda ocorrer desordens hemostáticas devido ao consumo de plaquetas, causando trombocitopenia (CHAMOND et al., 2010).

A leucopenia é frequente e pode estar relacionada a ativação do sistema fagocítico mononuclear (CHAMOND et al., 2010). Leucopenia com linfopenia e neutropenia, é sugestiva de aumento de parasitos na circulação sanguínea (ALMEIDA et al., 2008).

Pode ocorrer diminuição sérica de glicose e aumento na concentração de ácidos graxos livres em animais infectados (DAGNACHEW e BEZIE, 2015). Tripanossomas usam a glicose como fonte de energia através de difusão facilitada, levando à hipoglicemia (BARRETT et al., 1998).

A concentração de uréia sérica pode estar aumentada (FRANGE, 2013) ou diminuída em animais infectados por *T. vivax*, bem como, pode haver aumento de creatinina (MOURA et al., 2009b). Em relação a ureia e creatinina, não ocorre lesão renal, logo, elevações da concentração de ureia estão relacionadas ao desequilíbrio energético (FRANGE, 2013).

Diminuição da concentração de albumina e proteínas totais são observadas em animais infectados por *T. vivax* (SCHENK et al., 2001), bem como hipertrigliceridemia decorrente da diminuição da atividade da lipase lipoproteica associada às lesões hepáticas (FRANGE, 2013).

A atividade enzimática da aspartatoaminotransferase (AST) e gamaglutamiltransferase (GGT) podem permanecer dentro dos valores fisiológicos de referência para a espécie bovina, porém, pode ser comum a elevação de GGT, indicando lesão hepática e fosfatase alcalina (FA) (MOURA et al., 2009b).

Animais infectados apresentam concentração sérica de bilirrubina total, direta e indireta superior aos animais negativos (FRANGE, 2013) e hipocalcemia (MOURA et al., 2009b).

4.5 DIAGNÓSTICO – *T. EVANSI* E *T. VIVAX*

O diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma* é difícil, devido os sinais clínicos serem variados e inespecíficos e, em áreas enzoóticas, os hospedeiros naturais frequentemente apresentarem formas crônicas da doença (HERRERA et al., 2004).

A confirmação do diagnóstico consiste em exames diretos, determinando a presença de formas tripomastigotas em esfregaços sanguíneos ou por meio de técnicas moleculares para a detecção de DNA/RNA de *Trypanosoma*, ou ainda com exames indiretos como testes sorológicos para observar a presença de títulos de anticorpos (OSÓRIO et al., 2008).

Os métodos diagnósticos para *Trypanosomíases* podem ser divididos em três: parasitológico, sorológico e moleculares (SILVA et al., 2002).

4.5.1 Testes Parasitológicos

Dentre os métodos de diagnóstico parasitológico, encontramos a técnica do Microhematócrito, *Buffy Coat*, esfregaço sanguíneo, método do “aspirado” do linfonodo, e inoculação em camundongos (SILVA et al., 2002).

A técnica do Microhematócrito (MHCT) é uma das técnicas amplamente utilizadas entre os métodos parasitológicos, podendo-se evidenciar a motilidade dos tripomastigotas. Esta técnica permite a detecção de *trypanossomas* entre seis a dez dias (OSÓRIO et al., 2008).

O *Buffy Coat* (BCT) é capaz de detectar 50% mais casos de infecção por *Trypanosoma* em comparação ao MHCT. Outra vantagem é a facilidade e rapidez do reconhecimento dos *trypanossomas* (MADRUGA, 2006). A desvantagem é que as amostras devem ser analisadas rapidamente após a colheita, no máximo seis horas (GÓMEZ-PIÑERES; TAVARES-MARQUES; REYNA-BELLO, 2009).

Inoculação em camundongo e esfregaços corados com o Giemsa foi proposta como a combinação mais efetiva (SILVA et al., 2002).

A ocorrência de doença crônica e assintomática dificulta a detecção dos agentes pelos métodos parasitológicos, tendo baixa sensibilidade (MADRUGA, 2006).

4.5.2 Testes Sorológicos

Os métodos diagnósticos sorológicos comumente utilizados no Brasil para detectar Tripanossomíases são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) (MADRUGA et al., 2006).

A triagem sorológica e a titulação de anticorpos fornecem informações úteis, além de avaliar com maior sensibilidade o estado dos rebanhos infectados (MATTIOLI et al., 2001).

Testes sorológicos para a detecção de anticorpos tem problemas relacionados à especificidade devido a reação cruzada com outros parasitas do mesmo gênero (OSÓRIO et al., 2008).

4.5.2.1 Imunofluorescência

Nos testes de imunofluorescência são empregados conjugados constituídos de anticorpos ou antígenos ligados a moléculas reveladoras denominadas fluorocromos, absorvendo luz, fenômeno conhecido como fluorescência (VAZ; TAKEI; BUENO, 2007).

São classificados de acordo com o componente marcado (antígeno ou anticorpo), pelo método (competitivo ou não-competitivo), por serem homogêneos ou heterogêneos, ou ainda pela realização em fase sólida ou líquida. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) permite identificar diferentes classes de anticorpos nas amostras, como anti-IgG ou anti-IgA (VAZ; TAKEI; BUENO, 2007).

4.5.2.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

O teste sorológico ELISA para anticorpos circulantes é intensamente utilizado, mostrando boa sensibilidade (AQUINO et al., 2010). Baseia-se no uso de antígenos obtidos a partir do sangue de roedores experimentalmente infectados ou de culturas de tecidos (GARCIA et al., 2006).

4.5.3 Testes Moleculares

A presença de DNA do parasito em animais infectados é o único método de diagnóstico confiável, uma vez que métodos parasitológicos não tem boa sensibilidade com parasitemias baixas. Um par de iniciadores para diagnóstico que se anelam a região genômica do *Tripanossoma* foi desenvolvido, codificando um antígeno, identificando assim maior número de genótipos de diferentes regiões (MASAKE et al., 1997).

4.5.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Dentre os métodos de detecção molecular o mais utilizado é a PCR, sendo capaz de amplificar fragmentos específicos de DNA (SILVA et al., 2002), demonstrando ser uma ferramenta específica e sensível, aumentando a sensibilidade da detecção de tripanossomas, com grande impacto sobre estudos epidemiológicos (HERRERA et al. 2004).

A técnica da PCR, uma vez que usa sequências espécie-específicas para o diagnóstico de Tripanossomíase oferece maior sensibilidade que os métodos parasitológicos (DESQUESNES; DÁVILA, 2002).

Para a identificação do *Trypanosoma*, são utilizados primers direcionados no gene do mini-exon (*splicedleader*) e na região intergênica, com amplificação de um produto de pares de base (pb) (VENTURA et al., 2001).

Embora tenham excelentes resultados, os testes utilizando a PCR não são satisfatórios quando há baixa ou nenhuma parasitemia (OSÓRIO et al., 2008).

4.6 CONTROLE E TRATAMENTO – *T. VIVAX* E *T. EVANSI*

Durante muito tempo vários métodos de controle, como desmatamento, uso de machos estéreis e armadilhas impregnadas com inseticidas, pulverização nos animais e vegetação, uso de inseticidas *pour on* e quimioprofilaxia foram testados. Não havendo como imunizar os animais, aconselha-se a realizar o tratamento dos doentes, combater vetores e incinerar carcaças dos animais mortos (FORTES, 2004). Ainda, sugere-se a utilização de raças tripanotolerantes, principalmente

em regiões endêmicas, em programas de melhoramento genético, visando difundir esta característica nas populações (DOKO et al., 1991).

No continente africano onde a transmissão ocorre de forma cíclica a profilaxia consiste na ruptura da cadeia de transmissão glossina-animal-*Trypanosoma*, podendo-se utilizar o uso de raças tripanotolerantes, drogas profiláticas e curativas, remoção de habitats e controle biológico do vetor. Em áreas de transmissão mecânica onde não há a presença da mosca “tsé-tsé”, deve ser realizado tratamento precoce. A administração deve ser restrita aos animais parasitados devido à resistência às drogas (PAIVA et al., 2009).

A quimioterapia para a tripanossomíase em bovinos envolve o aceturato de diminazene, brometo de homidium, cloreto de isometamidium, sulfato de quinapiramina, suramina e melarsomina. Drogas como o aceturato de diminazene, devido ao princípio ativo manter-se nos tecidos por um período longo, também possui ação profilática (PAIVA et al., 2009).

O tratamento de infecções por Tripanossomas no Brasil é limitado (OSÓRIO et al., 2008), sendo o aceturato de diminazene a única droga com potencial efeito tripanocida liberada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Mesmo sendo utilizada como droga de eleição, apresentando maior índice terapêutico reduzindo parasitemias altas (SILVA et al., 2004), há relatos de resistência do parasito ao princípio ativo (BATISTA et al., 2012).

A droga liga-se ao DNA provocando enrijecimento local, alterando as curvas das hélices, ou a flexão do DNA, resultando à morte das formas tripomastigotas (REINERT, 1999).

A posologia indicada para tratamento das tripanossomíases é de 3,5 mg/kg em dose única. O princípio ativo não causa efeitos parassimpaticomiméticos, nem danos hepáticos, desde que administrado na dose recomendada (SILVA et al., 2004).

4.7 REFERÊNCIAS

- ABDUL-MAJEED, H.A.; ABBAS, F.H.; ABBOOD, H.F. Blood picture and hepatic changes in rabbits experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. Iraqi strain. **Medical Journal of Babylon**, v.4, n. 3-4, p.358-364, 2007.
- ADAMS, E.R.; HAMILTON, P.B.; RODRIGUES, A.C.; MALELE, I.I.; DELESPAUX, V.; TEIXEIRA, M.M.G.; GIBSON, W. New *Trypanosoma (Duttonella) vivax* genotypes from *tsé-tsé* flies in East Africa. **Parasitology Cambridge Journals**, v.137, n.4, p.641-650, 2010.
- ADAMU, S.; FATIHU, M.Y.; USEH, N.M.; MAMMAN, M.; SEKONI, V.O.; ESIEVO K.A.N. Sequential testicular and epididymal damage in zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.1, p.29-34, 2007.
- ADEJINMI, J.O.; AKIMBOADE, O.A. Serum biochemical changes in WAD goats with experimental mixed *T. brucei* and *Cowdria ruminantium* infections. **Tropical Veterinary**, v.18, n.1-2, p.111-120, 2000.
- ALMEIDA, K. A.; FREITAS, F. L. C.; JORGE, R. L. N.; NOGUEIRA, C. A. S.; MACHADO, R.Z.; NASCIMENTO, A.A. Aspectos hematológicos da infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n. 4, p. 1121-1127, 2008.
- AQUINO, L.P.C.T. Importância da infecção por *Trypanosoma evansi* em cães no Brasil. **Ensaio e Ciência**, v. 5, n.5, p.61-68, 2007.
- AQUINO, L.P.C.T. et al. Caracterização antigênica do *Trypanosoma evansi* usando soros de bovinos, equinos, cães e quatis experimentalmente e naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.19, n.2, p.112-118, 2010.
- ARAÚJO, R. V. **Os jesuítas dos 7 povos**. Porto Alegre: La Salle, 1990. 467 p.
- BARAL, T. N. Immunobiology of african trypanosomes: Need of alternative interventions. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, p.1-24, 2010.
- BARRETT, M. P. et al. Trypanosome glucose transporters. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, n.1, p. 195-205, 1998.
- BASSI, P.B. **Cinética dos parâmetros clínicos, hematológicos e imunológicos em bovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax***. 2014. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Uberaba, 2014.
- BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M.M.G.; MADRUGA, C.R.; SIMÕES, S.D.V.; MAIA, T.F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semi-arid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.2, p.174-181, 2007.

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

BATISTA, J. S.; RODRIGUES, C. M. F.; OLINDA, R. G.; SILVA, T. M. F.; VALE, R. G.; CÂMARA, A. C. L.; REBOUÇAS, R. E. S.; BEZERRA, F. S. B.; GARCÍA, H. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, v.110, n.1, p.73-80, 2012.

BAZZOLI, R.S.; MARQUES, L.C.; MACHADO, R.Z.; AQUINO, L.P.C.; ALESSE, A.C.; CAMACHO, A.A. Transmissão oral de *Trypanosoma evansi* em cães. **ARS Veterinária**, v.18, n.2, p.148-152, 2002.

CADIOLI, F.A.; BARNABÉ, P.A.; MACHADO, R.Z.; TEIXEIRA, M.C.A.; ANDRÉ, M.R.; SAMPAIO, P.H.; FIDÉLIS JÚNIOR, O.L.; TEIXEIRA, M.M.G.; MARQUES, L.C. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.2, p.118-124, 2012.

CAMARGO, M. A. R.; MARTINS, V. M. V. Raça bovina Crioula Lageana, um patrimônio genético. **Revista A Hora Veterinária**, v.24, n.143, p.61-64, 2005.

CHAMOND, N.; COSSON, A.; BLOM-POTAR, M.C.; JOUVION, G.; D'ARCHIVIO, S.; MEDINA, M.; DROIN-BERGE'RE, S.; HUERRE, M.; GOYARD, S.; MINOPRIO, P. *Trypanosoma vivax* Infections: pushing ahead with mouse models for the study of nagana. I. parasitological, hematological and pathological parameters. **Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.8, p.1-10, 2010.

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

CONRADO, A.C.; LOPES, S.T.A.; OLIVEIRA, L.S.S.; MONTEIRO, S.G.; VARGAS, D.L.B.; BUENO, A. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região central do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.928-931, 2005.

DAGNACHEW, S.; BEZIE, M.; TEREFE, G.; et al. Comparative clinico-haematological analysis in young zebu cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.57, n.24, p.1-9, 2015.

DAMAYANTI, R.; GRAYDON, R.J.; LADDS, P.W. The pathology of experimentally *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Journal of Comparative Pathology**. v.110, n.3, p.237-252, 1994.

DESTA, T.T.; AYALEW W.; HEGDE, P.B. Farmers' perceptions on trypanosomosis and trypanotolerance character of the taurine Sheko. **Tropical Animal Health Production**, v.44, n.3, p.609-616, 2012.

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

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: A review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-20, 2013b.

DESQUESNES, M.; DÁVILA, A. M.R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, v.109, n.3-4, p.213-231, 2002.

DOKO, A. et al. Trypanosomiasis in diferente breeds of cattle from Benin. **Veterinary Parasitology**, v.40, n.1-2, p.1-7, 1991.

EGITO, A. A. de; ALBUQUERQUE, M. S.; MARIANTE, A. da S. Caracterização genética de raças naturalizadas. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, p.121-126, 2001.

FATHUDDIN, M.M.; INABO, H.I. In vitro antitrypanosomal potential of chloroform leaf extract of *Punica granatum L.* on *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma evansi*. **Microbiology Research**, v. 8, n.1, p.24-27, 2017.

FINO, T.C.M. et al. Occurrence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in Crioula Lageana cattle. **Journal of Animal Sciences Advances**, v.3, n.4, p.165-170, 2013.

FIORAVANTI, M.C.S.; FREITAS, T.M.S.; MOURA, M.I.; COSTA, G.L.; DIAS, J.M.; GUIMARÃES, L.K.P.; GÓMEZ, M.M. Resistance and resilience to diseases in local ruminant breeds: a focus on South America. **Archivos de Zootecnia**. v.69, n.267, p.338-352, 2020.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Sulina, 2004, 606 p.
FRANGE, R. C. C. **Tripanossomíase em vacas da microrregião de Uberaba-MG: Estudo soroepidemiológico e relato de surto**. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Uberaba, 2013.

GARCIA, H. et al. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.100, n.4, p.297-305, 2006.

GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, v.28, n.1, p. 229-317, 1989.

- GÓMEZ-PIÑERES, E., TAVARES-MARQUES, L., REYNA-BELLO, A. Tiempo de supervivencia in vivo y criopreservación de *Trypanosoma vivax*. **Revista Científica, FCV-Luz**, v.19, n.3, p.225-229, 2009.
- GRESSLER, L.T., SILVA, A.S., OTTO, M.A., AZEVEDO, M.I., ZANETTE, R.A., MONTEIRO, G.M., SANTURIO, J.M. Níveis de imunoglobulinas em ratos infectados por *Trypanosoma evansi*. **Ciência Animal Brasileira**. v.11, n.1, p.201-204, 2010.
- GUERREIRO, L.T.A. **Identificação e caracterização de minicírculos de *Trypanosoma vivax* (Zieman, 2005) através de geração e análise de GSS (Genome Sequence Survey)**. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, 2005.
- HERRERA, H.M.; DÁVILA, A.M.R.; NOREK, A.; ABREU, U.G.; SOUZA, S.S.; D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n.3-4, p. 263-275, 2004.
- HILALI, M.; ABDEL-GAWAD, A.; NASSAR, A & ABDEL-WAHAB, A. Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v.139, n.1-3, p. 237–243, 2006.
- IGBOKWE, I. O. Mechanisms of cellular injury in african trypanosomiasis. **International Veterinary Bulletin**, v.64, n.7, p.611-620, 1994.
- KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5th ed. Academic Press, 1997. 932 p.
- MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER, I.B.; RIBEIRO, L.R.; KESSLER, R.H.; SOARES, C.O.; MIGUITA, M.; MELO, E.P.; ALMEIDA, R.F; LIMA JÚNIOR, M.M. The development of an enzyme-linked immune sorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.7, p.51-56, 2006.
- MARIANTE, A. da S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2000. 232 p.
- 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**, v.85, n.2, p.193-205, 1997.
- MARTINS, V.M.V., VEIGA, T.F., MARTINS, E., QUADROS, S.A.F., CARDOSO, C.P., RIBEIRO, J.A.R. **Raça Crioula Lageana: O esteio de ontem, o labor de hoje e a oportunidade do amanhã**. Ed: ABCCL, Lages. 2009. 80 p.
- MATTIOLI, R.C.; FAYE, J. A.; JAITNER, J. Estimation of trypanosomal status by the buffy coat technique and an antibody ELISA for assessment of the impact of trypanosomiasis on health

and productivity of N'Dama cattle in The Gambia. **Veterinary Parasitology**, v.95, n.1, p.25-35, 2001.

MELÉNDEZ, M. F.; WILLIAM, F. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. **The Journal of Parasitology**, v.79, n.2, p.293-294, 1993.

MOURA, D. M. et al. Perfil bioquímico de bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**, supl.1, p.648-653, 2009b.

OSÓRIO, A. L. A. R., MADRUGA, C. R., DESQUESNES, M., SOARES, C. O., RIBEIRO, L. R. R. AND DA COSTA, S. C. G. (2008). *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.1, p.1-13.

PAIVA, F.; LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO, L.; MORI, A.E.; BRUM, K.B.; BERNARDO, K.C. *Trypanosoma vivax* em bovinos no pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: I – acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.2, p.135-141. 2000.

PAIVA, E. **Tripanossomíase por *Trypanosoma vivax* em pequenos ruminantes: descrição de surtos e infecção experimental da doença**. 2009, 84f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, 2009.

REINERT, K. E. DNA multimode interaction with berenil and pentamidine; double Helix stiffening, unbending and bending. **Journal of Biomolecule Structure and Dynamics**, New York, v.17, n.2, p.311-331, 1999.

RODRIGUES, A.; FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SCHILD, A.L.; SOARES, M.P.; MILANO, J.; BARROS, C.S.L. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.239-249, 2005.

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*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.4, p.157-161, 2001.

SIMUKOKO, H.; MARCOTTY, T.; VERCRUYSSSE, J.; BOSSCHE, P.V. Bovine trypanosomiasis risk in an endemic area on the eastern plateau of Zambia. **Research in Veterinary Science**, v.90, n.1, n.90, p.51-54, 2011.

SILVA, R.A.M.S.; AROSEMENA, N.A.E.; HERRERA, H.M.; SAHIB, C.A.; FERREIRA, M.S. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.60, n.1-2, p.167-171, 1995.

SILVA, R.A.M.S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A.M.R. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: **Biologia, Diagnóstico e Controle**. Embrapa, 2002, 137 p.

SILVA, A.S. et al. Tripanossomose em equinos na região sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, n.2, p.113-120, 2010.

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**. Embrapa, 2004, 21 p.

SILVA, A.S.; COSTA, M.M.; DOYLE, R.L.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S.G. Infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em coelhos. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.2, p.519-523, 2008.

SILVA, A.S.; COSTA, M.M.; POLENZ, M.F.; POLENZ, C.H.; TEIXEIRA, M.M.G.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S.G. First report of *Trypanosoma vivax* in bovines in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2550-2554, 2009.

TAIWO, V.O.; OLANIYI, M.O.; OGUNSANMI, A.O. (2003) Comparative plasma biochemical changes and susceptibility of erythrocytes to in vitro peroxidation during experimental *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* infection in sheep. **Israel Journal Veterinary Medicine**, v.58, n.4, p.30-33, 2003.

TAKEET, M.; FAGBEMI, B.O. Haematological, pathological and plasma biochemical changes in rabbits experimentally infected with *Trypanosoma congolense*. **Science World Journal**, v.4, n.2, p.29-36, 2009.

TEIXEIRA, M.C.A. **Estudo clínico, hematológico, bioquímico sérico, parasitológico, imunológico e patológico de bovinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* steel, 1885 (sarcomastigophora: trypanosomatidae)**. 2010. 131p. Tese (Doutorado) - universidade Estadual Paulista, 2010.

TEIXEIRA, W.T et al. Transfer of passive immunity and serum proteinogram in the first six months of life of Criollo Lageano and black and white holstein calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.10, p.980-986, 2012.

VAZ, A.J. **Imunoensaios utilizado conjugados**. In: VAZ, A.J.; TAKEI, K; BUENO E.C. Imunoensaios: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p 73-78, 2007.

VEIGA, T.F.; QUADROS, S.A.F.; MARTINS, E., IMPROTA, C.T.R. Raça Crioula Lageana: percepções em relação às possibilidades de sua exploração na região do planalto catarinense. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n.1, p.29-38, 2009.

VENTURA, R.M.; PAIVA, F.; SILVA, R.A.M.; TAKEDA, G.F.; BUCK, G.A.; TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. **Experimental Parasitology**, v.99, n.1, p.37-48, 2001.

WILLIAMS, D. J. L.; TAYLOR, K. A.; NEWSON, J.; GICHUKI, B. The role of anti-variable surface glycoprotein antibody responses in bovine trypanotolerance. **Parasite Immunology**, v.18, n.4, p.209-218, 1996.

5 PREVALÊNCIA DE *Trypanosoma evansi* EM BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA

RESUMO

A tripanossomíase bovina causa grandes prejuízos para a pecuária em função das altas taxas de morbidade, perdas produtivas e mortalidade. O conhecimento sobre o comportamento das infecções por *Trypanosoma evansi* são vastos, no entanto em raças nativas são escassos. Determinadas raças bovinas possuem a particularidade de ser tripanotolerantes, e para essa investigação, torna-se imprescindível determinar a prevalência, e posteriormente características referentes a tolerância ou resistência, sendo ferramenta em programas de controle de surtos em populações. O objetivo do trabalho é determinar a prevalência de *T. evansi* em bovinos da raça Crioula Lageana, e relacionar os aspectos clínicos, hematológicos e bioquímicos à infecção, visando novos estudos acerca da sanidade e tolerância a doenças nesta população. Foram utilizadas amostras de sangue de 310 bovinos da raça Crioula Lageana, sendo submetidas a PCR e RIFI. A prevalência de *T. evansi* foi de 8% (24/310) na PCR e 4% (11/310) na RIFI. Nos animais positivos, houve aumento nos movimentos ruminais. Observou-se aumento no número de eosinófilos e diminuição de monócitos em animais positivos, ambos estando dentro dos valores de referência para a espécie. Observou-se menor concentração de albumina em animais positivos, permanecendo abaixo dos valores de referência em ambos os grupos, e também triglicerídeos, este estando acima dos valores fisiológicos para a espécie nos grupos positivo e negativo. Houve aumento da atividade de GGT em animais positivos. Conclui-se que os bovinos da raça Crioula Lageana encontram-se em situação de instabilidade enzoótica, com baixa prevalência para a infecção por *T. evansi* pelas técnicas de PCR e RIFI. Os animais não apresentam alterações nas variáveis clínicas, hematológicas e bioquímicas que possam ser justificadas pela presença do hemoparasito.

Palavras-chave: Hematologia. Raça nativa. Tripanossomíase. Sanidade.

5.1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma evansi* possui distribuição ampla, afetando espécies selvagens, domésticas e humanos (JOSHI et al., 2006). A transmissão do parasito depende de vetores, como tabanídeos e moscas do gênero *Stomoxys*, entre outras formas mecânicas associadas (DESQUESNES et al., 2013b). De forma geral bovinos apresentam-se subclínicos, sendo considerados reservatórios para o agente (SHARMA et al., 2013).

A epidemiologia da tripanossomíase depende, entre outros fatores, de características raciais, predispondo ou não o desenvolvimento da doença clínica. Raças tripanotolerantes, ou seja, animais que mantêm capacidade produtiva mesmo infectados, podem ser usados como ferramenta de prevenção e controle (DOKO et al., 1991).

A raça Crioula Lageana possui rusticidade e adaptabilidade conhecidas, existindo núcleos de conservação *in situ* para manutenção dos animais, sendo importante forma de conservação de recursos genéticos (MARTINS et al., 2009).

A realização de trabalhos verificando prevalência e resposta dos bovinos desta raça frente à infecção por *T. evansi* é valiosa para o entendimento do status sanitário desses rebanhos, visto que populações apresentando instabilidade enzoótica, são mais propensas ao aparecimento de surtos da doença clínica, podendo levar a perdas significativas nestes rebanhos, sejam econômicas ou como patrimônio genético (SMITH, 2000). Cabe ressaltar que portadores assintomáticos são fonte de infecção para outros animais (VENTURA et al., 2001).

Dados referentes à sanidade, são fundamentais para atender às exigências de comercialização de produtos animais (JULIANO et al., 2014). Sendo assim, levantamentos epidemiológicos baseados em técnicas moleculares associadas a técnicas sorológicas fornecem dados mais precisos e confiáveis (FIDELIS JUNIOR et al., 2019).

Este estudo objetiva apresentar o primeiro levantamento de dados epidemiológicos da infecção por *T. evansi* em bovinos da raça Crioula Lageana por meio de PCR e RIFI e comparar variáveis do exame clínico, hemograma e bioquímica sérica entre animais naturalmente infectados ou não.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Determinação do Tamanho Amostral

Para a avaliação da prevalência de *T. evansi* na população de bovinos da raça Crioula Lageana, foram utilizadas as seguintes fórmulas de acordo com a OPAS (1979):

$$n_0 = \frac{1,96^2 [p(1-p)]}{(d)^2}$$

Onde n_0 é o número de amostras; p a prevalência esperada e d a margem de erro. Admitindo-se prevalência estimada de 50% de amostras positivas, um intervalo de confiança de 95% e uma margem de erro de 5%, o resultado obtido foi de 384 animais. No entanto, como trata-se de uma população finita, procedeu-se o seguinte cálculo:

$$n = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

Onde N é o número total de animais na população, sendo que para a raça Crioula Lageana esse número é de 1.500 animais. A partir destes cálculos, chegou-se ao número final de 306 animais a serem amostrados.

5.2.2 Animais e Obtenção das Amostras

Foram colhidas amostras de sangue de 310 bovinos da raça Crioula Lageana, machos adultos ($n=32$) e fêmeas adultas ($n=207$), jovens ($n=71$; machos e fêmeas), todos registrados na Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL), oriundos de 6 propriedades núcleos de conservação *in situ*, localizadas na região do Planalto Catarinense, nos municípios de Lages (Latitude: -27.8167, Longitude: -50.3264 27° 49' 0" Sul, 50° 19' 35" Oeste, Altitude 930 metros), Paineira (Latitude: 27° 55' 30" Sul, Longitude: 50° 6' 12" Oeste, Altitude 1.101 metros), Curitibanos (Latitude: 27° 16' 58" Sul, Longitude: 50° 35' 04" Oeste, Altitude 987 metros) e Ponte Alta (Latitude: 27° 29' 03" Sul, Longitude: 50° 22' 49" Oeste, Altitude: 856 metros). A coleta foi realizada por venopunção da veia jugular externa, sendo utilizados tubos de coleta à

vácuo com e sem anticoagulante EDTA a 10% para realização do hemograma e bioquímica sérica. As amostras foram congeladas a -20°C até a extração do DNA e realização da PCR.

5.2.3 Exame Físico

O exame físico foi empregado para a verificação de sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, onde aferiu-se a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal, movimentos ruminais (MR) e coloração das mucosas.

5.2.4 Extração de DNA

As amostras de sangue, após seu descongelamento foram imediatamente submetidas à extração de DNA por meio de kit comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (PROMEGA®), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, a concentração de cada amostra de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific®).

5.2.5 Análise Molecular

5.2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação do DNA genômico extraído das amostras de sangue e controles positivos, foram realizadas as PCRs para amplificação de um fragmento da sequência intergênica do gene SL, em micro tubos de 0,2mL, ao qual foi adicionado um volume final de 25 μL de solução, contendo 1U de enzima Taq Polimerase GoTaq® Hot Start Polymerase, (Promega); 8,5 pmoles de cada par de primers (RoTat 1.2 Forward GCG GGG TGT TTA AAG CAA TA e RoTat 1.2 Reverse ATT AGT GCT GCG TGT GTT CG), 0,2mM de nucleotídeos (dNTPs); 3,25mM de cloreto de magnésio; 5 μL de tampão 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 3 μL de DNA (concentração entre 20 e 100ng/ μL) e água ultrapura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Um controle negativo foi utilizado para garantir a qualidade e especificidade da técnica, abordando os mesmos parâmetros citados anteriormente, substituindo apenas o uso de DNA

genômico por água ultrapura, livre de DNase. As condições de temperatura aplicadas no termociclador (Biocycler) envolveram a desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 73°C por 1 minuto, e ainda uma extensão final a 73°C por 7 minutos. A eletroforese dos produtos de amplificação (fragmento de 210 pb) foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 2% com 1µL de corante Unisafe Dye adicionado diretamente no gel e 1µL de tampão de amostra (azul de bromofenol e glicerol) para cada produto. Na primeira lacuna do gel foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb (Ludwig) como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 100 Volts por 40min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta.

5.2.5.2 Imunofluorescência indireta (RIFI)

Para obtenção de tripomastigotas utilizadas na confecção dos antígenos de RIFI, foram usadas duas amostras de *T. evansi* armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C, isolados do município de São Borja – Rio Grande do Sul, Brasil. Essas amostras foram descongeladas em banho Maria a temperatura de 37 °C, e retirada uma alíquota (0,1 mL), as quais foram inoculadas via intraperitoneal em Ratos, Wister, machos, com seis meses de idade. Foram coletados 8 mL de sangue com EDTA (0,5M), por punção cardíaca dos ratos no seu pico de parasitemia de 200 parasitos por campo (objetiva 100x) após 5 dias de inoculação do antígeno. As amostras de sangue foram centrifugadas, durante cinco minutos em centrífuga Celm[®]. Após a centrifugação retirou-se toda a papa leucocitária das amostras de todos os tubos e transferidos para um tubo falcon de 15 ml e acrescentado solução fisiológica para lavagem da amostra por duas vezes consecutivas. Foram preparadas 100 lâminas de esfregaço sanguíneo grosso com 30µl de sangue e fixados com acetona por 15 minutos. Os esfregaços foram embalados com papel toalha e envolvidos em papel alumínio e congelados a -20°C para realização de lâminas de imunofluorescência indireta posteriormente. O teste de fluorescência para detectar anticorpos anti-*T. evansi* foi realizado conforme metodologia descrita por Camargo (1966) com modificações. Inicialmente as lâminas com antígeno fixado foram retiradas do freezer, secas a temperatura ambiente e as delimitações foram feitas com esmalte. Os soros controles positivos e negativos, produzidos em ratos, foram diluídos em PBS nas diluições de 1:40, e para as amostras de soro bovino, da raça Crioula Lageana, oriundas da região do Planalto Catarinense foram diluídos em PBS nas diluições de 1:40, 1:80, 1:160 e distribuídos

20 µl nas lâminas contendo o antígeno de *T. evansi*. A lâmina foi incubada por 50 minutos em câmara úmida a 37° C e posteriormente lavada com PBS por três vezes. Em seguida acrescentou-se o conjugado anti-IgG bovino marcado com FITC na diluição 1:300 para as amostras testadas e o anti-IgG rato marcado com FITC para os controles 1:32. A lâmina foi novamente incubada por 40 minutos e lavada com PBS como descrito previamente. Após a secagem da lâmina a leitura foi realizada em microscópio epifluorescente Nikon®. Amostras foram consideradas reagentes (positivos) na titulação de 1:80.

5.2.6 Hematologia

Para as contagens de eritrócitos e leucócitos totais, bem como para a determinação do volume globular e da concentração de hemoglobina, além dos índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) utilizou-se contador automático de células (SDH3 Labtest). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio da análise microscópica de esfregaços sanguíneos corados com corantes do tipo Romanowsky (Panótico Rápido) (JAIN, 1993). A concentração da proteína total plasmática (PTP) foi determinada por refratometria (ATAGO) e a concentração do fibrinogênio plasmático pelo método de precipitação pelo calor seguida por leitura em refratômetro (JAIN, 1993).

5.2.7 Bioquímica sérica

A análise do perfil bioquímico sérico foi realizado por meio da atividade enzimática da gamaglutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatina fosfoquinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e concentrações séricas de ureia, creatinina, proteína total sérica, albumina, globulina, colesterol, triglicerídeos e glicose. As provas bioquímicas foram realizadas por meio de métodos cinético e colorimétrico em analisador bioquímico automático Labmax Plenno® (v2.09.05).

5.2.8 Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Para a comparação das médias das variáveis, tanto clínicas, hematológicas e bioquímicas entre animais positivos e negativos utilizou-se o teste t para dados considerados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os não-paramétricos. Para avaliação da concordância entre os dois métodos diagnósticos, realizou-se o teste Cohen's Kappa. Para todos os testes admitiu-se probabilidade de erro de 5%.

5.2.9 Comitê de Ética

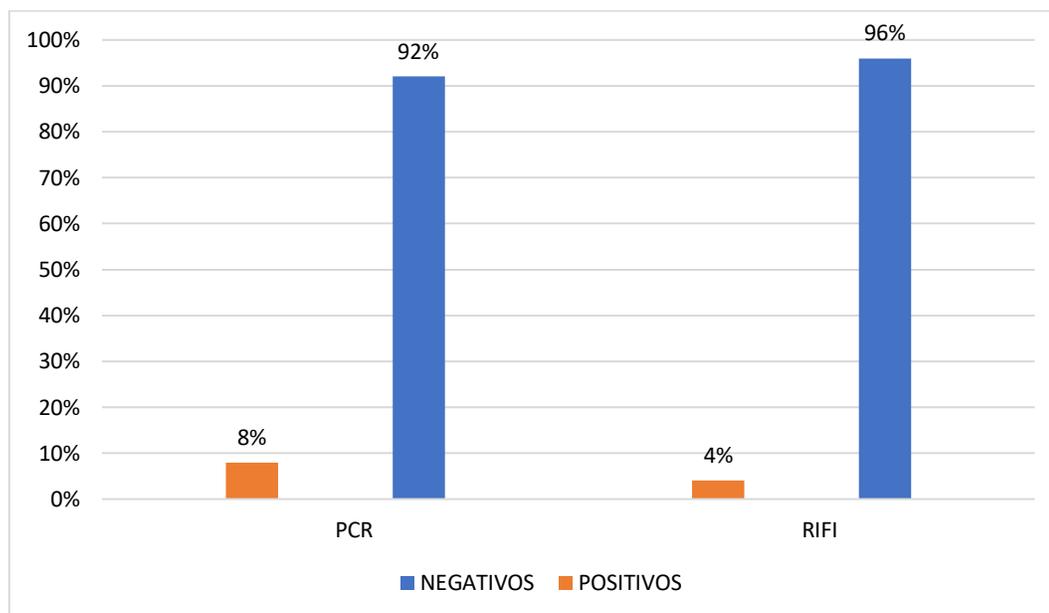
Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob número de protocolo 4107030419.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Prevalência

A prevalência de *Trypanosoma evansi* foi de 8% (24/310) pela reação em cadeia de polimerase (PCR) e de 4% (11/310) pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Prevalência de *T. evansi* em bovinos da raça Crioula Lageana, pelas técnicas de PCR e RIFI, no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Os métodos de análise PCR e RIFI apresentaram concordância de avaliação de 90% para o vetor *T. evansi* (Tabela 1). Entretanto, a confiabilidade entre os métodos acessada pelo teste de Cohen's Kappa foi de $0,069 \pm 0,05$ para o vetor *T. evansi*.

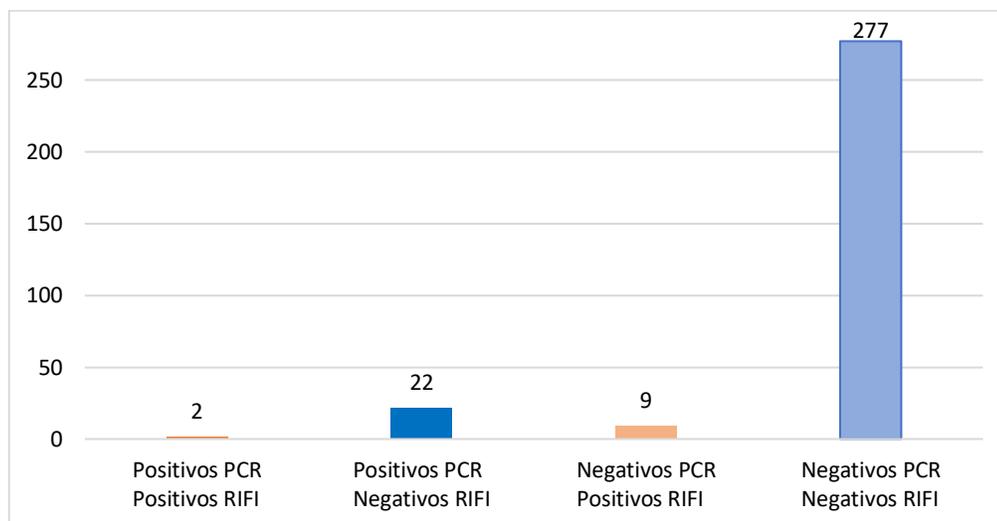
Tabela 1. Avaliação de concordância e teste de Cohen's Kappa para confiabilidade entre as avaliações pelos métodos PCR e RIFI para o agente *T. evansi*, bovinos da raça Crioula Lageana, no estado de Santa Catarina, Brasil.

Avaliação de concordância					
Agente	Tamanho da amostra (n)	Coincidentes	Percentual	95% intervalo de confiança	
<i>T. evansi</i>	310	280	90.03	86.15	93.13
Teste de Cohen's Kappa					
Agente	Kappa	Erro padrão	Z	P value	
<i>T. evansi</i>	0.069	0.052	1.324	0.0927	

Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Apenas dois animais (2/310, 0,65%), apresentaram-se positivos para *T. evansi*, perante as duas técnicas (PCR e RIFI) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Número de casos positivos e negativos diagnosticados pelos métodos PCR e RIFI para o agente *T. evansi*, bovinos da raça Crioula Lageana, no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

5.3.2 Exame Físico

Houve diferença na frequência de movimentos ruminais em animais avaliados pela técnica da PCR, sendo maior em animais considerados positivos, permanecendo ambos os grupos abaixo dos valores de referência para a espécie (FEITOSA, 2014) (Tabela 2). A média das frequências cardíacas dos dois grupos, perante as duas técnicas de diagnóstico, ultrapassou o limite máximo do valor de referência para a espécie bovina (Tabela 2 e 3) (NAAS et al., 2001), porém não diferiram estatisticamente.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão dos valores do exame físico de bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da PCR.

Variáveis	Positivos	Negativos	P
Temperatura (°C)	39,0±0,37	38,89±0,59	0,304
MR (mov/5min)	4,45±2,35	3,42±2,18	0,032*
FR (mov/min)	29,08±10,0	29,31±8,63	0,559
FC (bat/min)	82,66±27,24	87,1±23,67	0,236

* Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Tabela 3. Médias e desvios-padrão dos valores do exame físico de bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da RIFI.

Variáveis	Positivos	Negativos	P
Temperatura (°C)	39,06±0,38	38,89±0,58	0,272
MR (mov/5min)	5,18±3,28	3,44±2,14	0,096
FR (mov/min)	32,54±7,80	29,17±8,74	0,150
FC (bat/min)	92,90±21,11	86,53±24,04	0,263

* Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

5.3.3 Avaliação Hematológica

Houve diferença estatística com menor número de monócitos e maior número de eosinófilos em animais positivos, ambos pelas técnicas de PCR, porém, permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie (JAIN, 1993) (Tabela 4). Não houve diferença entre positivos e negativos para as variáveis hematológicas pela técnica da RIFI (Tabela 5).

Tabela 4. Médias e desvios-padrão dos valores do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da PCR, no estado de Santa Catarina, Brasil.

Variáveis	Positivos	Negativos	P
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,06±0,95	7,98±1,51	0,645
Hemoglobina (g/dL)	12,98±1,64	12,77±1,80	0,579
VG (%)	37±7	37,41±5,10	0,541
VGM (fL)	46,61±8,01	47,82±7,18	0,431
CHGM (%)	36,09±10,81	34,12±1,13	0,691
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	349±185	378,92±185,83	0,385
PPT	7,60±0,54	7,41±0,74	0,148
Fibrinogênio	379±156	388,50±200,23	0,964

Leucócitos totais (/μL)	12063±4180	12803,41±5179,23	0,663
Bastonetes (/μL)	34±89	27,51±83	0,727
Segmentados (/μL)	3446±1745	3438,37±2700	0,425
Linfócitos (/μL)	7332±2638	8196,54±3617	0,436
Eosinófilos (/μL)	1023±931	685,90±674	0,031*
Basófilos (/μL)	5±20	10,44±42	0,969
Monócitos (/μL)	225±233	444,74±415	0,003*

*Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Tabela 5. Médias e desvios-padrão dos valores do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da RIFI, no estado de Santa Catarina, Brasil.

Variáveis	Positivos	Negativos	P
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	7,80±1,09	8,00±1,49	0,778
Hemoglobina (g/dL)	12,21±1,31	12,80±1,80	0,280
VG (%)	34±7	38,0±5,09	0,104
VGM (fL)	43,80±10,44	47,87±7,08	0,067
CHGM (%)	38,96±15,77	34,10±1,17	0,376
Plaquetas (x10 ³ /μL)	400±231	376±184,19	0,835
PPT	7,66±0,60	7,41±0,73	0,218
Fibrinogênio	500±210	384±215,22	0,051
Leucócitos totais (/μL)	11712±2961	12784±5168,06	0,834
Bastonetes (/μL)	13±45	29,0±84	0,606
Segmentados (/μL)	2555±1419	3471±2667	0,249
Linfócitos (/μL)	7987±1941	8135±3603	0,752
Eosinófilos (/μL)	705±753	712±700	0,840
Basófilos (/μL)	27±90	9,00±38	0,805
Monócitos (/μL)	424±407	428±409	0,887

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

5.3.4 Avaliação Bioquímica

Houve diferença na atividade enzimática da GGT, com valores maiores em animais positivos, avaliados pela PCR (Tabela 6). Na RIFI, albumina e triglicerídeos foram menores nos animais positivos para a infecção, porém albumina permaneceu abaixo dos valores de referência para a espécie bovina em ambos os grupos. Já os triglicerídeos permaneceram acima dos valores de referência, em ambos os grupos positivo e negativo (KANEKO, 1997) (Tabela 7).

Tabela 6. Médias e desvios-padrão dos valores do bioquímico de bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da PCR, no estado de Santa Catarina, Brasil.

Variáveis	Positivos	Negativos	P
PTS (g/dL)	5,03±0,70	5,19±1,02	0,527
Globulinas (g/dL)	2,74±0,76	2,88±0,88	0,458
Albumina (g/dL)	2,28±0,39	2,30±0,42	0,652
GGT (U/L)	18,04±6,51	15,66±6,91	0,025*
AST (U/L)	63,08±28,04	59,94±20,27	0,856
FA (UI/L)	115,44±113,24	110,23±98,19	0,694
ALT (U/L)	25,40±11,12	30,21±14,76	1,000
CK (U/L)	201,48±155,17	203,64±327,67	0,309
LDH (U/L)	1439,52±157,23	1441,23±177,39	0,909
Ureia (mg/dL)	31,12±11,20	31,49±10,66	0,702
Creatinina (mg/dL)	1,47±0,37	1,45±0,37	0,832
Colesterol (mg/dL)	128,28±33,06	122,82±39,21	0,500
Triglicerídeos (mg/dL)	24,08±7,00	23,14±7,51	0,359
Glicose (mg/dL)	65,8±26,06	67,90±21	0,413

* Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Tabela 7. Médias e desvios-padrão dos valores do bioquímico em bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. evansi*, avaliados pela técnica da RIFI.

Variáveis	Positivos	Negativos	P
PTS (g/dL)	5,18±0,54	5,18±1,02	0,795
Globulinas (g/dL)	3,1±0,61	2,86±0,88	0,384
Albumina (g/dL)	2,08±0,16	2,31±0,42	0,046*
GGT (U/L)	19,63±18,02	15,69±6,16	0,993
AST (U/L)	63±21,82	59,95±20,87	0,604
ALT (U/L)	30,18±10,40	29,84±14,70	0,810
FA (UI/L)	89,54±51,99	111,39±100,73	0,595
CK (U/L)	185±107,88	203,64±322,71	0,633
LDH (U/L)	1416,90±158,15	1441,52±176,52	0,476
Ureia (mg/dL)	30,36±7,63	31,49±10,80	0,875
Creatinina (mg/dL)	1,52±0,30	1,45±0,37	0,534
Colesterol (mg/dL)	102,63±36,70	124,05±38,71	0,072
Triglicerídeos (mg/dL)	18,72±4,42	23,39±7,52	0,020*
Glicose (mg/dL)	65±11,59	67,85±21,72	0,821

*Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

5.4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo de prevalência para *T. evansi* em bovinos da raça Crioula Lageana. Os dados epidemiológicos encontrados para esta população revelaram que os animais avaliados encontram-se em situação de instabilidade enzoótica (SMITH, et al., 2000). Esse caráter pode tornar os animais mais suscetíveis à doença clínica e ao aparecimento de surtos. Todos os animais mostraram-se assintomáticos no momento da coleta das amostras, apesar dos movimentos ruminais apresentarem-se abaixo dos valores de referência para a espécie, em animais positivos perante a PCR (FEITOSA, 2014), não sendo correlacionada com a doença clínica.

Na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos mostrando a prevalência da infecção natural por *T. evansi* no Brasil, na espécie bovina, impedindo a comparação com o trabalho aqui realizado, porém, surtos da doença, com descrição de animais apresentando sinais

clínicos da doença foram reportados em Santa Catarina (SILVA et al., 2007) e no Mato Grosso (SANTOS et al., 2009).

Os métodos de análise RIFI e PCR apresentaram concordância de avaliação de 90% para o vetor *T. evansi*. A confiabilidade acessada pelo teste de Cohen's Kappa foi de $0,069 \pm 0,05$ para o vetor *T. evansi*, valor considerado nulo, com menos de 4% de dados confiáveis (MC HUGH, 2012).

Para esta avaliação, podendo elucidar a concordância entre os testes RIFI e PCR, seria ideal utilizar apenas animais positivos para o agente, comparando assim os testes, situação esta, que seria possível através de infecção experimental ou com a realização de ambos testes em animais sabidamente positivos.

A pequena confiabilidade está associada a baixa consistência entre os métodos. Em apenas dois casos ambos métodos diagnósticos foram positivos para *T. evansi*, corroborando com Fidelis Junior (2019) que cita a importância da realização de testes sorológicos, associados a testes moleculares em trabalhos de prevalência.

A RIFI detecta anticorpos circulantes, ou seja, pressupõe-se que o animal teve contato com o agente em algum momento de sua vida, ou que possui infecção crônica com baixa parasitemia. Testes moleculares, como a PCR, identificam a presença do agente, pressupondo infecção ativa (FIDELIS JUNIOR et al., 2019).

Bovinos normalmente apresentam-se subclínicos para a tripanossomíase causada por *T. evansi*, sendo considerados reservatórios para o agente, e potenciais contaminantes para outros animais (SHARMA et al., 2013). Quando acometidos pela doença clínica, apresentem febre, abortamento, diminuição da produção de leite e emagrecimento progressivo (RIBEIRO, 2016).

Para a população da raça Crioula Lageana, a ocorrência de doença clínica nunca foi reportada na literatura, apesar de um surto de tripanossomíase causado pelo *T. evansi* ter ocorrido no município de Videira, no estado de Santa Catarina (DA SILVA et al., 2008). A ausência de animais apresentando a doença clínica nos rebanhos da raça Crioula Lageana não permitiu a comparação das variáveis clínicas entre animais positivos para o *T. evansi*, doentes ou não. Todos os animais infectados pelo hemoparasito foram considerados subclínicos, e todos os parâmetros aferidos confirmaram a condição.

A ocorrência de surtos da doença permitiria uma comparação mais apurada das variáveis clínicas, hematológicas e bioquímicas entre animais saudáveis e doentes, sendo possível observar

diferenças entre os animais que desenvolvessem a forma clínica da doença com aqueles que se tornaram subclínicos.

Dentro das variáveis hematológicas analisadas, foram encontradas pouquíssimas evidências de alterações que podem estar relacionadas à infecção por *T. evansi*, porém, sendo inespecíficas.

Em relação ao hemograma, e concordando com Teixeira (2010), a infecção por *T. evansi* não foi capaz de desencadear anemia, não havendo diferença entre animais positivos e negativos, demonstrando que a infecção subclínica pelo agente não causa alterações como se esperaria em animais apresentando doença clínica.

Leucocitose por monocitose foram observados por Teixeira (2010) e podem estar relacionados a uma possível resposta frente à estimulação antigênica ocorrido pelo parasita (SILVA, et al., 2010). Diferentemente do observado por Teixeira (2010), nos animais da raça Crioula Lageana, houve diminuição no número de monócitos em animais positivos para o agente, quando comparados com animais negativos, porém, ambos grupos, permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie bovina (JAIN, 1993).

Os animais considerados positivos para *T. evansi* através da PCR, apresentaram aumento no número de eosinófilos, em comparação ao grupo negativo, porém, permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie bovina (JAIN, 1993). Teixeira (2010) não observou alterações, não diferindo o número de eosinófilos entre animais positivos e negativos.

O aumento no número de eosinófilos é uma característica de infecções parasitárias e está associada a reação de hipersensibilidade de tipo imediato (SIVAJOTHI et al., 2014).

Animais positivos para *T. evansi* na PCR apresentaram valores de GGT acima do intervalo de referência para a espécie bovina (KANEKO, 1997), diferindo do grupo negativo e divergindo de Hilali et al. (2006) onde não houve aumento nos valores de GGT em búfalos.

Na literatura consultada, não foi reportado a causa do aumento da GGT na espécie bovina, porém, em trabalho realizado em camelídeos, observou-se o aumento da atividade sérica da GGT em infecções por *T. evansi* correlacionado provavelmente com a degeneração gordurosa dos hepatócitos e posteriormente necrose, já que esta enzima está presente nos canalículos hepáticos (AHMADI-HAMEDANI et al., 2014).

Neste trabalho, houve diminuição na albumina sérica nos animais positivos para o hemoparasito através da RIFI em comparação aos negativos, porém, ambos permaneceram abaixo

dos valores de referência para a espécie bovina, corroborando com o descrito por Teixeira (2010), e Passos (2004), em bovinos e ovinos respectivamente, infectados experimentalmente, o qual evidenciaram decréscimo da albumina sérica em animais positivos para o agente. A albumina é considerada uma proteína de fase aguda negativa, onde seus valores tendem a decrescer em condições inflamatórias (KANEKO, 1997).

Em bovinos da raça Crioula Lageana infectados naturalmente por *T. evansi*, houve diminuição na concentração de triglicerídeos em animais positivos, porém, ambos os grupos positivos e negativos permaneceram com valores acima dos valores de referência para a espécie (KANEKO, 1997).

Em humanos, descreve-se que a hipertrigliceridemia está associado aos distúrbios hepáticos, ocorrendo alterações tanto nas lipoproteínas plasmáticas, que transportam todo colesterol e lipídeos esterificados, quanto nas hidrólises de triglicerídeos e a lecitina colesterol acetiltransferase, acarretando alterações no metabolismo de lipoproteínas (BACHORIK et al., 1991).

Essas diferenças encontradas são inespecíficas e nenhuma explicação concreta para tais características foi encontrada na literatura, logo, não podendo ser associado exclusivamente com a infecção por *T. evansi*.

Pode haver um fator denominado como tripanotolerância, em que o animal se mantém clinicamente sadio, mesmo na presença do parasito. A raça está diretamente relacionada a esta condição, sendo que na África a Sheko, de origem taurina, é considerada tripanotolerante (SCHENK et al., 2001; DESTA, AYALEW, HEDGE, 2012).

A raça Crioula Lageana é oriunda de animais ibéricos que foram trazidos ao Brasil e aqui sofreu seleção natural, o que tornou esta raça muito adaptada (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000). Os resultados obtidos na avaliação clínica, hematológica e bioquímica dos animais infectados por *T. evansi* podem sugerir que a infecção não desencadeia a doença clínica, levantando-se assim a hipótese de que a resistência ou tolerância observada nos animais africanos também pode se aplicar a raça Crioula Lageana, sendo oriunda também de animais *Bos taurus*.

Novos estudos poderiam ainda determinar que a resistência ou tolerância à tripanossomíase pode estar mais associada à raça do que simplesmente às linhagens bovinas. A presença de genes que possam conferir esta característica às hemoparasitoses, é uma ferramenta que pode auxiliar na determinação de raças resistentes (DUANGJINDA et al., 2013).

As variações antigênicas do hemoparasito também são um fator capaz de interferir na resposta dos bovinos perante a infecção (FRANGE, 2013) de forma que a possível detecção destas variações poderia auxiliar na avaliação da resistência ou tolerância de animais a enfermidades (CASA, 2019).

5.5 CONCLUSÃO

A prevalência de *T. evansi* foi baixa pelas técnicas de PCR e RIFI caracterizando instabilidade enzoótica em bovinos da raça Crioula Lageana no estado de Santa Catarina. Os bovinos não apresentaram alterações clínicas, hematológicas ou bioquímicas que possam ser justificadas pela presença do hemoparasito, sendo considerados portadores assintomáticos, não ocorrendo manifestação clínica da doença em animais parasitados.

5.6 REFERÊNCIAS

- AHMADI-HAMEDANI, M. et al. Hematological and serum biochemical aspects associated with a camel (*Camelus dromedarius*) naturally infected by *Trypanosoma evansi* with severe parasitemia in Semnan. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v.4, n.9, p.743-745, 2014.
- BACHORIK, P. S. et al. Lipoprotein-cholesterol analysis during screening: accuracy and reliability. **Annals of Internal Medicine**, v.114, n.9, p.741-747,1991.
- BATISTA, J. S. et al. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, v.110, p.73–80. 2012.
- CASA, M. S. **Prevalência e fatores associados à infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Crioula Lageana**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2019.
- DA SILVA, A.S. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira SC. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.3, p.373-376, 2007.
- DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: A review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-22, 2013a.

- DESQUESNES, M. et al. Trypanosoma evansi and surra: A review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-20, 2013b.
- DESTA, T.T.; AYALEW W.; HEGDE, P.B. Farmers' perceptions on trypanosomosis and trypanotolerance character of the taurine Sheko. **Tropical Animal Health Production**, v.44, n.1, p.609-616, 2012.
- DOKO, A. et al. Trypanosomiasis in diferente breeds of cattle from Benin. **Veterinary Parasitology**, v.40, n.1-2, p.1-7, 1991.
- DUANGJINDA, M. et al. Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. **Veterinary Parasitology**, v.196, n.3, p.314-320, 2013.
- FEITOSA, F.L. **Semiologia Veterinária – A Arte do Diagnóstico**. 3th ed. Roca Didático, 2014, 644p.
- FIDELIS JUNIOR, O.L. et al. Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. **Brazilian Journal Veterinary Parasitol**, v.28, n.2, p.203-209, 2019.
- JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- JOSHI, P.P. et al. Treatment and follow-up of the first case of human tripanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.100, n.10, p.989-991, 2006.
- KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th ed. Academic Press, 1997, 932 p.
- MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2000. 232 p.
- MARTINS, V.M.V., VEIGA, T.F., MARTINS, E., QUADROS, S.A.F., CARDOSO, C.P., RIBEIRO, J.A.R. **Raça Crioula Lageana: O esteio de ontem, o labor de hoje e a oportunidade do amanhã**. Ed: ABCCL, Lages. 2009. 80 p.
- MCHUGH, M. L. Interrater reliability: the kappa statistic. **Biochemia Medica (Zagreb)**, v.22, n.3, p.276-282, 2012.
- NAAS, I.A.; ARCARO JÚNIOR, I. Influência de ventilação e aspersão em sistemas de sombreamento artificial para vacas em lactação em condições de calor. **Revista Brasileira de Engenharias Agrárias e Ambientais**. v.5, n.1, p.139-42. 2001.
- HILALI, M.; ABDEL-GAWAD, A.; NASSAR, A., ABDEL-WAHAB, A. Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with Trypanosoma evansi. **Veterinary Parasitology**, v.139, n.1-3, p.237-243, 2006.

OPAS (Organización Panamericana de la Salud). Bioestadística: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, n.18, 1979.

PASSOS, P.B. **Infecção experimental em ovinos com *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) (Sarcocystis: Trypanosomatidae)**. 2004. 236p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

RIBEIRO, C. **Amplificação, clonagem, expressão e purificação da enzima adenosina deaminase (ADA) de *Trypanosoma evansi***. Dissertação. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. Lages, 2016. 96f.

SANTOS, C.E.P.; MARQUES, L.C.; MACHADO, R.Z.; TEIXEIRA, M.C.A. Isolamento de *Trypanosoma evansi* em *bos taurus indicus* no pantanal norte, Brasil. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 1., 2009, **Anais...** Ciência Animal Brasileira. p.625-630, 2009.

SCHENK, M. A. M. et al. Avaliação clínico laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.4, p.157-161, 2001.

SHARMA, A. et al. Molecular prevalence of *Babesia bigemina* and *Trypanosoma evansi* in dairy animals from Punjab, India, by duplex PCR: a step forward to the detection and management of concurrent latent infections. **BioMed research international**, v.2013, p.1-8, 2013.

SMITH, R.D.; EVANS D.E.; MARTINS, J.R.; CERESÉR, V.H.; CORREA, B.L.; PETRACCIA, C.; CARDOZO, H.; SOLARI, M.A., NARI, A. Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. **Annals of the New York Academy Sciences**, v.916, n.1, p.510-520, 2000.

SILVA, A.S.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**, v.35, n.3, p.373-376, 2007.

SILVA, A.S. et al. Tripanossomose em equinos na região sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.38, n.2, p.113-120, 2010.

SIVAJOTHI, S. Haematological changes in *Trypanosoma evansi* infected cattle. **International Journal of Scientific World**. v.2, n.1, p.27-30, 2014.

TEIXEIRA, M.C.A. **Estudo clínico, hematológico, bioquímico sérico, parasitológico, imunológico e patológico de bovinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi* steel, 1885 (sarcocystis: trypanosomatidae)**. 2010. 131p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2010.

VENTURA, R.M.; PAIVA, F.; SILVA, R.A.M.; TAKEDA, G.F.; BUCK, G.A.; TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and

species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. **Experimental Parasitology**, v.99, n.1, p.37-48, 2001.

ZANETTE, R.A. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em eqüinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. **Ciência Rural**. v.38, n.5, p.1468-1471, 2008.

6 PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO NATURAL POR *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA

RESUMO

A tripanossomíase bovina causada pelo protozoário *Trypanosoma vivax*, é uma enfermidade mundialmente distribuída e causadora de grandes prejuízos para a pecuária. Nas raças nativas, como a raça Crioula Lageana, não existem estudos sobre a epidemiologia desta enfermidade. Algumas raças bovinas possuem a particularidade de ser tripanotolerantes, tornando-se importante identificar a prevalência do agente nesta população, para posteriormente verificar características referentes a susceptibilidade, tolerância ou resistência, utilizando esta característica em programas de controle e prevenção em locais onde a doença é endêmica. O objetivo é determinar a prevalência de *Trypanosoma vivax* em bovinos da raça Crioula Lageana, e relacionar as variáveis clínicas, hematológicas e bioquímicas, visando novos estudos acerca da sanidade e tolerância a doenças nesta população. Foram utilizados 310 bovinos da raça Crioula Lageana, e realizado a PCR e RIFI. Obteve-se prevalência de infecção de 0% (0/310) por *T. vivax* na PCR, e de 8% (24/310) na RIFI. Houve aumento de plaquetas e diminuição do colesterol em animais positivos quando comparado aos negativos, porém dentro dos valores de referência para a espécie. Conclui-se que os bovinos da raça Crioula Lageana encontram-se em situação de instabilidade enzoótica, com baixa prevalência para a infecção por *T. vivax* pelas técnicas de PCR e RIFI e que a infecção natural não causou alterações no exame físico, hemograma e bioquímica sérica entre animais positivos e negativos, sendo, portanto, assintomáticos.

Palavras-chave: Raça nativa. Sanidade. Tripanossomose. Hematologia.

6.1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase causada por *T. vivax* é mundialmente distribuída, transmitida por moscas dípteras hematófagas, sendo as regiões de clima tropical e subtropical as mais afetadas (BATISTA et al., 2012). Causa relevantes impactos econômicos pela queda de produtividade, custos com tratamentos e mortalidade dos animais (BASTOS et al., 2015).

Bovinos comumente apresentam-se subclínicos, sendo considerados reservatórios (SHARMA et al., 2013) ou manifestam alterações hematológicas graves (BATISTA et al., 2007).

Com relação ao hospedeiro, sabe-se que alguns grupos genéticos possuem resistência a tripanossomíase. A utilização de raças tripanotolerantes é uma potente ferramenta de controle e prevenção, mantendo a capacidade produtiva, mesmo infectados (DOKO et al., 1991).

A raça Crioula Lageana possui excelentes características produtivas, tendo aptidão para carne, portanto, levantamentos epidemiológicos ancorados a técnicas moleculares associadas a sorológicas fornecem dados mais precisos e confiáveis perante ao real status sanitário destes rebanhos (FIDELIS JUNIOR et al., 2019).

Surtos de doença clínica são reportadas em populações que possuem status de instabilidade enzoótica para o agente, sendo mais propensos devido a baixa imunidade adquirida, sendo importante ponto a ser questionado quando reportamos à raças naturalizadas e com baixo efetivo em número de animais, como a Crioula Lageana (SMITH, 2000).

Estudos prévios sugerem maior resistência inata das linhagens *Bos indicus*, em relação às *Bos taurus*, em se tratando da infecção por hemoparasitos (JONSSON, 2006), porém, tem-se observado, que a raça Crioula Lageana, de aptidão para corte, oriunda de linhagens *Bos taurus*, possuem extrema rusticidade, adaptabilidade e tolerância frente a condições precárias e a enfermidades, existindo núcleos de conservação *in situ* para manutenção desta população, sendo uma importante fonte de recursos genéticos (MARTINS et al., 2009).

O conhecimento de dados epidemiológicos desta raça frente à infecção é crucial para o estabelecimento do real status sanitário desses rebanhos, sendo fundamentais para atender exigências de comercialização de produtos de origem animal (JULIANO et al., 2014), uma vez que portadores subclínicos são fonte de infecção para outros animais (VENTURA et al., 2001).

Este estudo objetiva apresentar o primeiro levantamento de dados epidemiológicos da infecção natural por *T. vivax* em bovinos da raça Crioula Lageana por meio de PCR e RIFI e

comparar variáveis do exame clínico, hemograma e bioquímica sérica entre animais infectados ou não.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Determinação do Tamanho Amostral

Para a avaliação da prevalência de *T. vivax* na população de bovinos da raça Crioula Lageana, foram utilizadas as seguintes fórmulas de acordo com a OPAS (1979):

$$n_o = \frac{1,96^2 [p(1-p)]}{(d)^2}$$

Onde n_o é o número de amostras; p a prevalência esperada e d a margem de erro. Admitindo-se prevalência estimada de 50% de amostras positivas, um intervalo de confiança de 95% e uma margem de erro de 5%, o resultado obtido foi de 384 animais. No entanto, como trata-se de uma população finita, procedeu-se o seguinte cálculo:

$$n = \frac{N \times n_o}{N + n_o}$$

Onde N é o número total de animais na população, sendo que para a raça Crioula Lageana esse número é de 1.500 animais. A partir destes cálculos, chegou-se ao número final de 306 animais a serem amostrados.

6.2.2 Animais e Obtenção das Amostras

Foram colhidas amostras de sangue de 310 bovinos da raça Crioula Lageana, machos adultos ($n=32$) e fêmeas adultas ($n=207$), jovens ($n=71$; machos e fêmeas), todos registrados na Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL), oriundos de 6 propriedades núcleos de conservação *in situ*, localizadas na região do Planalto Catarinense, nos municípios de Lages (Latitude: -27.8167, Longitude: -50.3264 27° 49' 0" Sul, 50° 19' 35" Oeste, Altitude 930 metros), Paineel (Latitude: 27° 55' 30" Sul, Longitude: 50° 6' 12" Oeste, Altitude 1.101 metros), Curitibanos (Latitude: 27° 16' 58" Sul, Longitude: 50° 35' 04" Oeste, Altitude 987 metros) e Ponte Alta (Latitude: 27° 29' 03" Sul, Longitude: 50° 22' 49" Oeste, Altitude: 856 metros). A coleta foi realizada por venopunção da veia jugular externa, sendo utilizados tubos de coleta à vácuo com e sem anticoagulante EDTA a 10% para realização do hemograma e bioquímica sérica. As amostras foram congeladas a -20°C até a extração do DNA e realização da PCR.

6.2.3 Exame Físico

O exame físico foi empregado para a verificação de sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, onde se aferiu a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), movimentos ruminais (MR), temperatura retal e coloração das mucosas.

6.2.4 Extração de DNA

As amostras de sangue, após seu descongelamento foram imediatamente submetidas à extração de DNA por meio de kit comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (PROMEGA®), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, a concentração de cada amostra de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific®).

6.2.5 Análise Molecular

6.2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação do DNA genômico extraído das amostras de sangue e controles positivos, foram realizadas as PCRs amplificando um fragmento da sequência intergênica do gene SL, em micro tubos de 0,2mL, ao qual foi adicionado um volume final de 25 µL de solução, contendo 1U de enzima Taq Polimerase GoTaq® Hot Start Polymerase, (Promega); 8,5 pmoles de cada par de primers (5'GCTCTCCAATCTTAACCCTA3'/5'GTTCCAGGCGTGCAAACGTC3' e 5'TATTATTAGAACAGTTTCTGTAC3'/5'GCTATCCGACCCACCT3'), 0,2mM de nucleotídeos (dNTPs); 3,25mM de cloreto de magnésio; 5µL de tampão 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 3µL de DNA (concentração entre 20 e 100ng/µL) e água ultra pura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Um controle negativo foi utilizado para garantir a qualidade e especificidade da técnica, abordando os mesmos parâmetros citados anteriormente, substituindo apenas o uso de DNA genômico por água ultrapura, livre de DNase. As condições de temperatura aplicadas no termociclador (Biocycler) envolver a desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto e

73°C por 1 minuto, e ainda uma extensão final a 73°C por 7 minutos. A eletroforese dos produtos de amplificação (fragmento de 210 pb) foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 2% com 1µL de corante Unisafe Dye adicionado diretamente no gel e 1µL de tampão de amostra (azul de bromofenol e glicerol) para cada produto. Na primeira lacuna do gel utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb (Ludwig) como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 100 Volts por 40min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta.

6.2.5.2 Imunofluorescência indireta (RIFI)

Para obtenção de tripomastigotas utilizadas na confecção dos antígenos de RIFI, foram usadas duas amostras de *T. vivax* armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C, cedida pela professora Doutora Joely Ferreira Figueiredo Bittar da Universidade de Uberaba – Minas Gerais. Essas amostras foram descongeladas em banho Maria a temperatura de 37 °C, e retirada uma alíquota (quatro mL), as quais foram inoculadas via subcutânea em um ovino esplenectomizado hígido, com idade de oito meses, raça crioula, isolado em baia com tela antimosquito. Foram coletados seis tubos de sangue com EDTA do ovino no seu pico de parasitemia de 63 parasitos por campo (objetiva 40x) após 12 dias de inoculação do antígeno. As amostras de sangue foram centrifugadas, durante cinco minutos em centrífuga Celm[®]. Após a centrifugação retirou-se toda a papa leucocitária das amostras de todos os tubos e transferidos para um tubo falcon de 50 ml e acrescentado solução fisiológica para lavagem da amostra por duas vezes consecutivas. Foram preparadas 100 lâminas de esfregaço sanguíneo grosso com 30µl de sangue e fixados com acetona por 15 minutos. Os esfregaços foram embalados com papel toalha e envolvidos em papel alumínio e congelados a -20°C para realização de lâminas de imunofluorescência indireta posteriormente. O teste de fluorescência para detectar anticorpos anti-*T. vivax* foi realizado conforme Camargo (1966) com modificações. Inicialmente as lâminas com antígeno fixado foram retiradas do freezer, secas a temperatura ambiente e as delimitações foram feitas com esmalte. Os soros controles positivos e negativos foram diluídos em PBS nas diluições de 1:40, e para as amostras de soro bovino, da raça Crioula Lageana, colhidas na região do Planalto Catarinense, foram diluídos em PBS nas diluições de 1:40, 1:80, 1:160 e distribuídos 20 µl nas lâminas contendo o antígeno de *T. vivax*. A lâmina foi incubada por 50 minutos em câmara úmida a 37° C e posteriormente lavada com PBS por três

vezes. Em seguida acrescentou-se o conjugado anti bovino marcado com FITC na diluição 1:300. A lâmina foi novamente incubada por 40 minutos e lavada com PBS como descrito previamente. Após a secagem da lâmina a leitura foi realizada em microscópio epifluorescente Nikon®. Amostras foram considerados reagentes (positivos) na titulação de 1:80.

6.2.6 Hematologia

Para as contagens de eritrócitos e leucócitos totais, volume globular, concentração de hemoglobina, índices hematimétricos absolutos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) utilizou-se contador automático de células (SDH3 Labtest). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio da análise microscópica de esfregaços sanguíneos corados com corantes do tipo Romanowsky (Panótico Rápido) (JAIN, 1993). A concentração da proteína total plasmática (PTP) foi determinada por refratometria (ATAGO) e a concentração do fibrinogênio plasmático pelo método de precipitação pelo calor seguida por leitura em refratômetro (JAIN, 1993).

6.2.7 Bioquímica sérica

A análise do perfil bioquímico sérico foi realizado por meio da atividade enzimática da gamaglutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), creatina fosfoquinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e concentrações séricas de ureia, creatinina, proteína total sérica, albumina, globulina, colesterol, triglicerídeos e glicose. As provas bioquímicas foram realizadas por meio de métodos cinético e colorimétrico em analisador bioquímico automático Labmax Plenno® (v2.09.05).

6.2.8 Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Para a comparação das médias das variáveis, tanto clínicas, hematológicas e bioquímicas entre animais positivos e negativos utilizou-se o teste t para dados considerados

paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os não-paramétricos. Para avaliação da concordância entre os dois métodos diagnósticos, realizou-se o teste Cohen's Kappa. Para todos os testes admitiu-se probabilidade de erro de 5%.

6.2.9 Comitê de Ética

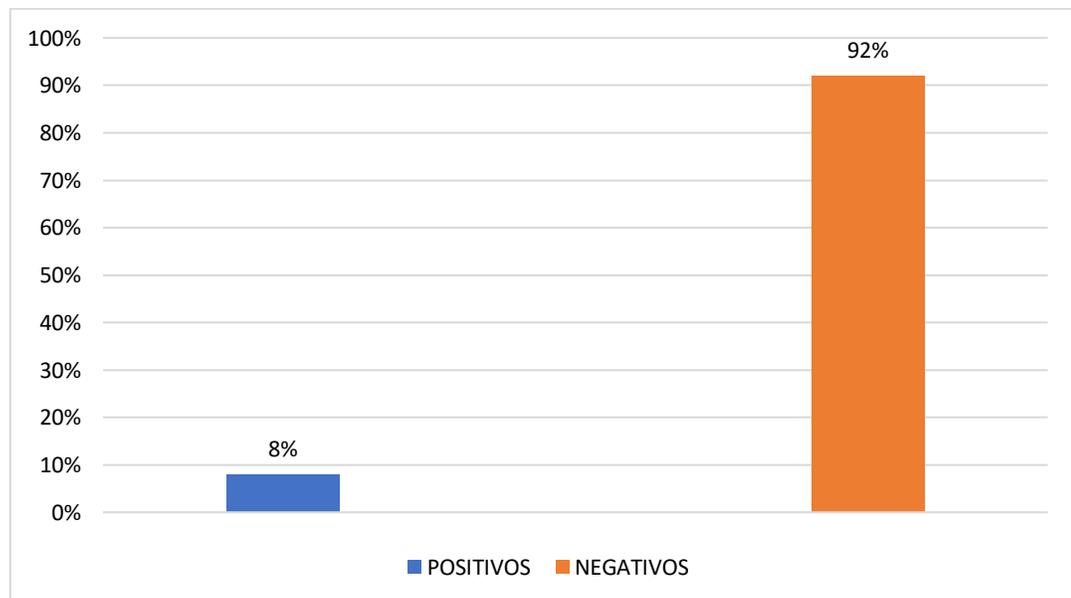
Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob número de protocolo 4107030419.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Prevalência

A prevalência para *T. vivax* pela reação em cadeia de polimerase (PCR) foi de 0% (0/310) (dados não apresentados) e de 8% (24/310) pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Prevalência de *T. vivax* em bovinos da raça Crioula Lageana, determinada pela técnica reação de imunofluorescência indireta (RIFI), no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

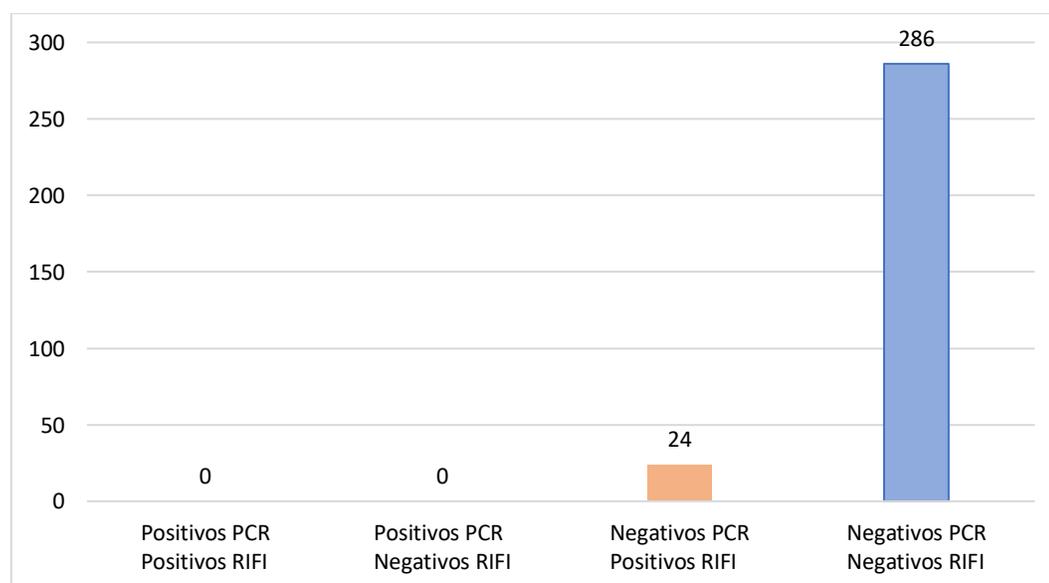
Os métodos de análise PCR e RIFI apresentaram concordância de avaliação de 92% para *T. vivax* (Tabela 8). Entretanto, a confiabilidade entre os métodos acessada pelo teste de Cohen's Kappa foi de $0,071 \pm 0,02$ para o vetor. Em nenhum caso ambos os métodos foram positivos para *T. vivax* (Gráfico 4).

Tabela 8. Avaliação de concordância e teste de Cohen's Kappa para confiabilidade entre as avaliações pelos métodos PCR e RIFI para o agente *T. vivax*, em bovinos da raça Crioula Lageana no estado de Santa Catarina, Brasil.

Avaliação de concordância					
Agente	Tamanho da amostra (n)	Coincidentes	Percentual	95% intervalo de confiança	
<i>T. vivax</i>	310	287	92.28	88.74	94.99
Teste de Cohen's Kappa					
Agente	Kappa	Erro padrão		Z	P value
<i>T. vivax</i>	0.071	0.021		3.388	0.0004

Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Gráfico 4. Número de casos positivos e negativos obtidos pelos métodos PCR e RIFI para o agente *T. vivax*, em bovinos da raça Crioula Lageana, no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

6.3.2 Exame Físico

Nenhuma das variáveis avaliadas no exame clínico apresentou diferenças entre animais positivos e negativos pelo teste da RIFI, sendo que os animais positivos foram considerados subclínicos, mesmo os movimentos ruminais permanecendo abaixo dos valores de referência para a espécie bovina em ambos os grupos. A média das frequências cardíacas dos dois grupos ultrapassou o limite máximo do valor de referência para a espécie bovina (FEITOSA, 2014), porém não diferiu significativamente (Tabela 9).

Tabela 9. Médias e desvios-padrão dos valores do exame físico de da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. vivax*, avaliados pela técnica da RIFI.

Variáveis	Positivos	Negativos	P
Temperatura (°C)	39,1±0,43	38,88±0,58	0,054
MR (mov/5min)	2,82±1,80	3,55±2,23	0,171
FR (mov/min)	31,54±9,15	29,05±8,63	0,490
FC (bat/min)	89,95±22,89	86,50±24,04	0,444

* Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

6.3.3 Hematologia

As plaquetas apresentaram diferenças entre os grupos positivo e negativo, sendo maiores nos animais positivos para *T. vivax* pela técnica da RIFI, permanecendo dentro dos valores de referência para a espécie bovina (JAIN, 1993) (Tabela 10).

Tabela 10. Médias e desvios-padrão dos valores do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de bovinos da raça Crioula Lageana no estado de Santa Catarina, Brasil negativos e positivos para a infecção natural por *T. vivax* pela técnica da RIFI.

Variáveis	Positivos	Negativos	P
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,92±1,21	7,99±1,50	0,711
Hemoglobina (g/dL)	12,43±1,86	12,81±1,78	0,322
VG (%)	36±5,00	37,51±5,25	0,141

VGM (fL)	46,04±5,17	47,87±7,37	0,179
CHGM (%)	34,30±1,10	34,27±3,30	0,353
Plaquetas (x10 ³ /μL)	463±236	369,70±179,75	0,049*
PPT	7,39±0,72	7,42±0,73	0,842
Fibrinogênio	422±207	383±215,22	0,312
Leucócitos totais /μL)	13.443±5297	12.690,61±5097,09	0,718
Bastonetes (/μL)	6±28	29,76±86	0,150
Segmentados (/μL)	3080±1953	3467,56±2684	0,728
Linfócitos (/μL)	9150±5021	8.047,91±3411	0,512
Eosinófilos (/μL)	585±559	722±711	0,483
Basófilos (/μL)	4±17	10,50±42	0,517
Monócitos (/μL)	613±826	412,97±353	0,827

* Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

6.3.4 Bioquímica sérica

O colesterol apresentou diferença estatística sendo menor nos animais positivos para a infecção por *T. vivax* pela técnica da RIFI, estando a média de ambos os grupos dentro dos valores de referência para a espécie bovina (POGLIANI et al., 2007) (Tabela 11).

Tabela 11. Médias e desvios-padrão dos valores da bioquímica sérica de bovinos da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *T. vivax* através da técnica da RIFI.

Variáveis	Positivos	Negativos	P
PTS (g/dL)	5,41±1,00	5,17±1,00	0,317
Globulinas (g/dL)	3,09±0,86	2,86±0,88	0,242
Albumina (g/dL)	2,31±0,44	2,31±0,41	0,984
CK (U/L)	207,40±313,97	203,26±319,90	0,435
LDH (U/L)	1464,45±119,81	1440,42±178,75	0,605
Ureia (mg/dL)	31,35±8,69	31,36±10,75	0,901
Creatinina (mg/dL)	1,49±0,31	1,45±0,37	0,627

AST (U/L)	58,95±12,21	60,25±21,40	0,853
FA (UI/L)	133,45±198,85	108,85±89,21	0,489
GGT (U/L)	14,05±5,83	15,97±6,97	0,235
ALT (U/L)	27,85±14,76	30,03±14,59	0,563
Colesterol (mg/dL)	102,25±39,53	125,13±38,32	0,010*
Triglicerídeos g/dL)	23,70±8,77	23,25±7,37	0,959
Glicose (mg/dL)	65,30±13,66	68,11±21,92	0,863

* Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

6.4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo de prevalência para *T. vivax* em bovinos da raça Crioula Lageana. Os dados epidemiológicos encontrados caracterizam a população avaliada sob a situação de instabilidade enzoótica para a infecção (SMITH, 2000).

Essa característica pode tornar os animais mais propensos à doença clínica e ao aparecimento de surtos, não sendo verificado em animais deste grupo racial, uma vez que todos os animais mostraram-se sem a presença de sinais clínicos compatíveis no momento da coleta das amostras.

Segundo Desta, Ayalew, Hegde (2012), a doença clínica surge normalmente em períodos chuvosos e quentes, propiciando o crescimento e reprodução de vetores. A baixa manifestação da infecção na população de animais da raça Crioula Lageana, provavelmente esteja atrelada a esta característica, pois em grande parte do ano, o clima frio da região do Planalto Catarinense, dificulta a proliferação e reprodução dos vetores (SILVA et al., 2010).

Os resultados foram inferiores a prevalência encontradas em Pernambuco (14%) (GUERRA et al., 2013) e Minas Gerais (50%) (BARBIERI et al., 2016), e superiores aos da Paraíba (0%) (COSTA et al., 2013), todos realizados pela técnica da RIFI.

A variação nas prevalências entre os estudos mencionados pode estar atrelada a diferentes formas de manejo, incluindo uso de anti-parasitários, além de fatores ligados aos vetores, como sua distribuição e competência vetorial (SWAY; KAAYA, 2012). Ainda, vale ressaltar que esses estudos foram realizados em diferentes estações do ano, implicando em taxas de infecção variadas, visto que a população de vetores aumenta conforme a estação climática (ONDITI et al., 2007).

Outro fator importante a ser considerado é a grande variação nas raças utilizadas nos estudos devido ao fenômeno chamado tripanotolerância, o que pode estar presente em animais da raça Crioula Lageana.

Contradizendo os resultados observados neste trabalho, há que se verificar as diferenças entre as metodologias utilizadas, visto que o teste da RIFI, único teste empregado nos trabalhos mencionados, avalia a presença de anticorpos contra o agente, ao passo que a PCR possibilita detectar a presença do próprio agente parasitando os animais no momento das análises, indicando infecção ativa (FIDELIS JUNIOR et al., 2019).

Os métodos de análise RIFI e PCR apresentaram concordância de avaliação de 92% para o vetor *T. vivax*. Essa alta concordância entre os testes deve-se ao elevado número de negativos observados para ambos (MC HUGH, 2012). O ideal, para esta avaliação, e para poder elucidar a concordância entre os testes RIFI e PCR, seria utilizar apenas animais positivos para o agente, podendo assim comparar os testes, situação esta, que seria possível através de infecção experimental em um grupo de animais.

A confiabilidade acessada pelo teste de Cohen's Kappa foi de $0,071 \pm 0,02$ para o vetor *T. vivax*, valor considerado nulo, com menos de 4% de dados confiáveis (MC HUGH, 2012). A baixa confiabilidade está associada a baixa consistência entre os métodos. Em nenhum caso ambos métodos diagnósticos foram positivos para *T. vivax*. Testes sorológicos devem ser associados a moleculares, podendo ser evidenciado infecções ativas através da detecção do DNA do agente (PCR), e anticorpos oriundos de infecções ocorridas em algum momento na vida do hospedeiro, não havendo infecção ativa, ou ainda, infecções crônicas, apresentando baixa parasitemia (RIFI) (FIDELIS JUNIOR et al., 2019).

Ainda assim, todos os animais encontravam-se clinicamente hígidos, sem sinais clínicos compatíveis com a tripanossomíase.

Animais clinicamente positivos para a tripanossomíase causada pelo *T. vivax* apresentam sinais clínicos como febre, anemia, inapetência, perda de peso e fraqueza progressiva, apatia, abortamento, síndromes hemorrágicas e alterações neurológicas como incoordenação motora, tremores musculares e cegueira (BATISTA et al., 2007).

A ausência de animais apresentando a doença clínica nos rebanhos da raça Crioula Lageana não permitiu comparar as variáveis clínicas entre animais positivos e negativos para

T. vivax, doentes ou não. Todos os animais infectados por essa hemoparasitose foram considerados subclínicos, visto que os parâmetros aferidos confirmaram esta condição.

Bovinos apresentando tripanossomíase, porém mantendo-se na condição de portadores subclínicos, são potentes contaminantes para outros animais, sendo considerados reservatórios do agente (SHARMA et al., 2013).

A ocorrência de surtos da doença em infecções naturais ou experimentais permitiria uma comparação mais precisa das variáveis clínicas, hematológicas e bioquímicas entre animais saudáveis ou doentes, podendo ser observado as diferentes manifestações entre os animais que desenvolvem a forma clínica da doença com aqueles que se tornam subclínicos.

Concordando com Moura et al. (2009a), a infecção por *T. evansi* não desencadeou anemia nos animais não havendo diferença entre positivos e negativos, demonstrando que a infecção subclínica pelo agente não causa alterações como esperadas quando manifestando a doença clínica. Animais infectados por *T. vivax* apresentaram anemia em decorrência de hemólise intra e extravascular, diminuição ou inibição da eritropoiese, e hemorragias. (FRANGE, 2013).

A anemia é o parâmetro hematológico mais comumente associado à tripanossomíase por *T. vivax* (BATISTA et al., 2008). Este estudo contraria o resultado da infecção experimental relatada por Maxie, Losos e Tabel (1979), que evidenciaram o desenvolvimento de anemia macrocítica hipocrômica, associado também à trombocitopenia.

Isto levanta a possibilidade e a importância de novos estudos, no que diz respeito a investigar uma possível tolerância ou resistência desses animais perante à infecção, visto que nenhuma alteração significativa foi reportada neste estudo, em animais acometidos pelo agente.

O número de plaquetas foi maior no grupo positivo, porém, os valores dos dois grupos apresentaram-se dentro dos valores de referência para a espécie, não sendo possível encontrar na literatura consultada essa variação, não sendo correlacionado estes valores com à infecção (JAIN, 1993).

Bovinos com tripanossomíase causada pelo *T. vivax*, comumente apresentam trombocitopenia devido ao consumo de plaquetas para a formação de microtrombos induzidos pelo parasita (FRANGE, 2013), não havendo este comportamento em animais considerados subclínicos neste estudo.

Em relação as variáveis bioquímicas, e concordando com Do Nascimento (2015), o colesterol foi menor nos animais positivos para a infecção. Apesar de haver diferença entre os

grupos, a média dos valores de colesterol dos animais positivos e negativos permaneceu dentro dos valores de referência para a espécie segundo Pogliani et al. (2007). Já em relação a descrito por Kaneko (1997), o valor de colesterol do grupo negativo, permaneceu levemente acima dos valores de referência.

Valores menores de colesterol em animais positivos, demonstram que o metabolismo energético dos animais deste grupo estava direcionado nos processos oxidativos de lipídeos, podendo ocorrer em virtude de inadequado fornecimento energético na dieta ou consumo de reservas energéticas pelo tripanossoma (KADIMA et al., 2000).

As diferenças encontradas são consideradas inespecíficas e nenhuma explicação concreta para tais alterações foi encontrada na literatura, não podendo associar única e exclusivamente com a infecção pelo agente *T. vivax*.

Algumas raças de bovinos são relativamente resistentes à tripanossomíase por apresentar resistência natural à infecção e permanecerem na condição de portadores subclínicos, mantendo-se clinicamente saudáveis, mesmo na presença do agente, fenômeno denominado de tripanotolerância (FRANGE, 2013).

Sabe-se que o efeito raça está intimamente relacionada a esta condição, sendo que na África a raça Sheko, de origem taurina, é considerada tripanotolerante (SCHENK et al., 2001; DESTA, AYALEW, HEDGE, 2012), bem como a N'Dama, que possui a mesma característica.

Resistência ou tolerância frente a doenças estão entre as características mais valiosas das raças nativas, sendo uma potente ferramenta de controle e prevenção, quando utilizadas essas raças em programas de seleção e melhoramento genético, principalmente em regiões onde a doença possui caráter endêmico (FIORAVANTI et al., 2020).

A raça Crioula Lageana, por ter sofrido seleção natural em condições adversas, tornou-se muito produtiva e adaptada (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000). Os resultados encontrados na avaliação clínico, hematologia e bioquímica sérica dos animais infectados naturalmente por *T. vivax* sugerem que a infecção não desencadeia a doença clínica, levantando-se a hipótese de que a raça Crioula Lageana, da mesma forma, possa possuir a resistência observada em raças africanas, oriunda também de animais *Bos taurus*.

As condições ambientais, climáticas e nutricionais inóspitas encaradas por bovinos da raça Crioula Lageana, podem ser um fator determinante na característica de ser um possível

tripanotolerante, visto que esta particularidade possui origem genética e ambiental, podendo variar em relação às condições de estresse e estado nutricional (SCHENK, et al., 2001).

Estudos futuros podem determinar se a possível resistência ou tolerância à *T. vivax* pelos animais da raça Crioula Lageana podem estar mais associadas à raça em particular, ou simplesmente às linhagens bovinas, ou ainda a fatores ambientais, climáticos e nutricionais.

A presença de genes que possam conferir esta característica aos animais é uma ferramenta que pode auxiliar na determinação se há realmente resistência ou não neste grupo racial (DUANGJINDA et al., 2013).

Variações antigênicas do parasita também são um fator possivelmente capaz de interferir nas manifestações dos bovinos perante a infecção (FRANGE, 2013) de forma que a possível detecção destas variações auxiliaria na comprovação da suposta resistência ou tolerância de animais da raça Crioula Lageana à enfermidades (CASA, 2019).

6.5 CONCLUSÃO

A prevalência de *T. vivax* foi nula pela técnica de PCR e baixa pela RIFI caracterizando instabilidade enzoótica em bovinos da raça Crioula Lageana no estado de Santa Catarina. Os bovinos não apresentaram alterações clínicas, hematológicas ou bioquímicas que possam ser justificadas pela presença do agente, sendo considerados portadores assintomáticos, não ocorrendo manifestação clínica da doença em animais parasitados.

6.6 REFERÊNCIAS

BARBIERI, J. M. et al. Soroprevalence of *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, and *Babesia bovis* in dairy cattle. **Ciência Animal Brasileira**, v.17, n.4, p.564-573, 2016.

BASTOS, T. et al. Detecção de *Trypanosoma vivax* por diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico realizadas à campo. **Ars Veterinaria**. v.31, n.2, p.40, 2015.

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

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

BATISTA, J. S. et al. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infectious in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, v. 110, n.1, p.73-80, 2012.

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

CASA, M. S. **Prevalência e fatores associados à infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Crioula Lageana**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2019.

COSTA, V. M. et al. Soroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.2, p.207-213, 2013.

DESTA, T.T.; AYALEW W.; HEGDE, P.B. Farmers' perceptions on trypanosomosis and trypanotolerance character of the taurine Shoko. **Tropical Animal Health Production**, v.44, n.1, p.609-616, 2012.

DOKO, A. et al. Trypanosomiasis in diferente breeds of cattle from Benin. **Veterinary Parasitology**, v.40, n.1-2, p.1-7, 1991.

DUANGJINDA, M. et al. Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. **Veterinary Parasitology**, v.196, n.3, p.314-320, 2013.

FIDELIS JUNIOR, O.L. et al. Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. **Brazilian Journal Veterinary Parasitol**, v.28, n.2, p.203-209, 2019.

FIORAVANTI, M.C.S.; FREITAS, T.M.S.; MOURA, M.I.; COSTA, G.L.; DIAS, J.M.; GUIMARÃES, L.K.P.; GÓMEZ, M.M. Resistance and resilience to diseases in local ruminant breeds: a focus on South America. **Archivos de Zootecnia**. v.69, n.267, p.338-352, 2020.

GARCIA, H. et al. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v.100, n.4, p.297-305, 2006.

GUERRA, N. G. et al. Detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de Imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.12, p.1423-1426, 2013.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.

- JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v.137, n.1, p.1-10, 2006.
- KADIMA, K.B. GYANG, E.O.; SAROR, D.I.; ESIEVO, K.A.N. Serum biochemical values of *Trypanosoma vivax* infected cattle and effects of lactose in saline infusion. **Veterinary Arhiv**, v.70, n.2, p.67-74, 2000.
- KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5th ed. Academic Press, 1997. 932 p.
- MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2000. 232 p.
- MCHUGH, M. L. Interrater reliability: the kappa statistic. **Biochemia Medica (Zagreb)**. v.22, n.3, p.276-282, 2012.
- MARTINS, V.M.V., VEIGA, T.F., MARTINS, E., QUADROS, S.A.F., CARDOSO, C.P., RIBEIRO, J.A.R. **Raça Crioula Lageana: O esteio de ontem, o labor de hoje e a oportunidade do amanhã**. Ed: ABCCL, Lages. 2009. 80 p.
- MAXIE, M.G.; LOSOS, G. J.; TABEL, H. Experimental bovine tripanosomiasis (*Trypanosoma vivax* and *Trypanosma congulense*) I. Symptomatology and clinical pathology. **Tropenmed Parasitol**, v.30, n.3, p.274-282, 1979.
- MENESES, R.M. **Tripanossomose bovina em Minas Gerais: soroprevalência e fatores de risco**. 2011. 62p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG. 2011.
- MOURA, D. M. et al. Perfil bioquímico de bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**, supl.1, p 648-653, 2009b.
- NASCIMENTO, L.F do. **Caracterização das alterações bioquímicas séricas de bovinos experimentalmente infectados por *Trypanosoma vivax***. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Produção Animal) - Universidade de Uberaba, Uberaba, 2015.
- ONDITI, S.J.; SILAYO, R.S.; KIMERA, S.I.; KIMBITA, E.N.; MBILU, T.J.N.K. Preliminary studies on prevalence and importance of goat trypanosomosis in selected farms in Morogoro District, Tanzania. **Livestock Research of Rural Development**, v.19, n.5, p.1-9, 2007.
- OPAS (Organización Panamericana de la Salud). **Bioestadística: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo**. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, n.18, 1979.
- PAIVA, F.; LEMOS, R.A.A.; NAKASATO, L.; MORI, A.E.; BRUM, K.B. & BERNARDO, K.C. *Trypanosoma vivax* em bovinos no pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. I.

Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.9, n.2, p.135-141, 2000.

POGLIANI, F.C.; BIRGEL JUNIOR, E., Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça holandesa, criados no estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v.44, n.5, p.373-383, 2007.

SCHENK, M. A. M. et al. Avaliação clínico laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.4, p.157-161, 2001.

SHARMA, A. et al. Molecular prevalence of *Babesia bigemina* and *Trypanosoma evansi* in dairy animals from Punjab, India, by duplex PCR: a step forward to the detection and management of concurrent latent infections. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-8, 2013.

SMITH, R.D.; EVANS D.E.; MARTINS, J.R.; CERESÉR, V.H.; CORREA, B.L.; PETRACCIA, C.; CARDOZO, H.; SOLARI, M.A.; NARI, A. Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.916, n.1, p.510-520, 2000.

SILVA, A.S. et al. Tripanossomose em equinos na região sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, n.2, p.113-120, 2010.

SWAI, E.S.; KAAYA, J.E. A parasitological survey for bovine trypanosomosis in the livestock/wildlife ecozone of Northern Tanzania. **Veterinary World**, v.5, n.1, p.459-464, 2012.

VENTURA, R.M.; PAIVA, F.; SILVA, R.A.M.; TAKEDA, G.F.; BUCK, G.A.; TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the Spliced-Leader Gene of a Brazilian Stock and Species-Specific Detection by PCR Amplification of an Intergenic Spacer Sequence. **Experimental Parasitology**, v.99, n.1, p.37-48, 2001.

7 CONCLUSÃO

A prevalência de *T. evansi* e *T. vivax* em bovinos da raça Crioula Lageana, obtida pelas técnicas de PCR e RIFI é baixa, de modo a colocar os animais em situação de instabilidade enzoótica para a tripanossomíase

Os bovinos da raça Crioula Lageana infectados naturalmente por *T. evansi* e *T. vivax*, não apresentam alterações nas variáveis clínicas, hematológicas e bioquímicas que possam ser justificadas pela presença dos hemoparasitos nos animais, sendo considerados portadores assintomáticos.