



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

TESE DE DOUTORADO

**PADRONIZAÇÃO DE UM ANTÍGENO  
TAMPONADO PARA PESQUISA DE  
ANTICORPOS ANTI -*Trypanosoma evansi*  
EM EQUINOS**

**CAROLINA RECK**

**LAGES, 2017**

**CAROLINA RECK**

**PADRONIZAÇÃO DE UM ANTÍGENO TAMPONADO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-  
*Trypanosoma evansi* EM EQUINOS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina-UDESC, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Professor Doutor Luiz Claudio Miletto

**LAGES, SC  
2017**

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

Reck, Carolina  
PADRONIZAÇÃO DE UM ANTÍGENO TAMPONADO PARA  
PESQUISA DE ANTICORPOS ANT - Trypanosoma evansi EM  
EQUINOS / Carolina Reck. - Lages , 2017.  
61p.

Orientador: Luiz Claudio Mileti  
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,  
2017.

1. Surra. 2. vigilância epidemiológica. 3.  
sorodiagnóstico. 4. tripanossomose. I. Mileti, Luiz  
Claudio . II. Universidade do Estado de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação. III. Título.

**CAROLINA RECK**

**PADRONIZAÇÃO DE UM ANTÍGENO TAMPONADO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-  
*Trypanosoma evansi* EM EQUINOS**

Tese apresentada no programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

**Banca Examinadora**

Orientador: \_\_\_\_\_  
Professor Doutor Luiz Claudio Miletto  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Membro: \_\_\_\_\_  
Professor Doutor Alexandre de Oliveira Tavela  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Membro: \_\_\_\_\_  
Professor Doutor Gustavo Felipe da Silva  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Membro: \_\_\_\_\_  
Professor Doutor Mário Steindel  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Membro: \_\_\_\_\_  
Professor Doutor Ubirajara Maciel da Costa  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

**LAGES, SC , 24 de novembro de 2017**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família e amigos pelo apoio e incentivo, que souberam compreender a minha ausência em tantos momentos.

Ao meu orientador Luiz Claudio Miletti, pela nova oportunidade, compreensão e auxílio durante essa jornada.

Ao meu marido Álvaro, por sempre estar disposto a me ajudar, pelas discussões construtivas, compartilhamento de conhecimento e principalmente, pelo seu apoio que conforta e me deixa mais forte para superar os desafios impostos pela vida.

A toda equipe do LABHEV que de forma direta e indireta auxiliaram na produção desse trabalho.

Aos mestres do curso de Pós-graduação, pelo ensinamento, pelas dificuldades e oportunidades.

A todos os amigos, colegas e profissionais que de alguma forma contribuíram para o encaminhamento e conclusão desse trabalho.

*“Eu gosto do impossível porque lá a concorrência é menor”.*

Walt Disney

## RESUMO

Surra, também conhecida como “Mal das Cadeiras” na América Latina, é uma doença infecciosa causada pelo *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*). Descrita primariamente nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, América Central, acomete grande número de espécies de animais domésticos e selvagens (equinos, camelídeos bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, suínos, felinos, cães, capivaras e morcegos hematófagos), causando morte de animais, diminuição da produção e elevados e gastos com tratamentos. No Brasil não existem dados oficiais acerca da circulação do agente, apenas estudos regionalizados. Santa Catarina é considerada zona livre da doença. O controle da infecção está baseado no diagnóstico rápido seguido do tratamento dos animais doentes. O exame microscópico direto, é o teste mais utilizado para o diagnóstico da infecção no Brasil, entretanto, apresenta baixa especificidade e sensibilidade, levando possivelmente ao sub - diagnóstico da infecção, principalmente na fase crônica. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar um ensaio de soroaglutinação rápida (SAR/Te) para sorodiagnóstico de triagem da infecção por *T. evansi* em equinos. Além disso, este estudo descreve as características clínicas, parasitológicas e hematobioquímicas no primeiro caso autóctone de surra em equinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. Deste modo, esta proposta visa contribuir com as estratégias de vigilância e controle da surra no país.

**Palavras chave:** Surra, vigilância epidemiológica, sorodiagnóstico, tripanossomose.

## ABSTRACT

*Trypanosoma evansi* is the causative agent of surra or “*Mal das Caderas*” (in Brazil). The disease is present in Africa, Asia and Latin America. It can affect a very large range of domestic and wild hosts ( equines, camelids, cattle, buffaloes, sheep, goats, pigs, dogs, capybaras and vampire bats) causing high mortality, decrease of production and expenses with treatments. In Brazil, there are no epizootiological data on the circulation of the agent, only regionalized studies. Santa Catarina State is considered a free zone of trypanosomiasis. The disease control, is based on rapid diagnosis of infection followed by treatment of animals. Direct microscopic examination is the primary test for the diagnosis of infection in Brazil, however, it presents low specificity and sensitivity, possibly leading to underdiagnosis of infection, mainly in the chronic stage. Thus, the main aim of this study is to evaluate a rapid test of serum agglutination for diagnosis of *T. evansi* infection in horses. In addition, this work describes the clinical, parasitological and haemato biochemical parameters in the first autochthonous outbreak of Surra in horses in the State of Santa Catarina, Brazil.

**Key-words:** Surra, epidemiological surveillance, serodiagnosis, autochthonous outbreak, trypanosomosis



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Morfologia do <i>T. evansi</i> . (A) <i>T. evansi</i> (seta) em esfregaço sanguíneo de camundongo experimentalmente infectado. Coloração de Romanowsky. Aumento de 100x. (B) Desenho esquemático <i>T. evansi</i> encontrado no sangue de equinos, Pantanal, Brasil. Em (A) e (B) não observa-se cinetoplasto. ....	15
Figura 2 - Ciclo de transmissão do <i>T. evansi</i> . Multiplicação na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado. Transmissão mecânica por vetor. ....	16
Figura 3 - Distribuição da infecção por <i>T. evansi</i> no mundo, considerando a presença da infecção com doença clínica (verde escuro), presença da infecção sem dados epidemiológicos (verde claro) e presença de surtos seguido da erradicação (cinza). ....	18
Figura 4 - Clinicamente, os equinos apresentam durante a infecção natural por <i>T. evansi</i> (A) ataxia de membros posteriores e nos casos mais graves (B) emagrecimento e óbito. ....	21

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfatos
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
xg	Força da gravidade
mol	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
OIE	Organização internacional de Epizootias
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pmol	Picomol
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
$\mu\text{m}$	Micras ou micrômetros
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\text{mL}^{-1}$	Quantidade equivalente por mililitro (mL)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1.1. SURRA: A ENFERMIDADE .....	13
2.1.2. O AGENTE: <i>Trypanosoma evansi</i> .....	13
2.1.3. EPIZOOTIOLOGIA .....	17
2.1.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DA SURRA EM EQUINOS .....	20
2.1.5. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>T. evansi</i> .....	23
2.1.6. IMPORTÂNCIA DO <i>T. evansi</i> PARA A SAÚDE PÚBLICA .....	25
2.1.7. TRATAMENTO E CONTROLE DA INFECÇÃO POR <i>T. evansi</i> .....	26
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>4. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>29</b>
<b>5. CAPÍTULO I - MANUSCRITO I .....</b>	<b>35</b>
5.1. INTRODUÇÃO .....	36
5.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
5.2.1. Preparação do antígeno de <i>T. evansi</i> para SAR/Te .....	37
5.2.2. Ensaio de soroprecipitação rápida (SAR/Te) .....	37
5.2.3. Coleta das amostras .....	38
5.2.4. Ensaio baseado na PCR .....	38
5.2.5. Análise estatística .....	38
5.3. RESULTADOS .....	39
5.4. DISCUSSÃO .....	41
5.5. CONCLUSÃO .....	43
5.6. REFERÊNCIAS .....	43
<b>6. CAPÍTULO II - MANUSCRITO II .....</b>	<b>46</b>
6.1. INTRODUÇÃO .....	47
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
6.2.1. Amostras e diagnóstico positivo .....	48
6.2.2. Avaliação hematológica e bioquímica dos animais .....	48
6.2.3. Detecção do <i>T. evansi</i> pela PCR .....	49
6.2.4. Ensaio de soroprecipitação rápida (SAR/Te) .....	50
6.3. RESULTADOS .....	50
6.4. DISCUSSÃO .....	54
6.5. CONCLUSÃO .....	57
6.6. REFERÊNCIAS .....	57

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores e exportadores de leite bovino e carne do mundo (IBGE, 2015), além disso, possui o maior rebanho de equídeos na América Latina e o terceiro do mundo, totalizando oito milhões de cabeças e agregando cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (Machado, 2017). Neste contexto Santa Catarina dedica esforços e investimentos para conquistar status sanitário animal diferenciado junto a OIE (Organização internacional de Epizootias) e reconhecimento no comércio internacional, fundamental para a competitividade do agronegócio. A manutenção do *status* sanitário conquistado, segundo deliberações da OIE, inclui políticas de vigilância e controle de enfermidades negligenciadas e/ou re-emergentes de notificação obrigatória, como é o caso da surra (OIE, 2015).

A Surra, também conhecida como "Mal das cadeiras", é uma doença de importância para múltiplas espécies animais (OIE, 2015), causada pelo protozoário *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), que ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, América Central e América do Sul, ocasionando perdas econômicas pela morte de animais, diminuição da produtividade, perdas reprodutivas e gastos com tratamentos (Silva *et al.*, 1995; OIE, 2015). Apesar de ser considerada uma doença de notificação, no Brasil não existem estratégias de vigilância claras e os dados epizootiológicos são pouco representativos.

A infecção pelo *T. evansi* é considerada enzoótica em equinos do Pantanal mato-grossense (Nunes, 1993; Herrera *et al.*, 2004), sendo descrita também em animais silvestres, búfalos e bovinos (Nunes V.L., 1990; Herrera *et al.*, 2004). Em Santa Catarina a doença já foi relatada em bovinos na região meio oeste (Silva *et al.*, 2007) e no Rio Grande do Sul o agente foi diagnosticado em equinos (Conrado, 2005), caninos e ovinos (Colpo *et al.*, 2005). Mesmo assim, tanto as ações de vigilância passiva, quanto ativa, para a infecção pelo *T. evansi* são limitadas na maioria das regiões do país, uma vez que, a enfermidade não é rotineiramente incluída no diagnóstico diferencial de doenças que cursam com sinais nervosos, anemia ou imunodeficiência (Herrera *et al.*, 2004; Desquesnes *et al.*, 2013a). Diferentes metodologias têm sido empregadas para o diagnóstico da infecção pelo *T. evansi* nos rebanhos de animais de produção, entretanto, o ensaio mais frequentemente utilizado é a microscopia direta, baseada na visualização do parasito, que apresenta grandes limitações de sensibilidade devido a biologia da infecção e as flutuações cíclicas da parasitemia (Hilali *et al.*, 2004). A falta de ensaios rápidos e de baixo custo, que realmente possam ser utilizados na rotina laboratorial diagnóstica para triagem de rebanhos, pode ser considerado um grande limitante para o diagnóstico da infecção e consequentemente para as estratégias de vigilância.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1.1. SURRA: A ENFERMIDADE

A surra ou também chamada “Mal das cadeiras” é uma doença infecciosa de caráter agudo ou crônico, de grande importância para diferentes espécies de mamíferos domésticos e silvestres causada pelo *T. evansi* (Oie, 2015). O termo “surra” deriva de termo *indu* que significa “estragado”, que remete o estado clínico dos animais durante a evolução crônica da doença (Vittoz, 1955). Embora a maioria das espécies de mamíferos domésticos e selvagens sejam susceptíveis, a forma clínica da doença pode ser variável de uma espécie para outra, possivelmente devido à condição da resposta imune do hospedeiro, virulência das cepas do parasito circulantes e área geográfica (Desquesnes *et al.*, 2013b).

O *Trypanosoma evansi* é um importante agente infeccioso para os equídeos (equinos, asininos e muare), camelídeos, caninos, bovinos, ovinos e caprinos, que podem desenvolver uma doença aguda fatal (Desquesnes *et al.*, 2013b), entretanto, a infecção já foi diagnosticada em várias outras espécies de animais silvestres e domésticos, sendo os animais infectados considerados reservatórios do agente, tanto no ciclo silvestre (ambiente silvestre) como doméstico (animais de produção/companhia) (Herrera *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2004; Desquesnes *et al.*, 2013a; Desquesne *et al.*, 2013b). Para a maioria das espécies suscetíveis, a tripanossomíase é associada clinicamente a febre, anemia, fraqueza e sinais nervosos, responsáveis por grandes perdas de produção (carne, leite, rendimento no trabalho, transtornos reprodutivos), levando a caquexia e a morte na ausência de tratamento (Desquesnes *et al.*, 2013b).

### 2.1.2. O AGENTE: *Trypanosoma evansi*

*Trypanosoma evansi*, é um protozoário flagelado membro da família *Trypanosomatidae* pertencente à classe Kinetoplastea, que agrupa a subordem Trypanosomatina (Desquesnes *et al.*, 2013b). Os tripanossomas em geral podem ser distribuídos em duas seções: *Salivaria* - transmitidos através de picadas, por vetores biológicos; e *Stercoraria* – transmitidos através da contaminação da pele ou das mucosas do hospedeiro pelas fezes do vetor (Hoare, 1972). A maioria dos tripanosomatídeos que fazem parte da seção estercorária não são patogênicos, com exceção do *T. cruzi* (De Souza *et al.*, 2010). O tripanosomatídeos da seção salivaria são considerados altamente patogênicos e estão distribuídos em três subgêneros de importância

veterinária: *Nannomonas* (*T. congolense*), *Duttonella* (*T. vivax*) e *Trypanozoon* (*T. brucei* subsp. *brucei*, *T. equiperdum* e *T. evansi*) (Desquesnes *et al.*, 2013b).

Estruturalmente, os tripanossomas são compostos por flagelo; corpo basal ou blefaroplasto, local onde se insere o flagelo; núcleo com cromatina; retículo endoplasmático; complexo de Golgi; cinetoplasto; mitocôndria, representada por um longo tubo que vai desde a porção anterior até a posterior; corda paraxial; microtúbulos; ribossomos; e membrana ondulante, constituída por uma série de pregas que são esticadas pelo movimento do flagelo (Hoare, 1972; Borst *et al.*, 1987). O cinetoplasto é uma malha de DNA localizada em uma dilatação da mitocôndria. Essa estrutura é envolvida por uma cápsula que recobre um grupo de fibrilas eletrodensas que contém DNA (kDNA)(Hoare, 1972).

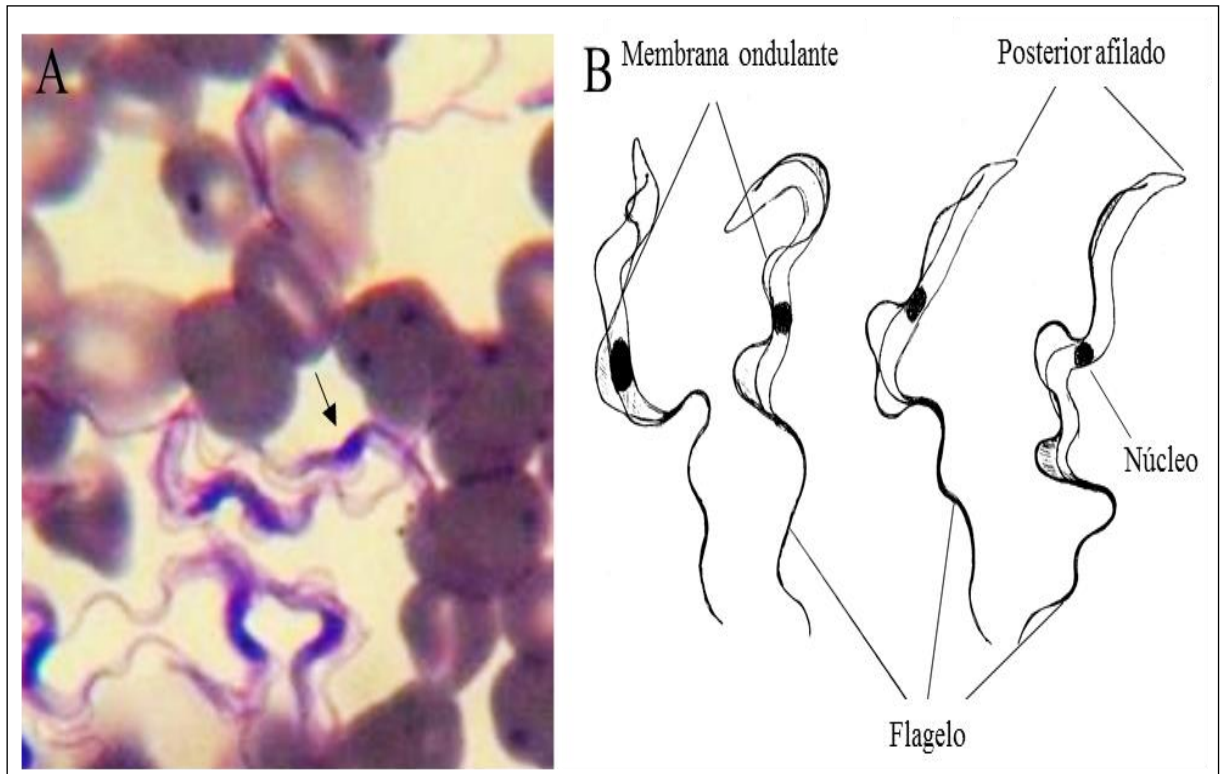
No curso de seu ciclo digenético, conforme (Hoare, 1972), os tripanosomas podem passar por vários estágios de desenvolvimento:

- Amastigota: corpo arredondado, sem flagelo livre;
- Promastigota: corpo alongado, com flagelo na extremidade anterior;
- Epimastigota: cinetossomo é próximo e anterior ao núcleo e o flagelo sai livremente, não havendo membrana ondulante;
- Tripomastigota: o tripanosoma em sua forma clássica, infectiva.

A multiplicação dos tripanossomas do subgênero *Trypanozoon* ocorre por divisão binária, que é iniciada pela bipartição do cinetoplasto, seguido pelo desenvolvimento de um novo flagelo próximo à porção posterior do cinetoplasto. O novo flagelo cresce gradual e paralelamente ao antigo; ao mesmo tempo, o núcleo divide-se em dois, e finalmente quando os dois flagelos tiverem o mesmo tamanho, o citoplasma iniciará a divisão começando pela extremidade anterior do corpo (Hoare, 1972; Misra *et al.*, 2016).

A origem do *T. evansi* possivelmente é africana (Desquesnes *et al.*, 2013b), classificado como monomórfico, uma vez que, é encontrado apenas na forma tripomastigota, com tamanho variando de 15-33µm, com média de 24 µm. O cinetoplasto é pequeno (0,6 µm), tem uma forma de bastonete e geralmente ocupa a porção subterminal ou marginal do corpo. Nas cepas brasileiras de *T. evansi* o cinetoplasto está ausente, tanto nos isolados de animais domésticos quanto nos animais selvagens (VENTURA *et al.*, 2000) (Figura 1).

Figura 1 - Morfologia do *T. evansi*. (A) *T. evansi* (seta) em esfregaço sanguíneo de camundongo experimentalmente infectado. Coloração de Romanowsky. Aumento de 100x. (B) Desenho esquemático *T. evansi* encontrado no sangue de equinos, Pantanal, Brasil. Em (A) e (B) não observa-se cinetoplasto.



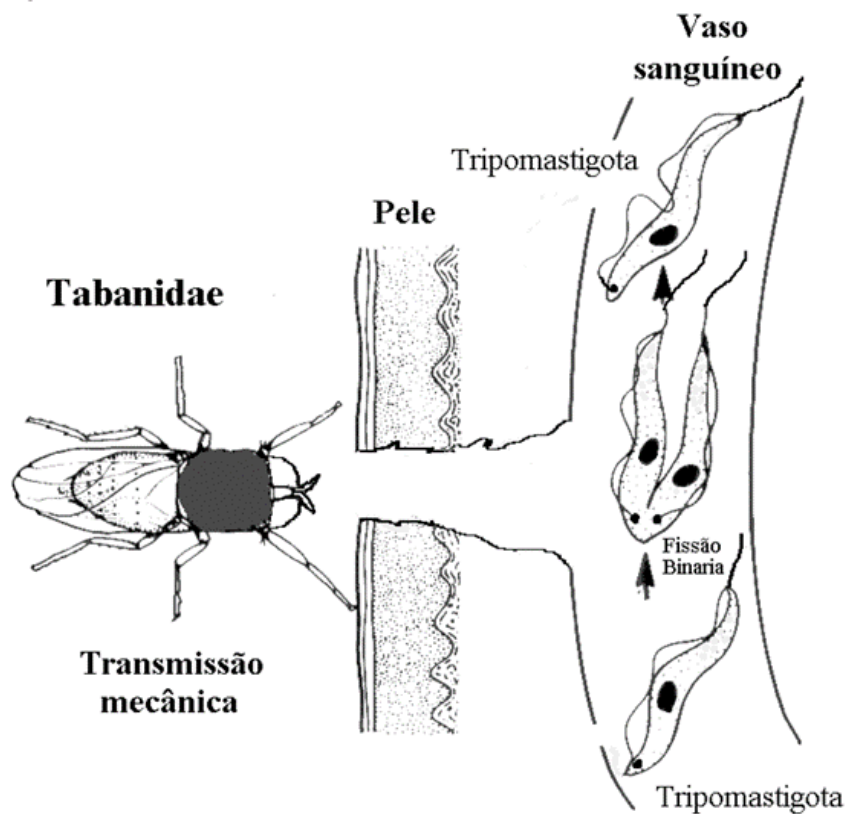
Fonte: (A) elaborada pela autora, 2016; (B) (Silva *et al.*, 2002).

*T. evansi* e *T. equiperdum* são indistinguíveis ultra estruturalmente, porém possuem características estruturais e bioquímicas semelhantes (Brun *et al.*, 1998). Estes dados são reforçados pelos achados da biologia molecular que revelam uma similaridade genética de 94,9% entre as duas espécies (Carnes *et al.*, 2015). Entretanto, possuem patogenia e epidemiologia bem distintas, principalmente quanto à via de transmissão (prioritariamente venérea para *T. equiperdum*) e o sítio de localização dos protozoários nos animais, em que raramente *T. equiperdum* pode ser encontrado na corrente sanguínea, enquanto *T. evansi* é encontrado primariamente na corrente sanguínea (Hoare, 1972; Gillingwater *et al.*, 2007).

O ciclo do *T. evansi* é direto (Figura 2), ou seja, não há uma fase de desenvolvimento em hospedeiros intermediários, uma vez que, possivelmente durante o processo evolutivo perdeu o maxicírculo do DNA cinetoplástico mitocondrial (cinetoplasto), e tornou-se incapaz de prosseguir com a multiplicação no hospedeiro invertebrado (Lai *et al.*, 2008; Auty *et al.*, 2015). Assim, *T. evansi* apresenta apenas a forma tripomastigota, encontrada no sangue de

vertebrados e é transmitido de forma acíclica por meio de vetores mecânicos, sendo carregado na probóscide após o repasto sanguíneo por insetos hematófagos (Spickler, 2009; Desquesnes, *et al.*, 2013b).

Figura 2 - Ciclo de transmissão do *T. evansi*. Multiplicação na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado. Transmissão mecânica por vetor.



Fonte: Adaptado de (Silva *et al.*, 2002).



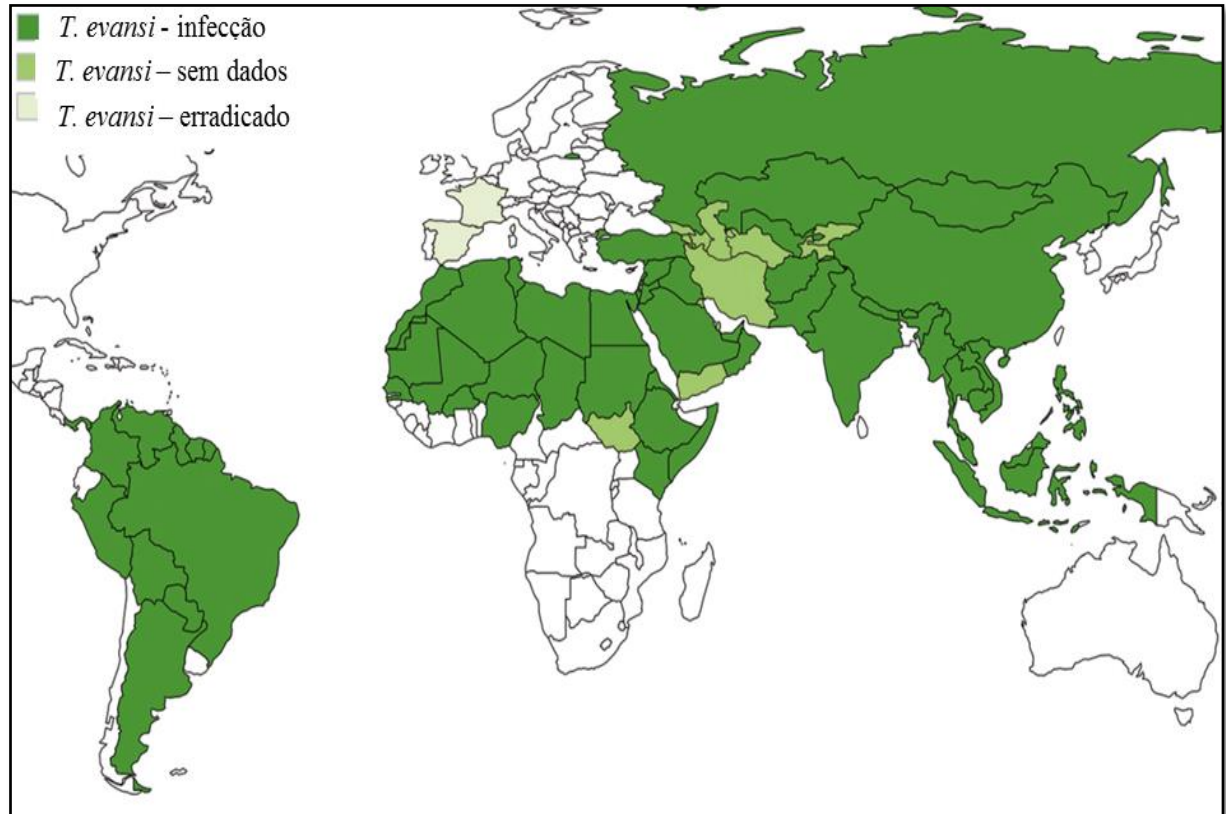
### 2.1.3. EPIZOOTIOLOGIA

*T. evansi*, foi descrito primeiramente na Índia por Griffith Evans em 1880, ao examinar o sangue de equinos e camelos doentes (Desquesnes *et al.*, 2013b), (Hoare, 1972). No continente americano, o parasito possivelmente chegou através de equinos introduzidos pelos conquistadores espanhóis, por volta do século XVI (Desquesnes, 2004).

Atualmente, *T. evansi* está amplamente distribuído na África, Ásia, América Latina, algumas regiões da Europa, Oriente Médio e Oceania (Figura 3), tanto no ciclo silvestre quanto doméstico, acometendo diferentes espécies animais e apresentando diferentes taxas de prevalência, de acordo com a área geográfica (Spickler, 2009; Desquesnes *et al.*, 2013a).

Pode infectar uma ampla gama de hospedeiros, podendo causar doença clínica na maioria dos mamíferos domésticos e animais silvestres ou de zoológicos (Spickler, 2009; Desquesnes *et al.*, 2013a). A doença clínica já foi descrita, em diferentes regiões do mundo, em equídeos (equinos, muares e asininos), camelos, lhamas, cervos, bovinos, ovelhas, cabras, suínos, caninos, elefantes e ursos, que se apresentam como hospedeiros mais suscetíveis a infecção. Na América do Sul, a infecção por *T. evansi* já foi relatada também em capivaras, quati, porco do mato, morcegos hematófagos, morcegos insetívoros e frugívoros, roedores (Aquino *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2002; Desquesnes, 2004; Herrera *et al.*, 2004; Spickler, 2009), constituindo uma diversidade grande de reservatórios para o agente no ambiente silvestre e doméstico (Desquesnes, 2004).

Figura 3 - Distribuição da infecção por *T. evansi* no mundo, considerando a presença da infecção com doença clínica (verde escuro), presença da infecção sem dados epidemiológicos (verde claro) e presença de surtos seguido da erradicação (cinza).



Fonte: Adaptado de (Auty *et al.*, 2015).

No Brasil, o primeiro diagnóstico do *T. evansi*, foi realizado em equinos na Ilha de Marajó no Pará, entre os anos de 1827 e 1830 (Desquesnes *et al.*, 2013b). *T. evansi* também foi isolado em 1850 no Pantanal mato-grossense, entretanto, somente foi relatado em 1894 na sub-região de Nhecolândia, no Mato Grosso do Sul (Silva *et al.*, 1995).

A infecção pelo *T. evansi* é considerada enzoótica em equinos do Pantanal Mato-grossense, onde assume importância econômica devido à grande população do rebanho equino (Silva *et al.*, 1995; Aquino *et al.*, 1999). Um estudo realizado no Pantanal mostrou uma prevalência de anticorpos contra *T. evansi* em 9,6% dos cavalos, 4,2% dos bovinos, 18,6% de cães e 14% de capivaras, utilizando um ensaio de ELISA indireto (Franke *et al.*, 1994). Também no Pantanal, com base no diagnóstico direto através da PCR foi observada positividade para *T. evansi* em 34,9% dos equinos, 8,8% de bovinos, 41,9% dos búfalos, 9,8% dos cães e 29,2% das

capivaras (Herrera *et al.*, 2004). Nessa região já houve descrição da infecção por *T. evansi* em quatis e pequenos marsupiais (Nunes, 1993; Herrera *et al.*, 2004). No norte do país, ainda são descritos dois surtos recentes em equinos no município de Chaves na Ilha de Marajó – PA, no ano de 2011 com a morte de 40 animais e em 2012 com a morte de 183 animais (Silva *et al.*, 2016). Um estudo realizado no Pantanal Matogrossense em equinos, nos anos de 2012 e 2013, mostrou soropositividade para *T. evansi* na população de equinos jovens de 70,7% no início da estação chuvosa e 81% no período de inundação (final das chuvas), já na população de equinos adultos foi observado soropositividade de 42% no início da estação chuvosa e 68% no período de inundação (final das chuvas), possivelmente associado com aumento na presença de vetores e imunossupressão dos animais no período de inundação (Parreira *et al.*, 2016).

Na região sul do país a doença já foi relatada no Rio Grande do Sul em equinos (Conrado, 2005), ovinos e caninos (Colpo *et al.*, 2005). Em Santa Catarina o único caso da tripanossomíase foi descrito em 2007, em bovinos leiteiros da região meio oeste do estado, sendo o diagnóstico realizado com base no exame direto (Silva *et al.*, 2007).

A doença em bovinos e equinos apresenta-se de forma similar nas diferentes regiões, exceto na Índia, onde são descritos padrões clínicos da doença em bovinos com alta taxa de mortalidade, que frequentemente pode ser superior a 90%, divergindo dos quadros clínicos observados em outras regiões do mundo (Desquesnes *et al.*, 2013b). Paralelamente, outros estudos mostram uma prevalência da infecção pelo *T. evansi* de 1-9% em equinos em Punjab, Índia (Sumbria *et al.*, 2014), 2,1% em camelos no Iran e 2,3% na Etiopia (Olani *et al.*, 2016) e 42% em bovinos no Egito (Fereig *et al.*, 2017).

A transmissão do *T. evansi* está associada primariamente a um vetor invertebrado (Oie, 2015) (Figura 2), aproximadamente 50 espécies de tabanídeos são descritas como vetores potenciais do *T. evansi* (Desquesnes *et al.*, 2013a). Na América do Sul *T. evansi* é transmitido basicamente por insetos hematófagos, principalmente pertencentes às famílias *Tabanidae*, *Simuliidae*, *Culicidae*, *Hippoboscidae* e subfamília *Stomoxydinae* (Spickler, 2009; Desquesnes *et al.*, 2013b). Morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), também podem ser considerados vetores do *T. evansi*, assim como, possíveis reservatórios do agente no ciclo silvestre (Hoare, 1972; Nunes, 1993). Outras formas de transmissão como a iatrogênica (procedimentos, compartilhamento de agulhas), oral, fômites e a congênita já foram descritas (Desquesnes *et al.*, 2013a). Devido à diversidade de vetores, número de espécies hospedeiras e forma de transmissão, *T. evansi* possui grande potencial de propagação e disseminação em forma de surtos, principalmente, quando há presença de vetores eficientes (Desquesnes, 2004).

#### 2.1.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DA SURRA EM EQUINOS

Clinicamente os animais de grande porte infectados por *T. evansi* podem apresentar quadros muito variáveis quanto a intensidade dos sinais, podendo passar despercebidos ou desenvolver uma forma aguda e fatal dependendo da virulência do agente, suscetibilidade do animal e desafio ambiental (Silva *et al.*, 1995; Rodrigues, 2005). De modo geral, os animais apresentam clinicamente febre intermitente, anemia, edema ventral e de membros, caquexia e aborto (Hoare, 1972; Brun *et al.*, 1998). Com a evolução da doença pode ocorrer sinais neurológicos (Monzon *et al.*, 1984; Rodrigues *et al.*, 2009) caracterizados por ataxia, hiperexcitabilidade, andar em círculos e déficit proprioceptivo (Rodrigues *et al.*, 2009). A infiltração e disseminação do parasito no sistema nervoso central (SNC) pode estar associado aos sinais clínicos nervosos (Mbaya *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009).

A disseminação do *T. evansi* nos tecidos provoca alterações inflamatórias, degenerativas e necróticas resultantes da invasão pelas formas tripomastigotas nos espaços extravasculares (Habla *et al.*, 2012). Dessa forma, tanto as manifestações clínicas, quanto as alterações patológicas dependem da distribuição dos parasitos e da gravidade das lesões induzidas nos diferentes órgãos/tecidos (Habla *et al.*, 2012; Desquesnes *et al.*, 2013b).

Os equinos e camelídeos são os animais mais suscetíveis à infecção pelo *T. evansi* (Figura 4), apresentando a forma clínica clássica da surra ou mal das cadeiras, enquanto, os asininos e muares são considerados de baixa suscetibilidade. O período de incubação é de aproximadamente duas semanas (Monzon *et al.*, 1984) e o curso da doença pode ser subagudo, agudo ou crônico (Aquino *et al.*, 1999).

Figura 4 - Clinicamente, os equinos apresentam durante a infecção natural por *T. evansi* (A) ataxia de membros posteriores e nos casos mais graves (B) emagrecimento e óbito.



Fonte: (A) Adaptado de (Rodrigues, 2005); (B) Adaptado de (Desquesnes *et al.*, 2013b).

Em populações com baixo status imunitário frequentemente os animais desenvolvem forma aguda grave da doença e a taxa de mortalidade pode chegar com frequência a 50% (Desquesnes, 2004; Desquesnes, *et al.*, 2013b). Em áreas onde a infecção é enzoótica, os animais geralmente desenvolvem uma forma crônica ou subclínica da doença ou se tornam portadores assintomáticos.

Nos equinos, o período de incubação é de aproximadamente 1 a 4 semanas, podendo chegar a 8 semanas. Presença de edema subcutâneo (5-8 cm de diâmetro e 1 cm de espessura) podem ser considerados como achados patognomônicos da infecção, entretanto, nem sempre estão presentes (Franke *et al.*, 1994; Conrado, 2005). Os sinais clínicos mais evidentes são febre intermitente com maiores picos (41.5°C até 44°C) na fase de parasitemia mais intensa ou “plateau”, que frequentemente apresenta-se de forma cíclica ou intermitente (Monzon *et al.*, 1984; Marques *et al.*, 2000).

Na forma crônica da surra pode-se observar edema (submandibular, membros, peito, abdômen, testículos e úbere), perda progressiva de peso e icterícia grave (Monzon *et al.*, 1984; Spickler, 2009; Oie, 2015). Além disso, pode se observar fraqueza, letargia, anemia, perda de peso grave, erupções cutâneas, hemorragias petequiais nas pálpebras, especialmente da membrana nictitante, na vulva e mucosa vaginal, hemorragias na câmara anterior do olho (onde

tripanossomas pode também ser encontrada no material gelatinoso do canto interno do olho), aborto, alteração de locomoção, com sinais nervosos classicamente descritos em equinos como “mal das cadeiras”(Marques *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2009). Quando não tratados, os animais podem vir a óbito em duas a oito semanas. Durante o curso clínico da doença, o parasito pode ser observado nos fluidos intra e extra vascular (Habla *et al.*, 2012; Misra *et al.*, 2016). Os ciclos parasitêmicos possivelmente estão associados a mutações de glicoproteínas de superfície (VSG), produzindo evasão aos mecanismos de defesa do sistema imune (Hilali *et al.*, 2004; Desquesnes *et al.*, 2013b).

Os achados anatomopatológicos observados na necropsia de equinos, incluem palidez das mucosas, emaciação, esplenomegalia com hiperplasia da polpa branca, linfadenomegalia, hepatomegalia, congestão e hemorragia pulmonar, além de petéquias em vários órgãos (Dargantes, Reid, *et al.*, 2005; Rodrigues, 2005; Mbaya *et al.*, 2009). Na análise histopatológica observa-se infiltrado inflamatório mononuclear intersticial em múltiplos órgãos (Herrera *et al.*, 2002; Dargantes, Campbell, *et al.*, 2005). Alguns animais podem apresentar hiperplasia linfóide, congestão, edema e necrose multifocal da polpa vermelha do baço (Dargantes, Campbell, *et al.*, 2005; Rodrigues, 2005). No fígado, presença de infiltrado inflamatório mononuclear principalmente nos espaços porta, hiperplasia das células de Kupffer e necrose centrolobular moderada (Dargantes, Campbell, *et al.*, 2005). Outras lesões que podem ser observadas, de forma menos frequente, incluem miocardite não supurativa subepicárdica e subendocárdica, edema pulmonar, pneumonia intersticial mononuclear, glomerulite, nefrose tubular ou nefrite intersticial e hiperplasia da medula óssea (Herrera *et al.*, 2002; Dargantes, Campbell, *et al.*, 2005). Além disso, podem ser observados graus variáveis de meningoencefalite não supurativa generalizada, infiltrado de células inflamatórias mononucleares perivasculares, principalmente linfócitos, macrófagos e alguns plasmócitos (Dargantes, Reid, *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2009).

Segundo (Rodrigues *et al.*, 2009) a presença de parasitos no parênquima cerebral de equinos naturalmente infectados, pode estar associado a lesões de leucoencefalomalácia assimétrica, encefalite necrotizante, edema, desmielinização e meningite. Além disso, pode ser observada redução significativa na contagem de eritrócitos, da concentração de hemoglobina, volume globular, número de plaquetas e leucocitose (Onah *et al.*, 1996; Dargantes, Reid, *et al.*, 2005; Sumbria *et al.*, 2014; Pandey *et al.*, 2015).

A patogênese da anemia na tripanossomose é complexa e envolve uma série de mecanismos como a ação traumática direta dos protozoários sobre os eritrócitos, aumento da fragilidade celular (Onah *et al.*, 1996; Habla *et al.*, 2012; Pandey *et al.*, 2015). Segundo

(Pandey *et al.*, 2015) o mecanismo da anemia é em parte devido à ação da sialidase, que corta os ácidos sialícos da superfície dos eritrócitos e expõe os resíduos galactosil, que são reconhecidos por macrófagos levando a eritrofagocitose. O tipo de anemia já foi descrita em ratos como macrocítica hipocrômica e normocítica normocrômica (Omer *et al.*, 2007) e em equinos como normocítica hipocrômica (Ranjithkumar *et al.*, 2011).

São encontrados relatos divergentes quanto as alterações leucocitárias, segundo (Herrera *et al.*, 2002; Sumbria *et al.*, 2014) consideram que os valores leucocitários podem estar aumentados incluindo aumento de linfócitos. Tais afirmações contrapõem os relatos de (Silva *et al.*, 1995; Aquino *et al.*, 1999), que observaram leucopenia em decorrência da neutropenia. Já (Marques *et al.*, 2000) e colaboradores descrevem que os valores do leucograma podem se apresentar normais.

### **2.1.5. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *T. evansi***

Apesar de serem recomendadas diferentes metodologias para o diagnóstico da infecção pelo *T. evansi* nos rebanhos de animais de produção em outros países, no Brasil, os protocolos de diagnóstico laboratorial dificilmente incluem como suspeita primária ou no diagnóstico diferencial a infecção por *T. evansi*.

Conforme recomendação da Organização Internacional de Epizootias (OIE), o diagnóstico confirmatório oficial da infecção, pode ser baseado em ensaios diretos, através da microscopia direta e ensaios moleculares (PCR) ou de forma indireta, pela detecção da resposta imune humoral dos animais através do teste de fixação do complemento (CFT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (OIE, 2015).

A microscopia direta ou exame parasitológico direto, baseado na visualização do parasito, apresenta grandes limitações de sensibilidade e especificidade devido a biologia da infecção e as flutuações cíclicas da parasitemia (Hilali *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2012). Além disso, o manuseio da amostra e obrigatoriedade de uma parasitemia detectável é tratado como um limitante (Camargo *et al.*, 2004).

Ensaios baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm demonstrado índices de especificidade e sensibilidade bastante satisfatórios, superiores aos índices de sensibilidade e especificidade dos ensaios sorológicos, sendo considerada a técnica padrão ouro para a identificação do *T. evansi* (Ventura *et al.*, 2002; Oie, 2015; Singla *et al.*, 2015). Além disso, os ensaios moleculares, utilizando marcadores genéticos permitem diferenciar *T. equiperdum*, *T. evansi* e *T. vivax*, necessário para os programas de controle e vigilância (Spickler, 2009; Oie,

2015). Outras metodologias poderiam ser utilizadas de forma complementar como RFLP (análise de polimorfismo de fragmentos de restrição), sondas nucleares e *fingerprints* para o diagnóstico definitivo (Spickler, 2009; Oie, 2015).

Métodos indiretos como soroaglutinação podem ser utilizados como estratégia de diagnóstico de triagem das tripanossomíases, permitindo avaliação de grande número de animais, de forma rápida, com baixo custo e facilidade de implementação nas rotinas de trabalho laboratorial (Hilali *et al.*, 2004; Singla *et al.*, 2015). Quando associado a um ensaio confirmatório, o protocolo de triagem permite agregar maiores índices de sensibilidade e especificidade aos programas de vigilância e controle da infecção.

Ensaio de soroaglutinação direta detectam IgM + IgG permitindo a detecção de infecções precoces (recentes) ou infecções tardias (crônicas) em rebanhos, além do acompanhamento de animais individualmente durante o tratamento com drogas tripanocida (Spickler, 2009; OIE, 2015). Neste contexto, a associação de um ensaio de triagem de baixo custo com fácil implantação na rotina laboratorial diagnóstica pode fortalecer as estratégias de vigilância da doença, principalmente quando associado a um ensaio diagnóstico definitivo.

Dentre os ensaios indiretos padronizados para diagnóstico da infecção por *T. evansi* podem ser citados CATT test / *T. evansi*® (Card Agglutination Test *Trypanosoma*) (Hilali *et al.*, 2004), aglutinação em LATEX (Roge *et al.*, 2014), imunofluorescência indireta (RIFI) (Katende *et al.*, 1987) e ELISA (Sivajothi *et al.*, 2016) que utilizam como antígenos glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) purificadas do tipo *T. evansi* Rode *Trypanozoon* (RoTat) 1.2. (Cepa *T. evansi* RoTat 1.2.), isolada na indonésia de equinos ou lisados celulares de *T. evansi*.

O diagnóstico indireto baseado em ensaios imunoenzimáticos (ELISA), CATT test / *T. evansi*, Latex) e RIFI são amplamente utilizadas para o diagnóstico da infecção pelo *T. evansi*, permitindo testar grande número de animais, de forma rápida com possibilidade de automação parcial ou total dependendo do ensaio, facilitando principalmente estudos de prevalência, entretanto, os kits comerciais não estão disponíveis no Brasil e apresentam alto custo de importação inviabilizando seu uso na rotina diagnóstica laboratorial.

Os métodos sorológicos mostram com frequência reações cruzadas entre tripanosomas, como por exemplo entre *T. evansi*, *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei*, *T. equiperdum* e *T. cruzi* (Desquesnes, 2004), entretanto, mesmo assim poderiam ser utilizados pelos programas de vigilância e controle das tripanossomíases, uma vez que, é possível associar outras técnicas mais específicas, como ensaios baseados na PCR para o diagnóstico definitivo.



A utilização de antígenos derivados de VSGs de *T. evansi*, recuperados de diferentes espécies animais (burro, cavalo e capivara) na Venezuela podem gerar resposta imune cruzada com *T. vivax* (Camargo *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram obtidos utilizando proteínas de superfície (Velasquez *et al.*, 2014) e proteínas purificadas da fração citosólica do *T. evansi* (Camargo *et al.*, 2004).

Quando comparados os ensaios diretos (PCR e exame direto) com ensaios indiretos (CATT test / *T. evansi*<sup>®</sup>) para o diagnóstico de *T. evansi* em bovinos na Índia (Singla *et al.*, 2015) e dromedários no Paquistão (Tehseen *et al.*, 2015), observaram que a PCR foi mais sensível e específico, portanto mais recomendada para o diagnóstico definitivo, entretanto, o custo foi muito mais elevado, o que limita sua aplicação nos programas de controle e vigilância, principalmente na triagem de rebanhos (Spickler, 2009; Oie, 2015). Sendo assim, é fundamental que sejam utilizados ensaios rápidos e de baixo custo para a triagem dos rebanhos seguido de ensaios com alta especificidade e sensibilidade para o diagnóstico definitivo (Tehseen *et al.*, 2015), a fim de fortalecer os programas de vigilância e controle da infecção pelo *T. evansi*, principalmente no Brasil, onde os médicos veterinários de campo raramente incluem a tripanossomíase no diagnóstico diferencial de rotina.

#### **2.1.6. IMPORTÂNCIA DO *T. evansi* PARA A SAÚDE PÚBLICA**

Nos humanos a presença da apoliproteína L-I (APOL1), uma proteína sérica que atua como um fator tripanolítico, leva a abertura de canais seletivos de cátions na membrana plasmática e consequente lise do agente, evitando a sobrevivência do mesmo na corrente sanguínea (Thomson e Finkelstein, 2015). Entretanto, o primeiro caso de infecção por *T. evansi* em humanos foi relatado em 2005 na Índia, em um paciente sem atividade tripanolítica no plasma, devido a uma mutação nos alelos da APOL1 (Joshi *et al.*, 2005). Já em 2015, no Vietnã, foi relatado o primeiro caso de tripanossomose causado por *T. evansi* em um paciente que possuía uma produção normal de APOL1, porém se encontrava em uma área endêmica da doença (Van Vinh Chau *et al.*, 2016; Yadav *et al.*, 2017). Possivelmente, no caso de humanos que produzem corretamente a APOL1 pode estar associada a presença da proteína associada à resistência do soro (SRA) que interage e inibe a ação da APOL1, como ocorre na infecção por *T. brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense*. Neste caso, observou-se a expressão de genes tipo *esag*, ligados a expressão das VSG (glicoproteínas de superfície variáveis), que atuam como SRA (Xong *et al.*, 1998).

*T. evansi* ainda é considerado pouco expressivo para saúde pública apesar do potencial zoonótico, pesquisas são necessárias para entender melhor fatores de susceptibilidade, vias de transmissão, potencial vetores e opções terapêuticas para humanos (Van Vinh Chau *et al.*, 2016).

#### **2.1.7. TRATAMENTO E CONTROLE DA INFECÇÃO POR *T. evansi***

Os programas oficiais nacionais de sanidade equina e bovina não possuem tópicos específicos para a vigilância e controle da doença no Brasil, possivelmente devido a dificuldade de diagnóstico e a regionalização dos casos. Nesta perspectiva, ações de levantamento epidemiológico devem contribuir para estabelecer os reais desafios representados pela infecção nas diferentes regiões.

O tratamento para a surra, atualmente, baseia-se no uso de seis drogas: aceturato de diminazeno; brometo e cloreto de homidium; cloreto de isometamidium; sulfato de quinapiramina; suramina sódica e diidrocloreto de melarsomina, sendo, os dois últimos mais indicados para o tratamento da infecção pelo *T. evansi*, enquanto as demais possuem uma aplicação mais genérica para as tripanossomias (Brun *et al.*, 1998; Giordani *et al.*, 2016). A melarsomina, por exemplo, desenvolvida há pouco mais de 20 anos é o único composto que apresenta eficácia comprovada, para ser utilizado em diversas espécies animais (Seidl *et al.*, 1998; Mbaya *et al.*, 2014).

Os fatores limitantes associados à quimioterapia é a alta toxicidade das drogas para o hospedeiro e a seleção de cepas resistentes, visto que, grande parte destes compostos vem sendo utilizados no campo há mais de 40 anos (Seidl *et al.*, 1998; Giordani *et al.*, 2016). Como exemplo são descritos efeitos colaterais associados ao uso do dimetil sulfato de quinapiramina e do diaceturato de diminazeno em equinos, camelos, burros e cães mesmo utilizando posologia recomendada (Desquesnes, 2004; Giordani *et al.*, 2016).

Após o tratamento, novas parasitemias podem ocorrer devido à sobrevivência dos parasitas, que se tornam resistentes às drogas ou como resultado do escape do parasita, possivelmente, quando estes atingem sítios privilegiados como líquido cefalorraquidiano, local onde a concentração das drogas é limitada (Seidl *et al.*, 1998; Desquesnes *et al.*, 2013a; Giordani *et al.*, 2016).

Os mecanismos de resistência dos tripanosomas as drogas utilizadas nos tratamentos têm sido relatadas por diferentes autores, entretanto, os mecanismos envolvidos não são claros

(Giordani *et al.*, 2016). Existe a possibilidade de resistência cruzada entre princípios ativos como é o caso da melarsomina que tem levado à resistência cruzada aos arsenicais e diaceturato de diminazene (Mbaya *et al.*, 2014).

No Brasil, segundo (Faccio *et al.*, 2013) para tratamento da surra em equinos, protocolos a base de suramina sódica na dose de 10 mg/Kg ou três aplicações de diaceturato de diminazeno na dose de 7 mg/Kg tem sido descritos como eficientes, inclusive para os quadros de doença clínica (Silva *et al.*, 1995; Seidl *et al.*, 1998).

Como estratégias de imunoprofilaxia, até o presente não existem modelos vacinais eficientes ou que possam ser utilizados em programas de controle da doença (OIE, 2015).

A surra ainda representa um grande desafio para a sanidade animal e para a economia agropecuária brasileira, ressaltando a necessidade urgente de desenvolver novos modelos vacinais, métodos diagnósticos eficientes, além de estratégias racionais de vigilância e controle. Neste sentido, elementos inerentes à dinâmica da infecção, métodos diagnósticos e mecanismos da patogênese da surra precisam ser estudados.

### **3. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GERAL**

Padronizar e validar um ensaio de soroaglutinação rápida com antígeno (SAR/Te) para detecção de anticorpos contra *T. evansi* em equinos.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Padronizar e validar um ensaio de soroaglutinação rápida com antígeno tamponado para diagnóstico da infecção pelo *T. evansi* em equinos.
- b) Validar o antígeno utilizando amostras de campo dos rebanhos de equinos do Estado de Santa Catarina.
- c) Avaliar aspectos parasitológicos, hematológicos e bioquímicos nos animais positivos.

#### 4. REFERÊNCIAS

- AQUINO, L. P. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 255-60, Mar-Apr 1999. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10224539](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10224539) >.
- AUTY, H. et al. Cattle trypanosomosis: the diversity of trypanosomes and implications for disease epidemiology and control. **Rev Sci Tech**, v. 34, n. 2, p. 587-98, Aug 2015. ISSN 0253-1933 (Print) 0253-1933 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601459> >.
- BORST, P.; FASE-FOWLER, F.; GIBSON, W. C. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 23, n. 1, p. 31-8, Feb 1987. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3033499](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3033499) >.
- BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z. R. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Vet Parasitol**, v. 79, n. 2, p. 95-107, Oct 1998. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9806490](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9806490) >.
- CAMARGO, R. E.; UZCANGA, G. L.; BUBIS, J. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. **Vet Parasitol**, v. 123, n. 1-2, p. 67-81, Aug 13 2004. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15265572> >.
- CARNES, J. et al. Genome and phylogenetic analyses of *Trypanosoma evansi* reveal extensive similarity to *T. brucei* and multiple independent origins for dyskinetoplasty. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 1, p. e3404, Jan 2015. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25568942> >.
- CLAES, F. et al. Variable Surface Glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. **Kinetoplastid Biol Dis**, v. 3, n. 1, p. 3, Sep 17 2004. ISSN 1475-9292 (Print) 1475-9292 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377385> >.
- COLPO, C. B. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, 2005.
- CONRADO, A., LOPES, STA, OLIVEIRA, LSS, MONTEIRO, SG, VARGAS, DLB, BUENO, A. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região Central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 938-941, 2005.
- DARGANTES, A. P. et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. II. Pathology. **J Comp Pathol**, v. 133, n. 4, p. 267-76, Nov 2005. ISSN 0021-9975 (Print)

0021-9975 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213516> >.

DARGANTES, A. P.; REID, S. A.; COPEMAN, D. B. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. I. Clinical signs and clinical pathology. **J Comp Pathol**, v. 133, n. 4, p. 261-6, Nov 2005. ISSN 0021-9975 (Print)

0021-9975 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16213515> >.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-8884 (Electronic) 1687-8876 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811486> >.

DESQUESNES, M. **Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America.** HEALTH, W. O. F. A.: 174 p. 2004.

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 321237, 2013a. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24151595> >.

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 194176, 2013b. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024184> >.

FACCIO, L. et al. Susceptibility of Brazilian isolates of *Trypanosoma evansi* to suramin sodium: test in experimentally infected mice. **Exp Parasitol**, v. 134, n. 3, p. 309-12, Jul 2013. ISSN 1090-2449 (Electronic) 0014-4894 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562880> >.

FEREIG, R. M. et al. Seroprevalence of *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Trypanosoma evansi*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle in southern Egypt. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 8, n. 1, p. 125-131, Jan 2017. ISSN 1877-9603 (Electronic) 1877-959X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27789159> >.

FRANKE, C. R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone (Mato Grosso, Brazil). **Acta Trop**, v. 58, n. 2, p. 159-69, Nov 1994. ISSN 0001-706X (Print) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7887341> >.

GILLINGWATER, K.; BUSCHER, P.; BRUN, R. Establishment of a panel of reference *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* strains for drug screening. **Vet Parasitol**, v. 148, n. 2, p. 114-21, Sep 01 2007. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624671> >.

GIORDANI, F. et al. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology**, v. 143, n. 14, p. 1862-1889, Dec 2016. ISSN 1469-8161 (Electronic) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27719692> >.

HABILA, N. et al. Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections. **Res Vet Sci**, v. 93, n. 1, p. 13-7, Aug 2012. ISSN 1532-2661 (Electronic) 0034-5288 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940025> >.

HERRERA, H. M. et al. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. **Acta Trop**, v. 81, n. 3, p. 203-10, Mar 2002. ISSN 0001-706X (Print) 0001-706X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11835897](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11835897) >.

HERRERA, H. M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 125, n. 3-4, p. 263-75, Nov 10 2004. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15482883> >.

HILALI, M. et al. Evaluation of the card agglutination test (CATT/T. *evansi*) for detection of *Trypanosoma evansi* infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. **Vet Parasitol**, v. 121, n. 1-2, p. 45-51, May 07 2004. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15110402> >.

HOARE, C. A. The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph. **Blackwell Scientific Publications**, v. 1, p. 593–604, 1972.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2015** 2015.

JOSHI, P. P. et al. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 3, p. 491-5, Sep 2005. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16172469> >.

KATENDE, J. M. et al. A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis. **Trop Med Parasitol**, v. 38, n. 1, p. 41-4, Mar 1987. ISSN 0177-2392 (Print) (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3299658> >.

LAI, D. H. et al. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 6, p. 1999-2004, Feb 12 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245376> >.

MACHADO, E. S. **Sanidade Equídea** 2017.

MARQUES, L. C. et al. Experimental Infection with *Trypanosoma evansi* in horse: clinical and haematological observations. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 9, n. 1, p. 11-15, 2000.

MBAYA, A. W.; ALIYU, M. M.; IBRAHIM, U. I. The clinico-pathology and mechanisms of trypanosomosis in captive and free-living wild animals: a review. **Vet Res Commun**, v. 33, n. 7, p. 793-809, Oct 2009. ISSN 1573-7446 (Electronic) 0165-7380 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19340600> >.

MBAYA, A. W.; KUMSHE, H. A.; DILLI, H. K. Serum biochemical changes in dromedaries experimentally infected with *Trypanosoma evansi* and treated with melarsenoxide cysteamine hydrochloride. **VETERINARSKI ARHIV**, v. 84, n. 4, p. 377-385, 2014.

MISRA, K. K.; ROY, S.; CHOUDHURY, A. Biology of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* in experimental heterologous mammalian hosts. **J Parasit Dis**, v. 40, n. 3, p. 1047-61, Sep 2016. ISSN 0971-7196 (Print) 0971-7196 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27605836> >.

MONZON, C. M.; MANCEBO, O. A.; D'AGOSTINO, B. I. Consideraciones clinicas de la tripanosomiasis equina experimental (*Trypanosoma evansi*, Voges 1901). **Revista de Medicina Veterinária**, v. 65, n. 1, p. 13-18, 1984.

NUNES V.L, O. E. T. *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* in the coati from the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 5, p. 692, 1990.

NUNES, V. L. B. O., E.T.; DORVAL, M.E.C. Investiga  o epidemiológica sobre *Trypanosoma* (trypanozoon) *evansi* no pantanal sul-mato-grossense. Estudo de reservatórios. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 2, p. 41-44, 1993.

OIE, W. O. F. A. H. Surra. In: (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2015. p.500.

OLANI, A. et al. Prevalence of camel trypanosomosis (surra) and associated risk factors in Borena zone, southern Ethiopia. **Parasitol Res**, v. 115, n. 3, p. 1141-7, Mar 2016. ISSN 1432-1955 (Electronic) 0932-0113 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26627690> >.

OMER, O. H.; MOUSA, H. M.; AL-WABEL, N. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet Parasitol**, v. 145, n. 1-2, p. 142-5, Apr 10 2007. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169491> >.

ONAH, D. N.; HOPKINS, J.; LUCKINS, A. G. Haematological changes in sheep experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitol Res**, v. 82, n. 8, p. 659-63, 1996. ISSN 0932-0113 (Print) 0932-0113 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897497> >.

PANDEY, V. et al. Haemato-biochemical and oxidative status of buffaloes naturally infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet Parasitol**, v. 212, n. 3-4, p. 118-22, Sep 15 2015. ISSN 1873-2550 (Electronic) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=26242833](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26242833) >.

PARREIRA, D. R. et al. Health and epidemiological approaches of *Trypanosoma evansi* and equine infectious anemia virus in naturally infected horses at southern Pantanal. **Acta Trop**, v. 163, p. 98-102, Nov 2016. ISSN 1873-6254 (Electronic) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27497875> >.



- RANJITHKUMAR, M. et al. Disturbance of oxidant/antioxidant equilibrium in horses naturally infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet Parasitol**, v. 180, n. 3-4, p. 349-53, Aug 25 2011. ISSN 1873-2550 (Electronic) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514732> >.
- RODRIGUES, A. et al. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. **Vet Pathol**, v. 46, n. 2, p. 251-8, Mar 2009. ISSN 0300-9858 (Print) 0300-9858 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261636> >.
- 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 eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 239-249, 2005.
- ROGE, S. et al. Development of a latex agglutination test with recombinant variant surface glycoprotein for serodiagnosis of surra. **Vet Parasitol**, v. 205, n. 3-4, p. 460-5, Oct 15 2014. ISSN 1873-2550 (Electronic) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25224790> >.
- SEIDL, A. et al. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Prev Vet Med**, v. 33, n. 1-4, p. 219-34, Jan 1998. ISSN 0167-5877 (Print) 0167-5877 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9500176> >.
- SHARMA, P. et al. Comparative evaluation of real time PCR assay with conventional parasitological techniques for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in cattle and buffaloes. **Vet Parasitol**, v. 190, n. 3-4, p. 375-82, Dec 21 2012. ISSN 1873-2550 (Electronic) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22858228> >.
- SILVA, A. S. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 373-376, 2007. ISSN 1678-0345.
- SILVA, J. A. et al. Reemerging of natural infection by *Trypanosoma evansi* in horses in Arari, Marajó Island, Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 12, 2016. ISSN 1678-4596.
- SILVA, R. A. et al. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 60, n. 1-2, p. 167-71, Nov 1995. ISSN 304-4017 (Print) (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8644453> >.
- SILVA, R. A. M. S. et al. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia, Diagnóstico e Controle**. Embrapa Pantanal, 2002. 140.
- SINGLA, L. D. et al. Comparative evaluation of agglutination assay with microscopy and polymerase chain reaction for detection of *Trypanosoma evansi* in bovines of Punjab. **Indian Journal of Animal Sciences** v. 85, n. 11, p. 1164–1166, 2015.
- SIVAJOTHI, S. et al. Diagnosis of *Trypanosoma evansi* in bovines by indirect ELISA. **J Parasit Dis**, v. 40, n. 1, p. 141-4, Mar 2016. ISSN 0971-7196 (Print) 0971-7196 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27065614> >.

SPICKLER, A. R. **Surra (Last Updated)** 2009.

SUMBRIA, D. et al. Equine trypanosomosis in central and western Punjab: prevalence, haemato-biochemical response and associated risk factors. **Acta Trop**, v. 138, p. 44-50, Oct 2014. ISSN 1873-6254 (Electronic) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24931285> >.

TEHSEEN, S. et al. Parasitological, serological and molecular survey of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 415, Aug 12 2015. ISSN 1756-3305 (Electronic) 1756-3305 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26259616> >.

TEWARI, A. K. et al. Histopathological observations on experimental *Trypanosoma evansi* infection in bovine calves. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v. 33, n. 1, p. 85-87, 2009. ISSN 0973-970X. Disponível em: < <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijvp&volume=33&issue=1&article=017> >.

THOMSON, R.; FINKELSTEIN, A. Human trypanolytic factor APOL1 forms pH-gated cation-selective channels in planar lipid bilayers: relevance to trypanosome lysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 9, p. 2894-9, Mar 03 2015. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25730870> >.

VAN VINH CHAU, N. et al. A Clinical and Epidemiological Investigation of the First Reported Human Infection With the Zoonotic Parasite *Trypanosoma evansi* in Southeast Asia. **Clin Infect Dis**, v. 62, n. 8, p. 1002-1008, Apr 15 2016. ISSN 1537-6591 (Electronic) 1058-4838 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26908809> >.

VELASQUEZ, N. P. et al. Partial Purification of Integral Membrane Antigenic Proteins from *Trypanosoma evansi* That Display Immunological Cross-Reactivity with *Trypanosoma vivax*. **J Parasitol Res**, v. 2014, p. 965815, 2014. ISSN 2090-0023 (Print) 2090-0023 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24757558> >.

VENTURA, R. M. et al. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 1, p. 53-63, Jan 2002. ISSN 0020-7519 (Print) (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796122> >

VITTOZ, R. **Prophylaxie du surra en Asie**. Bulletin de l'Ofce International des Epizooties '44: 83-106 p. 1955.

XONG, H. V. et al. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. **Cell**, v. 95, n. 6, p. 839-46, Dec 11 1998. ISSN 0092-8674 (Print) (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9865701> >.

YADAV, S. C. et al. Antigenic characterization of 52-55kDa protein isolated from *Trypanosoma evansi* and its application in detection of equine trypanosomosis. **Res Vet Sci**, v. 114, p. 455-460, Aug 01 2017. ISSN 1532-2661 (Electronic) 0034-5288 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28783594> >.

## 5. CAPÍTULO I - MANUSCRITO I

### **AVALIAÇÃO DE UM TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO RÁPIDA (SAR/TE) PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma evansi* EM EQUINOS**

#### **Evaluation of the simple agglutination test (SAR/Te) for detection of *Trypanosoma evansi* infection in equine**

**Carolina Reck<sup>1</sup>; Luiz Cláudio Mileti<sup>1\*</sup>; Colaboradores**

<sup>1</sup> Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC). Av. Luís de Camões, 2090, Lages, SC, Brasil.

\*Autor para correspondência: luiz.miletti@ udesc.br.

#### **Resumo**

A surra é uma doença infecciosa, causada pelo *Trypanosoma evansi*, que acomete grande número de espécies de animais domésticos e selvagens. O controle da infecção está baseado no diagnóstico rápido seguido do tratamento dos animais doentes. Este estudo teve como objetivo avaliar o ensaio de soroaglutinação rápida (SAR/Te) para detecção da infecção pelo *T. evansi* em amostras de soro de equinos. O ensaio foi comparado com o diagnóstico pela PCR, para estimativa da sensibilidade, especificidade e concordância (fator kappa -  $k$ ). No total, foram coletadas 176 amostras de sangue de equinos. Uma sensibilidade de 95% e especificidade de 99% foram estimadas. O título de corte para SAR/Te foi 128. Foi observado grau de concordância ( $k$ ) de 91,3% (IC 95%;  $p < 0,01$ ) entre SAR/Te e PCR. A análise complementar de especificidade não mostrou reação cruzada do antígeno SAR/Te com soros positivos para outros agentes infecciosos. Em conclusão, este estudo mostrou que SAR/Te pode ser uma ferramenta prática e rápida para o diagnóstico serológico de surra em rebanhos de equinos do Brasil.

**Palavras chave:** Tripanossomoses, sorodiagnóstico, hemoprotozoários; vigilância epidemiológica.

## 5.1. INTRODUÇÃO

*Trypanosoma evansi* é o hematoprotosoário flagelado causador da surra, uma tripanossomose que afeta grande número de espécies de animais domésticos e silvestres (Desquesnes *et al.*, 2013b). Em equinos, a doença é caracterizada por febre, aborto, edema subcutâneo e sinais nervosos (Silva *et al.*, 1995; Rodrigues *et al.*, 2009). Uma forma aguda fatal também é descrita (Lun *et al.*, 1993). *T. evansi* está amplamente distribuído na África, Ásia, América Latina, em algumas regiões da Europa e Oceania (Desquesnes *et al.*, 2013b) e sua transmissão ocorre primariamente de forma mecânica por insetos hematófagos, especialmente tabanídeos (Spickler, 2009). O controle da infecção é baseado no diagnóstico seguido do tratamento dos animais doentes. Em equinos, o diagnóstico direto pela microscopia é difícil, especialmente durante a infecção crônica ou subclínica, visto que, a parasitemia é baixa e frequentemente intermitente (Nantulya, 1990; Sharma *et al.*, 2012). Nestes casos, exames sorológicos e ensaios moleculares (PCR) são recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (Organização Internacional das Epizootias, OIE) para o diagnóstico da infecção pelo *T. evansi* (OIE, 2015). A soroaglutinação simples, utilizando antígenos do *T. evansi*, tem sido utilizada com sucesso tanto para o diagnóstico, quanto para estudos soro-epidemiológicos em diferentes espécies animais (Laha e Sasmal, 2008; Singla *et al.*, 2015). A soroaglutinação rápida (SAR) é uma metodologia indicada para o diagnóstico de diversas enfermidades de animais (OIE, 2017a; b). Este ensaio permite a triagem de grande número de animais de forma rápida, com baixo custo, podendo ser facilmente introduzido nas rotinas laboratoriais e utilizado nas estratégias de vigilância e controle da infecção pelo *T. evansi* (Hilali *et al.*, 2004; Zayed *et al.*, 2010; Singla *et al.*, 2015). Melhores níveis de especificidade para a SAR podem ser obtidos através do tamponamento ácido do antígeno (~pH 3.65), que diminui a atividade de aglutininas com menor especificidade (IgM) e favorecendo reações baseadas em IgG (Corbel, 1972; Patterson *et al.*, 1976). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar um ensaio de soroaglutinação rápida (SAR/Te) para sorodiagnóstico da infecção por *T. evansi* em equinos naturalmente infectados.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1. Preparação do antígeno de *T. evansi* para SAR/Te

Seis fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram inoculados pela via intraperitoneal com uma cepa de *T. evansi*. Ao atingir a parasitemia de aproximadamente  $10^9$  parasitos.mL<sup>-1</sup>, o sangue total foi coletado e misturado na proporção de 1:1 com Percoll® tamponado com HEPES 1mM, pH 7,4, contendo 8,5% de sacarose e 2,5% de D-glicose e centrifugado durante 25 minutos a 1500 xg a 4°C. A porção leucocitária foi suspensa em 25 volumes de PBS pH 7,4 contendo 1% de glicose (PBSG). *T. evansi* foi separado do sangue por cromatografia de troca aniônica utilizando uma coluna de dietilaminoetil celulose (DEAE) usando tampão de eluição PBSG pH 8,0 conforme (Grab e Bwayo, 1982). Os parasitas eluídos da coluna foram centrifugados 2000 xg durante 15 minutos, ressuspensos em solução de PBS pH 7,3 com 0,2% tripsina por 30 minutos e lavados 3 vezes em PBSG. A concentração do antígeno foi ajustada para  $5 \times 10^7$  parasitos.mL<sup>-1</sup> (0,40 DO com um comprimento de onda de 550 nm) em tampão com 0,2% citrato de sódio, 15% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,00085g.mL<sup>-1</sup> de NaCl, 0,09g.mL<sup>-1</sup> de Ácido láctico, 0,02g.mL<sup>-1</sup> de NaOH e 0,005g.mL<sup>-1</sup> de Fenol. A suspensão de tripanossomas foi sonicada com uma frequência de  $40 \pm 2$  kHz por 3,5 minutos com 15 segundos de intervalo por cinco ciclos. Posteriormente foi filtrada em microfiltro com poros de 0,60µm e usado como antígeno. O antígeno de *T. evansi* para SAR/Te foi estocado a 4°C até o uso.

### 5.2.2. Ensaio de soroaglutinação rápida (SAR/Te)

O ensaio foi realizado utilizando placa de vidro transparente dividida em campos (4x4cm). Em cada campo foram adicionados 30µL de soro e 30µL do antígeno SAR/Te, homogeneizados através de movimentos circulares por 4 minutos e em seguida a presença de aglutinação foi avaliada sobre fonte de luz. Amostras com aglutinação granular foram consideradas positivas e suspensão homogênea negativa. Para validação do ensaio, em cada rotina diária, foram utilizadas amostras controle positivo e negativos (USDA/APHIS, USA). O soro controle padrão positivo foi preparado a partir do soro de equinos com infecção por *T. evansi*, confirmada por PCR e microscopia. O título de corte da SAR/Te foi estimado através da diluição das amostras controle positivas (1:2 - 1:512) em PBS pH 7,3.

### 5.2.3. Coleta das amostras

As amostras de sangue (n=176) foram coletadas de animais com histórico de febre e anemia. 10mL de sangue foram coletados com e sem anticoagulante (EDTA), para a extração de DNA genômico e obtenção de soro, respectivamente. As amostras de soro foram armazenadas -20°C e as amostras de DNA extraído a -80°C.

### 5.2.4. Ensaio baseado na PCR

O DNA das amostras de sangue foi extraído e purificado conforme protocolo do kit de extração (QIAamp DNA Blood Kit - Qiagen®). Um fragmento de DNA de 205pb da região conservada do *T. evansi* foi amplificado através da PCR usando os iniciadores RoTat 1.2 F (5'- GCG.GGG.TGT.TTA.AAG.CAA.TA -3') e RoTat 1.2 R (5' – ATT.AGT.GCT.GCG.TGT.GTT.CG- 3') (CLAES et al., 2004). Como controles negativos foram usadas reações sem DNA ou DNA de amostras negativas e o DNA de cepa padrão de *T. evansi* como controle positivo.

Resumidamente, a amplificação foi realizada em um volume final de 25µL contendo 1mM de cada iniciador, 200µM de dNTPs, 1,0U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 10mM de Tris-HCl pH 8,6, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10ng de DNA da amostra. A amplificação foi realizada em termociclador (BIOCYCLER®) usando uma etapa de desnaturação inicial a 95°C / 5 min, seguido de 29 ciclos a 95°C/1 min, 55°C/30s, 72°C/10s e uma etapa final de extensão de 5 min. 5µL de cada produto de amplificação foram aplicados em um gel de agarose a 2%, com corante de brometo de etídio e visualizado sob iluminação de luz ultravioleta em fotodocumentador digital MiniBIS Pro® BioAmerica Inc.

### 5.2.5. Análise estatística

A sensibilidade e especificidade para SAR/Te foram estimados através da fórmula:  $sensibilidade = TP / (TP + FN) \times 100\%$  e  $especificidade = TN / (TN + FP) \times 100\%$  onde, TN representa verdadeiro negativo, TP verdadeiro positivo, FN falso negativo e FP falso positivo. Os resultados da SAR/Te foram comparados com os resultados obtidos no diagnóstico direto pela PCR. A sensibilidade foi estimada com base nos soros de animais positivos na PCR (n=18). A especificidade foi estimada com base em soros de animais negativos na PCR para *T. evansi*, soros padrão controle negativo (USDA/APHIS, USA). Adicionalmente, foram utilizadas amostras de soro de animais positivos para outros agentes infecciosos, frequentes nos rebanhos de equinos, como *Leptospira interrogans* Sorovar Pomona; *Brucella abortus*; *Neospora*

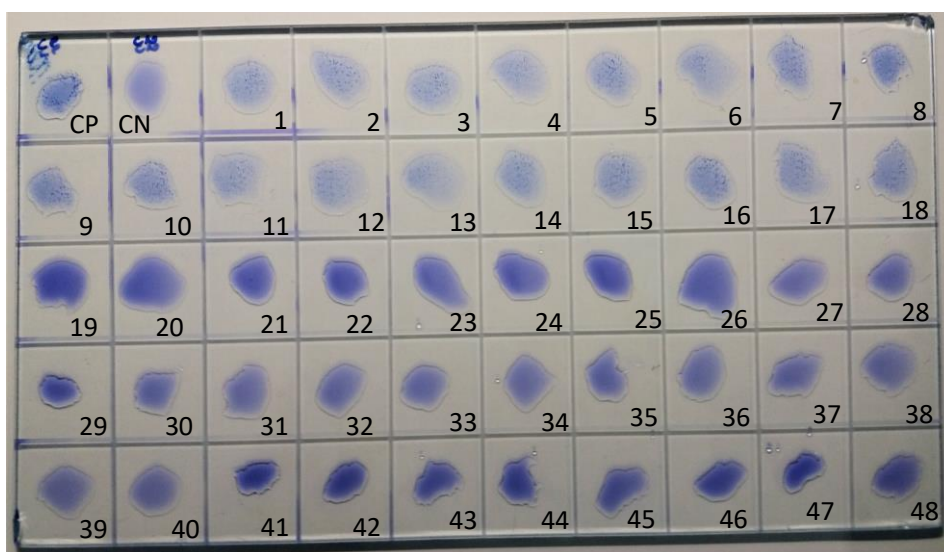
*caninum*; *Toxoplasma gondii*; Vírus da Encefalite viral (EHV-I); Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAv); *Burkholderia mallei*.

O grau de concordância entre os resultados da SAR/Te e PCR (teste padrão) foi estimado através do coeficiente kappa ( $\kappa$ ) com intervalos de confiança de 95%, utilizando Epi Info versão 7. Valores de  $\kappa \leq 0,60$  demonstram baixa concordância,  $0,60 < \kappa < 0,80$  concordância moderada e  $\kappa > 0,80$  ótima concordância (Altman, 1990). A estimativa de  $\kappa$  considerou todas as amostras analisadas.

### 5.3. RESULTADOS

Os resultados da análise para detecção da infecção por *T. evansi*, utilizando SAR/Te e PCR estão apresentados na (Tabela 1). Das 176 amostras de soro equino, 158 amostras de foram negativas e 18 foram positivas utilizando a SAR/Te (**Figura 1**). A sensibilidade estimada do SAR/Te no presente estudo foi 95% (2 resultados falsos negativos) e a especificidade de 99% (1 resultado falso positivo), conferindo ao teste um valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) de 90% e 99%, respectivamente. O título de corte para detecção das amostras positivas foi 128 (intervalo de detecção  $<8$  a 512) (Tabela 2). Observou-se uma concordância de 91,3% entre SAR/Te e PCR, através da análise do coeficiente kappa ( $k$ ) (IC 95%;  $p < 0,01$ ).

**Figura 1** – Ensaio de SAR/Te: CP – controle positivo; CN – controle negativo; 1-18 correspondem as amostras positivas; 19 – 48 amostras negativas.



FONTE: Elaborado pelo autor, 2017.

**Tabela 1** - Análise de sensibilidade e especificidade da SAR/Te considerando a PCR como ensaio padrão.

SAR/Te	PCR		Total (n)
	+(n)	-(n)	
+(n)	18	1	19
-(n)	2	155	157
Total	20	156	176

**Tabela 2** - Análise do título de corte da SAR/Te considerado amostras positivas na PCR (n=20).  
(\*) título de corte (máxima diluição em que foram detectadas amostras positivas).

SAR/Te (n=20)	
Título	+(n)
<8	20
16	20
32	11
64	4
128*	3
256	0
512	0

A SAR/Te mostrou especificidade para a infecção por *T. evansi* no estudo complementar, quando utilizado amostras de soro de equinos positivos para Leptospirose, Brucelose, Neosporose, Toxoplasmose, Herpes vírus equino (EHV-I), Anemia Infecciosa equina e Mormo (Tabela 3).



**Tabela 3** - Estudo complementar da especificidade da SAR/Te utilizando soros padrão positivos e negativos para os principais agentes infecto-parasitários dos rebanhos de equinos brasileiros.

Soro equino controle reagente	Amostras (n)	SAR/Te (reagente n)
<i>Leptospira interrogans</i>	16	0
<i>Brucella abortus</i>	11	0
<i>Neospora caninum</i>	11	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	10	0
Vírus da Encefalite viral (EHV-I)	9	0
Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAv)	8	0
<i>Burkholderia mallei</i>	5	0
Soro controle negativo ( <i>T. evansi</i> ; <i>T. equiperdum</i> ; <i>Toxoplasma gondii</i> ; Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAv); <i>Burkholderia mallei</i> ; <i>Brucella abortus</i> )	6	0

#### 5.4. DISCUSSÃO

A SAR/Te utilizada neste estudo apresentou alto grau de concordância com a PCR ( $k = 91,3\%$ ; IC 95%;  $p < 0.01$ ) em demonstrar a infecção por *T. evansi* em equinos naturalmente infectados. Em equinos, este importante protozoário, causa uma doença debilitante que cursa clinicamente com febre, edema subcutâneo e transtornos locomotores graves (Silva *et al.*, 1995; Rodrigues *et al.*, 2009), onde o diagnóstico rápido é fundamental para o tratamento dos animais doentes e controle a doença (Desquesnes *et al.*, 2013a).

Nossos dados mostram que a SAR/Te provou ser uma ferramenta de sorodiagnóstico promissora que combina simplicidade, rapidez e alta eficiência (sensibilidade 95% e especificidade de 99%). Além disso, possui potencial para ser utilizada em condições de campo em programas de vigilância e controle da infecção por *T. evansi* (VPP = 90% e VPN = 99%) permitindo a triagem de grande quantidade de animais. Antígenos derivados do lisado total de células de *T. evansi* são utilizados com sucesso em estudos soro-epidemiológicos da infecção em diferentes espécies animais e em diferentes países (Hilali *et al.*, 2004; Laha e Sasmal, 2008; Zayed *et al.*, 2010). Adicionalmente, a possibilidade de tamponamento ácido do antígeno (~pH 3.65) aumenta a especificidade do ensaio pois diminui a atividade de aglutininas como IgM e favorece reações baseadas em IgG (Corbel, 1972; Patterson *et al.*, 1976).

Os resultados falsos negativos na SAR/Te (2/20) podem estar associados ao baixo título de anticorpos anti-*T. evansi* na fase aguda da doença ou devido a diferentes níveis de sensibilização do sistema imune. Nestes casos, para o diagnóstico pode-se considerar a presença de parasitemia, sinais clínicos característicos da tripanossomíase e alterações hematológicas. No caso de infecção subclínica, a sorologia pareada 20-30 dias após o primeiro exame também poderia ser utilizada de forma complementar para o diagnóstico da infecção.

Mutações periódicas em glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs), comum nos tripanosomas, podem levar a diminuição no título de anticorpos frente um antígeno variável (VAT) em particular, entretanto, não significa diminuição no título de anticorpos contra todos os demais antígenos do *T. evansi* (Jones e McKinnell, 1985; Hilali *et al.*, 2004), mantendo possivelmente os padrões de resposta sorológica frente aos derivados do lisado total.

Os exames parasitológicos baseados na análise microscópica de esfregaços sanguíneos ou a detecção de antígenos do *T. evansi* (ex. Ag-ELISA) são recomendados apenas para o diagnóstico da doença aguda, quando a parasitemia é intensa (Nantulya, 1990; Sharma *et al.*, 2012). Em contrapartida, testes sorológicos permitem a detecção de anticorpos circulantes anti-*T. evansi* e a identificação do contato dos animais com parasito (Laha e Sasmal, 2008; Zayed *et al.*, 2010). Ensaio como CATT (Bajyana Songa e Hamers, 1988) ou CATT/*T. evansi* (Hilali *et al.*, 2004; Zayed *et al.*, 2010; Singla *et al.*, 2015), permitem o diagnóstico da infecção subclínica ou crônica, inclusive quando a parasitemia é baixa ou intermitente. Isso porque anticorpos anti-*Trypanosoma* spp. são detectados em geral 4-8 dias após a infecção e podem persistir por longo período mesmo após a cura ou eliminação do parasito ou antígenos da circulação sanguínea (Hilali *et al.*, 2004; Aquino *et al.*, 2010).

A PCR é uma técnica diagnóstica sensível e específica, recomendada para diagnóstico precoce da infecção pelo *T. evansi*, tanto na fase aguda (com baixa ou ausente produção de anticorpos) como fase crônica ou mesmo durante o período sub-patente da infecção (Laha e Sasmal, 2008; Singla *et al.*, 2015), permitindo avaliar a eficiência de protocolos de tratamento ou diferenciar indivíduos curados de infectados. Entretanto, é um método laborioso, demorado e de alto custo quando comparado com a SAR (Singla *et al.*, 2015).

## 5.5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a SAR/Te possui potencial para ser utilizada no sorodiagnóstico da infecção pelo *T. evansi* no Brasil. Além disso, devido a simplicidade, especificidades e sensibilidade pode ser utilizada na triagem de animais suspeitos. A limitação em demonstrar o parasito ou seus antígenos pode ser superada pela utilização de uma ou mais técnicas complementares, como pesquisa direta em esfregaço sanguíneo ou testes moleculares (PCR).

## 5.6. REFERÊNCIAS

ALTMAN, D. G. **Practical Statistics for Medical Research**. Chapman and Hall/CRC, 1990.

AQUINO, L. P. et al. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 2, p. 112-8, Apr-Jun 2010. ISSN 0103-846X (Print) 0103-846X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20624349](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20624349) >.

BAJYANA SONGA, E.; HAMERS, R. A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1/2 of *Trypanosoma evansi*. **Ann Soc Belg Med Trop**, v. 68, n. 3, p. 233-40, Sep 1988. ISSN 0772-4128 (Print) 0772-4128 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3223785> >.

CORBEL, M. J. Identification of the immunoglobulin class active in the Rose Bengal plate test for bovine brucellosis. **J Hyg (Lond)**, v. 70, n. 4, p. 779-95, Dec 1972. ISSN 0022-1724 (Print) (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4630606> >.

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 321237, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24151595> >.

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 194176, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024184> >.

GRAB, D. J.; BWAYO, J. J. Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients formed in situ. **Acta Trop**, v. 39, n. 4, p. 363-6, Dec 1982. ISSN 0001-706X (Print) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6131595> >.

HILALI, M. et al. Evaluation of the card agglutination test (CATT/T. evansi) for detection of *Trypanosoma evansi* infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. **Vet Parasitol**, v. 121, n. 1-2, p. 45-51, May 07 2004. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15110402> >.

JONES, T. W.; MCKINNELL, C. D. Antigenic variation in *Trypanosoma evansi*: variable antigen type development in mice, sheep and goats. **Trop Med Parasitol**, v. 36, n. 1, p. 53-7, Mar 1985. ISSN 0177-2392 (Print) 0177-2392 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4001768> >.

LAHA, R.; SASMAL, N. K. Characterization of immunogenic proteins of *Trypanosoma evansi* isolated from three different Indian hosts using hyperimmune sera and immune sera. **Res Vet Sci**, v. 85, n. 3, p. 534-9, Dec 2008. ISSN 0034-5288 (Print) 0034-5288 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18371998> >.

LUN, Z. R. et al. Trypanosomiasis of domestic animals in China. **Parasitol Today**, v. 9, n. 2, p. 41-5, Feb 1993. ISSN 0169-4758 (Print) 0169-4758 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463701> >.

NANTULYA, V. M. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. **Rev Sci Tech**, v. 9, n. 2, p. 357-67, Jun 1990. ISSN 0253-1933 (Print) 0253-1933 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2132685> >.

OIE, W. O. F. A. H. *Trypanosoma evansi* infection (surra). In: (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**: World Organization for Animal Health OIE, 2015. cap. 2.1.17.,

\_\_\_\_\_. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). In: (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals** World Organization for Animal Health OIE, 2017a. cap. 2.3.5.,

\_\_\_\_\_. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis* ). In: (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals** World Organization for Animal Health OIE, 2017b. p.500.

PATTERSON, J. M.; DEYOE, B. L.; STONE, S. S. Identification of immunoglobulins associated with complement fixation, agglutination, and low pH buffered antigen tests for brucellosis. **Am J Vet Res**, v. 37, n. 3, p. 319-24, Mar 1976. ISSN 0002-9645 (Print) 0002-9645 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3997> >.

RODRIGUES, A. et al. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. **Vet Pathol**, v. 46, n. 2, p. 251-8, Mar 2009. ISSN 0300-9858 (Print) 0300-9858 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261636> >.

SHARMA, P. et al. Comparative evaluation of real time PCR assay with conventional parasitological techniques for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in cattle and buffaloes. **Vet Parasitol**, v. 190, n. 3-4, p. 375-82, Dec 21 2012. ISSN 1873-2550 (Electronic) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22858228> >.

SILVA, R. A. et al. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 60, n. 1-2, p. 167-71, Nov 1995. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8644453> >.

SINGLA, L. D. et al. Comparative evaluation of agglutination assay with microscopy and polymerase chain reaction for detection of *Trypanosoma evansi* in bovines of Punjab. **Indian Journal of Animal Sciences** v. 85, n. 11, p. 1164–1166, 2015.

SPICKLER, A. R. **Surra (Last Updated)** 2009.

ZAYED, A. A. et al. A critical comparative study of parasitological and serological differential diagnostic methods of *Trypanosoma evansi* infections in some farm animals in Egypt. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science**, v. 8, n. 6, p. 633-642 2010.

## 6. CAPÍTULO II - MANUSCRITO II

### PRIMEIRO SURTO AUTÓCTONE DE SURRA EM EQUINOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL: ASPECTOS PARASITOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS.

*First outbreak of autochthonous Surra in horses in Santa Catarina State, Brazil: parasitological, hematological and biochemical aspects.*

**Carolina Reck<sup>1</sup>; Álvaro Menin<sup>2</sup>; Luiz Cláudio Mileti<sup>1\*</sup>; Colaboradores .**

<sup>1</sup> Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC). Av. Luís de Camões, 2090, Lages, SC, Brasil.

\*Autor para correspondência: luiz.miletti@ udesc.br.

#### RESUMO

A surra é uma doença infecciosa causada pelo *Trypanosoma evansi*, que gera grandes perdas para os proprietários de equinos devido a morte de animais e altos custos do tratamento. O presente estudo reporta o primeiro surto autóctone de surra em equinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. Em março/abril de 2017, em um haras com 30 equinos, seis apresentaram sinais clínicos como edema de membros e garupa, anemia, emagrecimento progressivo, atrofia muscular claudicação e dificuldade de locomoção. Amostras de sangue foram coletadas para a realização de exames hematológicos, bioquímicos e PCR específica para *T. evansi* durante o surto (T<sub>0</sub>) e 90 dias após o início do tratamento (T<sub>1</sub>). A infecção por *T. evansi* foi confirmada pela PCR em seis animais com sinais clínicos sugestivos de surra. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos (T<sub>0</sub>) mostram diminuição do hematócrito, diminuição da hemoglobina, eritropenia e trombocitopenia e elevação dos níveis séricos de bilirrubina (aumento de ~13 vezes), ALT (~10 vezes), CK, glicose, LDH, creatinina. Os animais com sinais clínicos foram tratados com aceturato de diminazeno, fenazona e terapia suporte. A efetividade do tratamento foi constatada (T<sub>1</sub>) pela recuperação clínica dos animais, normalização dos parâmetros hematobioquímicos e resultado negativo na PCR e exame de microscopia direto para *T. evansi* 90 dias após o tratamento. Assim, este trabalho confirma o primeiro surto de surra em equinos no estado de Santa Catarina, Brasil, e apresenta aspectos clínicos e hematobioquímicos dos animais doentes. Além disso, alerta para a necessidade de medidas específicas de vigilância ativa e inclusão da tripanossomíase nas rotinas de diagnóstico diferencial.

**Palavras chave:** Tripanossomoses, diagnóstico, surra, hematoprototozoários.

## 6.1. INTRODUÇÃO

A surra, também conhecida em algumas regiões da América Latina como “mal das cadeiras”, é uma doença infecciosa causada pelo *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), um hematoprotozoário flagelado que acomete várias espécies de animais domésticos e silvestres (Desquesnes, Holzmuller, *et al.*, 2013). Apesar de potencial zoonótico, são poucos os relatos da infecção por *T. evansi* em humanos (Joshi *et al.*, 2005).

A surra está amplamente distribuída na África, Ásia, América Latina, em algumas regiões da Europa e Oceania (Desquesnes, Dargantes, *et al.*, 2013). A transmissão ocorre de forma mecânica por insetos hematófagos, especialmente das famílias *Tabanidae*, *Culicidae*, subfamília *Stomoxydinae* (Spickler, 2009; Desquesnes, Holzmuller, *et al.*, 2013). No Brasil, a prevalência da infecção pelo *T. evansi* é variável dependendo do hospedeiro e região, já descrita em cães, capivaras, quatis, bovinos, búfalos, marsupiais e tatus (Nunes, 1993; Herrera *et al.*, 2004). A doença é considerada enzoótica apenas em equinos no Pantanal mato-grossense (Nunes, 1993; Desquesnes, 2004; Herrera *et al.*, 2004), causando grandes perdas associadas a morte de animais e aos altos custos do tratamento. No Estado de Santa Catarina, apenas um único caso da infecção foi descrito em bovinos (Silva *et al.*, 2007).

Em equinos, a infecção pelo *T. evansi* apresenta um período pré-patente de 4-21 dias (Monzon *et al.*, 1984; Marques *et al.*, 2000) e o curso da doença varia de uma semana a seis meses (Monzon *et al.*, 1984). Clinicamente, os animais apresentam febre, icterícia, apatia, anemia, aumento de linfonodos, palidez de mucosas, erupções cutâneas, perda de peso grave, distúrbios locomotores, sinais nervosos e edema subcutâneo, considerado um sinal clássico da infecção (Monzon *et al.*, 1984; Silva *et al.*, 1995; Rodrigues *et al.*, 2009). As principais alterações hematobioquímicas observadas em equinos são anemia, hemoglobinemia (Marques *et al.*, 2000; Sumbria *et al.*, 2014), hipoglicemia, bilirubinemia (Sumbria *et al.*, 2014) e aumento sérico das enzimas ALT, AST, CPK (Pandey *et al.*, 2015).

O controle da surra é baseado no diagnóstico precoce da infecção seguido do tratamento imediato dos animais doentes, visto que, as drogas tripanocidas são pouco eficientes e a mortalidade de equinos é alta (Rodrigues, 2005). Neste contexto, conhecer a interação patógeno/hospedeiro e a dinâmica de circulação do agente é fundamental para estabelecer estratégias racionais de vigilância, controle da infecção e inclusão da doença nas rotinas diagnósticas. Assim, o presente estudo foi conduzido para investigar aspectos clínicos, parasitológicos, hematológicos e bioquímicos de equinos infectados no primeiro caso autóctone de surra no Estado de Santa Catarina, Brasil.

## 6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1. Amostras e diagnóstico positivo

Em março/abril de 2017, seis equinos da raça Quarto de Milha, fêmeas, com ótimo score corporal e idade média de 2,8 anos (2-4 anos), passaram a apresentar sinais clínicos sugestivos da doença em uma propriedade, com rebanho total de 30 equinos, localizado em Estado de Santa Catarina. A propriedade caracteriza-se por venda de potros, com trânsito limitado de animais.

O estado clínico dos animais foi classificado com base na intensidade e padrão dos sinais clínicos conforme os seguintes critérios:

- ❖ *Assintomáticos (AS)*: ausência de sinais clínicos sugestivos de infecção.
- ❖ *Oligossintomáticos (OS)*: apresentando até três sinais clínicos sugestivos de infecção, incluindo combinações de apatia; febre intermitente, fraqueza, perda de peso, porém sem a presença de edema subcutâneo;
- ❖ *Sintomáticos clássicos (SS)*: apresentando sinais clínicos característicos de surra, incluindo febre, dispnéia, edema subcutâneo; perda progressiva de peso, erupções cutâneas, distúrbios locomotores e hemorragias petequeais.

Os animais suspeitos da infecção foram submetidos aos exames hematológicos, bioquímicos e molecular, baseado na reação em cadeia pela polimerase (PCR), para a confirmação da infecção.

### 6.2.2. Avaliação hematológica e bioquímica dos animais

Os animais com suspeita clínica foram submetidos à coleta de sangue através de venopunção de 10mL de sangue de cada animal foi coletado em tubos com e sem anticoagulante (EDTA), para a realização dos ensaios hematológicos, bioquímicos, sorológicos, exame microscópico direto e detecção do agente pela PCR. As coletas foram realizadas em duas etapas no início da infecção, por ocasião do diagnóstico clínico ( $T_0$ ) e 90 dias após o diagnóstico ( $T_1$ ), para avaliar a progressão da doença e o tratamento dos animais.

Na análise hematológica foram avaliados os parâmetros: eritrograma, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina (Hb), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de plaquetas e realizado leucograma diferencial. O procedimento foi realizado em equipamento hematológico veterinário automatizado (Sysmex pocH-100iV™), associado a análise diferencial no esfregaço sanguíneo corado com coloração de Romanowsky.



Quanto às alterações no hematócrito, os animais foram classificados em: normal, sem alterações (hematócrito de 32-53 %), alteração leve (hematócrito de 27 - 31 %), alteração moderada (hematócrito de 17 - 27 %) e alteração grave (hematócrito < 17 %) (Thrall *et al.*, 2012).

Paralelamente, dois esfregaços de sangue para cada amostra foram preparados e fixados com metanol, corados com romanowsky e examinados para detecção do hemoprotozoário sob microscopia de luz, usando uma objetiva de 100X.

Na análise dos parâmetros bioquímicos séricos foram avaliados: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteína total, lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina (FA), creatinina, ureia, creatinina fosfoquinase (CPK), gamaglutamiltransferase (GGT), bilirrubina total e glicose. Os achados hematobioquímicos foram interpretados conforme (Thrall *et al.*, 2012).

### 6.2.3. Detecção do *T. evansi* pela PCR

A extração de DNA, a partir do sangue total com EDTA, foi realizada utilizando o método padrão de fenol / clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Após a precipitação com etanol, o DNA foi ressuspenso em 50uL de água ultra pura e incubado com RNase A (10 mg / ml) a 37°C durante 1hora e armazenado a -20°C.

Um fragmento de DNA de 205pb da região conservada do *T. evansi* foi amplificado através da PCR usando os iniciadores RoTat 1.2 F5'-GCGGGGTGTTTAAAGCAATA-3 e RoTat 1.2 R 5' – ATTAGTGCTGCGTGTGTTTCG- 3', conforme (CLAES *et al.*, 2004). Como controles negativos foram usadas reações sem DNA ou DNA de amostras negativas e o DNA de cepa padrão de *T. evansi* como controle positivo.

A amplificação foi realizada em um volume final de 25µL contendo 1mM de cada iniciador, 200µM de dNTPs, 1,0U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 10mM de Tris-HCl pH 8,6, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10ng de DNA da amostra. A amplificação foi realizada em termociclador (BIOCYCLER®) usando uma etapa de desnaturação inicial a 95°C / 5 min, seguido de 29 ciclos a 95°C/1 min, 59°C/30s, 72°C/10s e uma etapa final de extensão de 5 min. 5µL de cada produto de amplificação foram aplicados em um gel de agarose a 2%, com corante de brometo de etídio e visualizado sob iluminação de luz ultravioleta em fotodocumentador digital MiniBIS Pro® BioAmerica Inc.

#### 6.2.4. Ensaio de soroaglutinação rápida (SAR/Te)

O ensaio foi realizado utilizando placa de vidro transparente dividida em campos (4x4cm). Em cada campo foram adicionados 30µL de soro e 30µL do antígeno SAR/Te, homogeneizados através de movimentos circulares por 4 minutos e em seguida a presença de aglutinação foi avaliada sobre fonte de luz. Amostras com aglutinação granular foram consideradas positivas e suspensão homogênea negativa. Para validação do ensaio, em cada rotina, foram utilizadas amostras controle positivos e negativos. O soro controle padrão positivo foi preparado a partir de soro equinos com infecção por *T. evansi*, confirmada por PCR e microscopia.

### 6.3. RESULTADOS

Neste trabalho nós relatamos primeiro surto autóctone de surra em equinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. Seis equinos com sinais clínicos sugestivos de surra foram positivos na PCR para a infecção por *T. evansi*. Estes animais foram estudados e os resultados são apresentados neste trabalho.

O exame clínico no T<sub>0</sub> mostrou na maioria dos animais febre intermitente (40- 42 °C), mucosas inicialmente normocoradas e aumento da frequência respiratória (50 movimentos por minuto). Com a progressão do quadro os animais passaram a apresentar anemia, emagrecimento progressivo, edema subcutâneo nos flancos, garupa e membros pélvicos, instabilidade dos membros pélvicos, dificuldade para levantar, fraqueza muscular, palidez das mucosas e erupções cutâneas (**Figura 1**). Durante todo o curso da doença os animais apresentavam apetite normal.

**Figura 1** - Sinais clínicos observados no primeiro surto de Surra em equinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. (A) edema grave na região posterior e membro pélvico no T<sub>0</sub>. (B) emagrecimento e erosões de pele observados no T<sub>1</sub>.



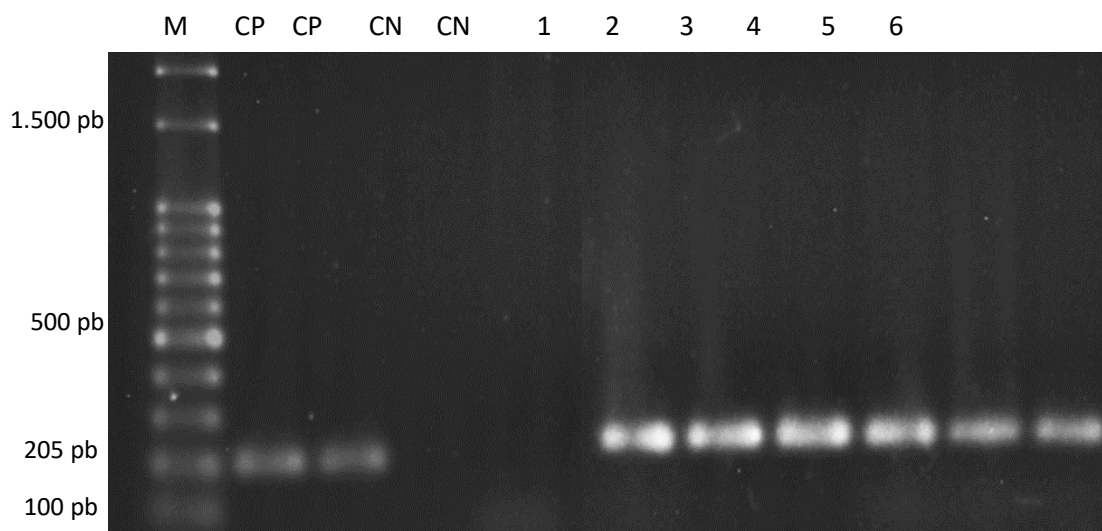
FONTE: Elaborado pelo autor, 2017.

No T<sub>1</sub>, 90 dias após o diagnóstico clínico, dois animais ainda apresentavam emagrecimento, erosões cutâneas e leve dificuldade de locomoção, em fase de recuperação.

Alguns aspectos clínicos, parasitológicos e análise do hematócrito estão apresentados (**Tabela 1 e 2**). Nossos dados mostram animais em T<sub>0</sub> oligossintomáticos ou com sinais clínicos clássicos, alterações no hematócrito e positivos na PCR para *T. evansi* (**Figura 2**), enquanto em T<sub>1</sub> observa-se apenas dois animais oligossintomáticos e todos os animais negativos para *T. evansi* na PCR e com hematócrito normal.

**Figura 2** - PCR para *T. evansi*: Gel de agarose a 2 % corado com brometo de etídio;

M – marcador de massa molecular 100pb; CP controle positivo amplificando 205 pb.; CN controle negativo; amostras de sangue equinos 1 -6.



FONTE: Elaborado pelo autor, 2017.

No início da infecção ( $T_0$ ), as principais alterações hematológicas observadas (**Tabela 2**) foram diminuição do hematócrito ( $30,7\% \pm 7,5$ ), diminuição da hemoglobina ( $10,54 \text{ g/dL} \pm 2,5$ ), eritropenia ( $7,6 \times 10^6/\mu\text{L} \pm 2,3$ ) e trombocitopenia ( $79,6 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 79,6$ ). Entretanto, o volume corpuscular médio (VCM) ( $41,28 \text{ fL} \pm 3,4$ ) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) permaneceram normais; ( $34,6\% \pm 0,9$ ). Um quadro de leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda foi observado em três animais.

Maiores alterações bioquímicas séricas também foram observadas no  $T_0$ , como bilirrubinemia (aumento de ~13 vezes), aumento na ALT (~10 vezes), CK (~8 vezes), glicose (~5 vezes), LDH (~4 vezes) e Creatinina (~3 vezes). Outros parâmetros como AST (~1,5 vezes) e FA (~1,2 vezes), também apresentaram aumento.

**Tabela 1** - Aspectos clínicos, hematológicos e diagnósticos dos casos do primeiro surto de surra em equinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. São mostrados os padrões clínicos, do hematócrito e PCR para *T. evansi* das diferentes amostras.

Equino	Sexo	Raça	Momento da avaliação					
			T <sub>0</sub>			T <sub>1</sub>		
			Grupo clínico	PCR	Hematócrito	Grupo clínico	PCR	Hematócrito
1	Fêmea	Quarto de Milha	Oligossintomáticos	(+)	Normal	Oligossintomáticos	(-)	Normal
2	Fêmea	Quarto de Milha	Oligossintomáticos	(+)	Alteração leve	Assintomáticos	(-)	Normal
3	Fêmea	Quarto de Milha	Oligossintomáticos	(+)	Alteração moderada	Assintomáticos	(-)	Normal
4	Fêmea	Quarto de Milha	Sintomáticos clássicos	(+)	Alteração leve	Assintomáticos	(-)	Normal
5	Fêmea	Quarto de Milha	Sintomáticos clássicos	(+)	Alteração moderada	Assintomáticos	(-)	Normal
6	Fêmea	Quarto de Milha	Sintomáticos clássicos	(+)	Alteração leve	Oligossintomáticos	(-)	Normal

**Tabela 2** – Parâmetros hematobioquímicos observados no primeiro surto de surra em equinos no Estado de Santa Catarina, Brasil. São mostrados os valores médios e desvio padrão (DP) em dois momentos (T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>). Os valores de referência também são apresentados.

INDICADORES HEMATOBIOQUÍMICOS	VALORES DE REFERÊNCIA	T <sub>0</sub>		T <sub>1</sub>	
		MÉDIA	±DP	MÉDIA	±DP
Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /μL)	8,4-12,6	7,6	2,3	8,0	1,1
Hemoglobina (g/dL)	12,8-16,7	10,5	2,5	11,1	0,9
VG (%)	33,0-50,0	30,7	7,5	33,8	2,7
HGM (pg)	13,2-15,5	14,4	1,6	13,9	1,1
VGM (fL)	37,0-58,0	41,3	3,4	42,3	2,7
CHGM (%)	31,0-36,0	34,6	0,9	32,8	1,1
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	100 - 300	93,6	79,6	162,0	41,1
Leucócitos totais (n)	6.000-11.500	12.080	1.974,10	8.820	1094,1
ALT (UI/L)	3,0 a 23,3	228,9	321,1	16,5	3,7
AST (UI/L)	226 a 366	497,7	217,3	355,4	22,2
CK (UI/L)	130 a 470	3.720,5	4.715,6	435,7	142,3
LDH (UI/L)	162-412	1.639,7	2.075,1	318,8	57,2
FA (UI/L)	90 a 290	328,8	149,4	281,2	75,0
GGT (UI/L)	7,0 a 17	10,5	1,5	35,5	5,7
Proteína Total (g/dL)	5,8 a 7,6	6,4	0,7	6,2	0,6
Creatinina (mg/dL)	1,1 a 2,0	6,4	2,4	1,7	0,3
Uréia (mg/dL)	14 a 27	24,0	6,0	38,8	5,1
Bilirrubina (mg/dL)	0,1 a 2,0	25,9	24,2	1,7	0,2
Glicose (mg/dL)	70 a 140	14,5	7,8	111,6	26,5

Os animais foram tratados com quimioterápicos à base de aceturato de diminazeno e fenazona. Foram utilizadas duas doses com intervalo de três dias. Como tratamento de suporte foram utilizados medicamentos hepatoprotetores, imunoestimulantes, fluidoterapia, suplementos minerais e poli vitamínicos. Terapias alternativas baseadas em acupuntura e banhos de compressa também foram utilizadas para a recuperação dos animais.

Em T<sub>1</sub> todos os animais apresentaram parâmetros hematológicos e bioquímicos normais, PCR e pesquisa parasitológica direta em esfregaço sanguíneo negativos. Entretanto todos os animais ainda foram positivos na soroaglutinação rápida para *T. evansi*. Em conjunto, estas evidências mostram que o tratamento dos animais foi efetivo para eliminação do agente na corrente sanguínea.

#### 6.4. DISCUSSÃO

O clima da região é classificado como mesotérmico úmido, com temperatura média anual de 18-24 °C (variação de 6-36°C) e precipitação de aproximadamente 1.400 milímetros e 300m de altitude. Com solo argiloso a argilo-arenoso, a região possui muitos depósitos naturais e artificiais de água, muitos dos quais voltados a rizicultura irrigada, presença de áreas de reflorestamento e mata nativa (Fraga, 2003). Em conjunto, estas características parecem constituir um ecossistema favorável para animais de vida silvestre (como pequenos roedores, capivaras, morcegos) e insetos hematófagos (Ex. Tabanídeos), possíveis reservatórios e vetores, para *T. evansi* (Nunes, 1993; Herrera *et al.*, 2004).

A infecção pelo *T. evansi* é mais frequente em países tropicais e subtropicais da África, Ásia e América Latina, algumas regiões da Europa e Oceania (Desquesnes *et al.*, 2013b). A prevalência varia de acordo com a região, hospedeiro (Spickler, 2009; Desquesnes *et al.*, 2013b). Alguns estudos mostram uma prevalência da infecção pelo *T. evansi* de 1-9% em equinos em Punjab, Índia (Sumbria *et al.*, 2014), 2,1% em camelos no Iran e 2,3% na Etiopia (Olani *et al.*, 2016) e 42% em bovinos no Egito (Fereig *et al.*, 2017). No Brasil, a infecção é considerada enzoótica na região do Pantanal Mato-grossense (Silva *et al.*, 1995) com uma prevalência de 34,9% em equinos, 8,8% em bovinos, 41,9% em búfalos, 9,8% em cães e 29,2% em capivaras (Herrera *et al.*, 2004). Na região sul do país a doença foi relatada em equinos (Conrado, 2005), ovinos e caninos (Colpo *et al.*, 2005) do Rio Grande do Sul. Em Santa Catarina, um caso da tripanossomíase foi descrito em 2007, em bovinos leiteiros da região meio

oeste do estado (Silva *et al.*, 2007). Agora, com este trabalho medidas de vigilância e controle também devem ser voltadas para o rebanho de equinos.

No exame clínico (T<sub>0</sub>) três equinos foram oligossintomáticas e três sintomáticos clássicos, com sinais clínicos característicos de surra, incluindo febre, dispneia, edema subcutâneo, perda de peso, erupções cutâneas, distúrbios locomotores e hemorragias petequiais. Segundo (Silva *et al.*, 1995; Rodrigues *et al.*, 2009), os equinos são muito suscetíveis à infecção pelo *T. evansi* e frequentemente apresentam a forma clínica clássica da doença. Além disso, em áreas endêmicas, os animais desenvolvem uma forma aguda grave da doença com alta taxa de mortalidade, quando comparado com áreas não endêmicas, onde é mais frequente a forma crônica, subclínica ou até mesmo assintomática (Desquesnes, *et al.*, 2013b).

No exame hematológico em T<sub>0</sub>, as principais alterações observadas foram anemia, leucocitose e trombocitopenia, semelhante ao descrito por (Herrera *et al.*, 2004; Sumbria *et al.*, 2014). Outras alterações como redução na concentração de hemoglobina e volume globular também podem ocorrer durante a infecção pelo *T. evansi* (Marques *et al.*, 2000).

Dos seis animais avaliados, cinco apresentaram anemia normocítica normocrômica, um achado frequentemente presente nos quadros clássicos de surra conforme descrito por (Rodrigues *et al.*, 2009). A anemia na infecção por *T. evansi* pode assumir diferentes padrões dependendo da espécie animal e mecanismo envolvido como a ação direta dos protozoários sobre os eritrócitos (Aquino *et al.*, 1999; Rue *et al.*, 2000) e a atividade da sialidase que aumenta a eritrofagocitose (Pandey *et al.*, 2015).

Dois animais (2/6) apresentaram trombocitopenia ( $\sim 19\text{-}34 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) e anemia grave, achados frequentes em animais infectados por *T. evansi*, possivelmente associado aos danos vasculares (Marques *et al.*, 2000; Ranjithkumar *et al.*, 2011; Sumbria *et al.*, 2014).

Leucocitose foi observada em apenas três (3/6) equinos no T<sub>0</sub>. Apesar de ser um achado frequente (Herrera *et al.*, 2004; Sumbria *et al.*, 2014) alguns animais podem apresentar valores normais do leucograma (Marques *et al.*, 2000; Omer *et al.*, 2007). Como leucocitose é resultado do aumento da atividade fagocítica durante a tripanossomíase (Hamedani *et al.*, 2014; Sivajothi *et al.*, 2015), diferenças podem estar associadas a fase da infecção ou parasitemia, visto que, leucocitose ocorre na fase aguda, com maior parasitemia e a leucopenia na fase crônica da infecção (Onah *et al.*, 1996; Sivajothi *et al.*, 2015).

No exame bioquímico sérico dos equinos infectados em T<sub>0</sub>, foram observados valores elevados para ALT (10 vezes acima do limite superior), AST (1,5 vezes acima do limite superior) e bilirrubina total (13 vezes acima do limite superior), indicando um quadro de

degeneração de hepatócitos e necrose muscular (Onah *et al.*, 1996; Hamedani *et al.*, 2014; Sivajothi *et al.*, 2015) e/ou um quadro de miosite, miocardite, *T. evansi* (Sivajothi *et al.*, 2015).

A dosagem de CK, LDH permite avaliar o dano muscular (Thrall *et al.*, 2012). Dois animais apresentaram níveis de CK e LDH, 20 vezes acima dos valores de referência, estes animais foram classificados como *sintomáticos clássicos*, sugerindo neste caso, grave dano no tecido muscular. Elevados níveis de CK (~8 vezes acima do valor de referência) foram observados durante um quadro de surra em camelos (El-Deeb e Elmoslemany, 2015).

A lesão renal, frequentemente encontrada durante a infecção por *T. evansi* (Mbaya *et al.*, 2014; Sivajothi *et al.*, 2015) foi evidenciada em quatro animais em T<sub>0</sub>, pelo aumento no nível sérico de creatinina. O aumento da creatinina pode ser reflexo da azotemia, oriunda de fatores pré-renais como desidratação, danos musculares, hepáticos e consequentemente lesão renal (Thrall *et al.*, 2012).

A hipoglicemia observada em quatro animais no T<sub>0</sub>, está associada ao aumento da taxa metabólica devido a febre e consumo de glicose pelo *T. evansi* (Monzon e Villavicencio, 1990; Habila *et al.*, 2012).

Como não existem modelos vacinais eficientes até o momento (Oie, 2015), o controle da surra é baseado no diagnóstico seguido do tratamento dos animais doentes e controle dos vetores. O exame molecular utilizado neste estudo, é uma técnica diagnóstica sensível e específica, recomendada para diagnóstico precoce da infecção pelo *T. evansi*, tanto na fase aguda como na fase crônica ou mesmo durante o período sub-patente da infecção (Laha e Sasmal, 2008; Oie, 2015; Singla *et al.*, 2015).

A regressão dos sinais clínicos e normalização dos parâmetros hematobioquímicos e PCR + exame microscópico direto negativos em T<sub>1</sub> (**Tabela 1 e 2**), indicam que o tratamento com aceturato de diminazeno e fenazona, um quimioterápicos muito utilizado para o tratamento da tripanossomíase (Brun *et al.*, 1998) foi eficiente. A presença de poucas erosões de pele e leve dificuldade de andar em dois animais, sugere uma recuperação mais lenta, mas progressiva, possivelmente associada a uma doença clínica mais grave (sintomático clássico). A positividade na SAR/Te em T<sub>1</sub>, indica a presença de anticorpos circulantes nos equinos, mesmo após o tratamento e eliminação do agente da circulação sanguínea. Os títulos de anticorpos podem se manter elevados e detectáveis por longos períodos após a infecção (Monzon, 1993).

Está bem estabelecido que reservatórios desempenham um papel central na manutenção e expansão da infecção pelo *T. evansi*, entretanto a transmissão depende de várias características ecológicas e epidemiológicas, especialmente na presença de espécies de vetores competentes e hospedeiros mamíferos suscetíveis.



## 6.5. CONCLUSÃO

Este trabalho confirma o primeiro surto autóctone de surra em equinos no estado de Santa Catarina, Brasil e apresenta aspectos clínicos, hematológicos e bioquímicos dos animais que apresentaram a doença clínica. Além disso, alerta para a necessidade de medidas específicas de vigilância ativa para surra nos rebanhos de equinos de Santa Catarina bem como a inclusão da tripanossomíase nas rotinas de diagnóstico diferencial.

## 6.6. REFERÊNCIAS

AQUINO, L. P. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 255-60, Mar-Apr 1999. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10224539](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10224539) >.

BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z. R. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Vet Parasitol**, v. 79, n. 2, p. 95-107, Oct 1998. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9806490](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9806490) >.

COLPO, C. B. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, 2005.

CONRADO, A., LOPES, STA, OLIVEIRA, LSS, MONTEIRO, SG, VARGAS, DLB, BUENO, A. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região Central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 938-941, 2005.

DESQUESNES, M. **Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America**. HEALTH, W. O. F. A.: 174 p. 2004.

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 321237, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24151595> >.

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 194176, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024184> >.

EL-DEEB, W. M.; ELMOSLEMANY, A. M. Cardiac and oxidative stress biomarkers in *Trypanosoma evansi* infected camels: diagnostic and prognostic prominence. **Parasitology**, v. 142, n. 6, p. 767-72, May 2015. ISSN 1469-8161 (Electronic) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25578857> >.

FEREIG, R. M. et al. Seroprevalence of *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Trypanosoma evansi*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle in southern Egypt. **Ticks Tick Borne Dis**, v. 8, n. 1, p. 125-131, Jan 2017. ISSN 1877-9603 (Electronic) 1877-959X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27789159> >.

FRAGA, N. C. Clima, gestão do território e enchentes no Vale do Itajaí-SC. **Terra Livre**, v. 1, n. 20, p. 159-170, 2003. Disponível em: < <http://www.agb.org.br/publicacoes/index.php/terralivre/article/viewFile/181/165> >.

HABILA, N. et al. Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections. **Res Vet Sci**, v. 93, n. 1, p. 13-7, Aug 2012. ISSN 1532-2661 (Electronic) 0034-5288 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940025> >.

HAMEDANI, M. A.; GHAZVINIAN, K.; DARVISHI, M. M. Hematological and serum biochemical aspects associated with a camel (*Camelus dromedarius*) naturally infected by *Trypanosoma evansi* with severe parasitemia in Semnan, Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 743-745, 2014.

HERRERA, H. M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 125, n. 3-4, p. 263-75, Nov 10 2004. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15482883> >.

JOSHI, P. P. et al. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 3, p. 491-5, Sep 2005. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16172469> >.

LAHA, R.; SASMAL, N. K. Characterization of immunogenic proteins of *Trypanosoma evansi* isolated from three different Indian hosts using hyperimmune sera and immune sera. **Res Vet Sci**, v. 85, n. 3, p. 534-9, Dec 2008. ISSN 0034-5288 (Print) 0034-5288 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18371998> >.

MARQUES, L. C. et al. Experimental Infection with *Trypanosoma evansi* in horse: clinical and haematological observations. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 9, n. 1, p. 11-15, 2000.

MBAYA, A. W.; KUMSHE, H. A.; DILLI, H. K. Serum biochemical changes in dromedaries experimentally infected with *Trypanosoma evansi* and treated with melarsenoxide cysteamine hydrochloride. **VETERINARSKI ARHIV**, v. 84, n. 4, p. 377-385, 2014.

MONZON, C. M. Serological diagnosis of *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) in horses using a direct agglutination test. **Vet Parasitol**, v. 47, n. 1-2, p. 25-35, Mar 1993. ISSN 0304-4017 (Print) 0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8493765> >.

MONZON, C. M.; MANCEBO, O. A.; D'AGOSTINO, B. I. Consideraciones clinicas de la tripanosomiasis equina experimental (*Trypanosoma evansi*, Voges 1901). **Revista de Medicina Veterinária**, v. 65, n. 1, p. 13-18, 1984.

MONZON, C. M.; VILLAVICENCIO, V. I. Serum proteins in guinea-pigs and horses infected with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). **Vet Parasitol**, v. 36, n. 3-4, p. 295-301, Jul 1990. ISSN 0304-4017 (Print)  
0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2399649> >.

NUNES, V. L. B. O., E.T.; DORVAL, M.E.C. Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma* (trypanozoon) *evansi* no pantanal sul-mato-grossense. Estudo de reservatórios. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 2, p. 41-44, 1993.

OIE, W. O. F. A. H. *Trypanosoma evansi* infection (surra). In: (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**: World Organization for Animal Health OIE, 2015. cap. 2.1.17.,

OLANI, A. et al. Prevalence of camel trypanosomosis (surra) and associated risk factors in Borena zone, southern Ethiopia. **Parasitol Res**, v. 115, n. 3, p. 1141-7, Mar 2016. ISSN 1432-1955 (Electronic)  
0932-0113 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26627690> >.

OMER, O. H.; MOUSA, H. M.; AL-WABEL, N. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet Parasitol**, v. 145, n. 1-2, p. 142-5, Apr 10 2007. ISSN 0304-4017 (Print)  
0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169491> >.

ONAH, D. N.; HOPKINS, J.; LUCKINS, A. G. Haematological changes in sheep experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitol Res**, v. 82, n. 8, p. 659-63, 1996. ISSN 0932-0113 (Print)  
0932-0113 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897497> >.

PANDEY, V. et al. Haemato-biochemical and oxidative status of buffaloes naturally infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet Parasitol**, v. 212, n. 3-4, p. 118-22, Sep 15 2015. ISSN 1873-2550 (Electronic)  
0304-4017 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=26242833](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26242833) >.

RANJITHKUMAR, M. et al. Disturbance of oxidant/antioxidant equilibrium in horses naturally infected with *Trypanosoma evansi*. **Vet Parasitol**, v. 180, n. 3-4, p. 349-53, Aug 25 2011. ISSN 1873-2550 (Electronic)  
0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514732> >.

RODRIGUES, A. et al. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. **Vet Pathol**, v. 46, n. 2, p. 251-8, Mar 2009. ISSN 0300-9858 (Print)  
0300-9858 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261636> >.

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

eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 239-249, 2005.

RUE, M. L. et al. Leukocytes and Reticulocytes Counts in Acute Infection of Dogs with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 42, p. 163-166, 2000.

SILVA, A. S. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 373-376, 2007. ISSN 1678-0345.

SILVA, R. A. et al. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 60, n. 1-2, p. 167-71, Nov 1995. ISSN 0304-4017 (Print)  
0304-4017 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8644453> >.

SINGLA, L. D. et al. Comparative evaluation of agglutination assay with microscopy and polymerase chain reaction for detection of *Trypanosoma evansi* in bovines of Punjab. **Indian Journal of Animal Sciences** v. 85, n. 11, p. 1164–1166, 2015.

SIVAJOTHI, S.; RAYULU, V. C.; SUDHAKARA REDDY, B. Haematological and biochemical changes in experimental *Trypanosoma evansi* infection in rabbits. **J Parasit Dis**, v. 39, n. 2, p. 216-20, Jun 2015. ISSN 0971-7196 (Print)  
0971-7196 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26064003> >.

SPICKLER, A. R. **Surra (Last Updated)** 2009.

SUMBRIA, D. et al. Equine trypanosomosis in central and western Punjab: prevalence, haemato-biochemical response and associated risk factors. **Acta Trop**, v. 138, p. 44-50, Oct 2014. ISSN 1873-6254 (Electronic)  
0001-706X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24931285> >.

THRALL, M. A. et al. **Veterinary Haematology and Clinical Chemistry**. Wiley-Blackwell, 2012.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ensaio de SAR/Te desenvolvido em nosso estudo apresenta boas perspectivas para ser colocado em prática nos mais diversos laboratório veterinários de diagnóstico, principalmente devido a simplicidade, especificidades e sensibilidade, sendo uma importante ferramenta para ser usada como teste de triagem animais com suspeita de Surra. O relato do caso de *T. evansi* aqui apresentando, confirma o primeiro surto autóctone no Estado de Santa Catarina, confirmando a circulação do agente *T. evansi* no estado de Santa Catarina.