

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS JABOTICABAL

**MELHORA NO DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE *TRYPANOSOMA*
VIVAX ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LISE E CONCENTRAÇÃO**

Tayna Rosendo da Silva

Médica Veterinária

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS JABOTICABAL

**MELHORA NO DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE *TRYPANOSOMA*
VIVAX ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LISE E CONCENTRAÇÃO**

Discente: Tayna Rosendo da Silva

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Veterinárias (Clínica Médica
Veterinária)

JABOTICABAL

2022

S586m Silva, Tayna Rosendo da
Melhora no diagnostico parasitológico de Tripanosoma vivax
através da técnica de lise e concentração / Tayna Rosendo da Silva. --
Jaboticabal, 2022
35 p.

Dissertação(mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal

Orientador: Fabiano Antonio Cadioli

1. Hemoparasita. 2. Tripanosomose. 3. Parasita. 4. Ruminantes.
5. Bovinos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "TÉCNICA DE LISE E CONCENTRAÇÃO" MELHORA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DO *Trypanosoma Vivax*

AUTORA: TAYNÁ ROSENDO DA SILVA

ORIENTADOR: FABIANO ANTONIO CADIOLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FABIANO ANTONIO CADIOLI (Participação Presencial)
Departamento de Clínica Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. OTAVIO LUIZ FIDELIS JUNIOR (Participação Presencial)
Universidade Vila Velha-UVV / Vila Velha/ES

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / FMVA / UNESP - Araçatuba

Jaboticabal, 26 de agosto de 2022

UNESP ARACATUBA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
SECRETARIA DE APOIO ADMINISTRATIVO

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tayna Rosendo da Silva, nascida em Penápolis - SP em 1995, ingressou no curso técnico de farmácia na Escola Técnica Estadual Prof. Massuyuki Kawano, Tupã- SP, em agosto de 2011 colando grau em dezembro de 2012. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária FAEF, Câmpus de Garça - SP em fevereiro de 2013, colando grau em dezembro de 2017. Em 2018 ingressou na residência MEC em Clínica médica de grandes animais, na faculdade UNESP, campus Araçatuba-SP, finalizando em março de 2020. Em agosto de 2020, ingressou no Mestrado no programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Clínica Médica Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho. Aos meus pais José da Silva e Marlene Rosendo da Silva, irmã Tamiris Rosendo da Silva e minha namorada Gabriely Oliveira, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Ao professor Fabiano Cadioli, por ter sido meu orientador, amigo e ter desempenhado tal função com dedicação e paciência e bota paciência, você foi 1000 tiu. Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período.

Ao Yuri Tani Utsonomiya, Deise Deolindo e Fernanda Cavalcante pelo apoio técnico. A Sueli Bonfim, João Panin e Gabriely Oliveira pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, sem vocês não seria possível tal resultado.

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

MELHORA NO DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE *TRYPANOSOMA VIVAX* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE LISE E CONCENTRAÇÃO

Resumo: O hemoprotozoário *T. vivax* causa doenças em ruminantes na África e nas Américas Central e do Sul, causando enormes prejuízos econômicos. O diagnóstico definitivo é baseado na observação direta do parasita ou na detecção de seu DNA, sendo os métodos sorológicos úteis para entender a epidemiologia dos rebanhos. Neste trabalho, testamos a “Técnica de Lise e Concentração” (LCTe) como diagnóstico direto do *T. vivax*, verificando se a lise de hemácias e a concentração dos parasitas aumenta as chances de visualização em baixas parasitemias e auxilia de avaliadores com pouca experiência em diagnóstico parasitológico. A lise de hemácias reduziu o tempo de diagnóstico em 21 segundos, ou seja, o efeito produzido pelo tratamento é equiparável ao efeito da experiência em exame parasitológico. Além disso a concentração de parasitos foi 39,18% maior para lâminas com alta parasitemia e 131,03% para lâminas de baixa parasitemia em relação à lâmina padrão. A LCTe se mostrou barata, com custo total de aproximadamente US\$ 0,07 por lâmina confeccionada, o que permite que seja facilmente implementada na maioria dos laboratórios.

Palavras-chave: hemoparasita; tripanosomose; parasita; ruminantes; bovinos;

IMPROVEMENT IN THE PARASITOLOGICAL DIAGNOSIS OF TRYPANOSOMA VIVAX THROUGH THE LYSIS AND CONCENTRATION TECHNIQUE

Abstract: The hemoparasite *T. vivax* causes diseases in ruminants in Africa and Central and South America, causing enormous economic losses. The definitive diagnosis is based on the direct observation of the parasite or on the detection of its DNA, being the serological methods useful to understand the epidemiology of the herds. In this work, we tested the “Lysis and Concentration Technique” (LCTe) as a direct diagnosis of *T. vivax*, verifying if the lysis of red blood cells and the concentration of the parasites increases the chances of visualization in low parasitemias and helps evaluators with little experience in parasitological diagnosis. Red blood cell lysis reduced diagnosis time by 21 seconds, that is, the effect produced by the treatment is comparable to the effect of experience in parasitological examination. In addition, the concentration of parasites was 39.18% higher for slides with high parasitemia and 131.03% for slides with low parasitaemia in relation to the standard slide. LCTe proved to be inexpensive, with a total cost of approximately US\$ 0.07 per slide made, which allows it to be easily implemented in most laboratories.

Keywords: hemoparasite; trypanosomosis; parasite; ruminants; cattle

Sumário

1. ENUNCIADO DO PROBLEMA	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. JUSTIFICATIVA	7
4. OBJETIVOS	8
4.1. GERAL	8
4.2. ESPECÍFICO	8
5. MATERIAL E MÉTODOS	8
5.1. Amostras de sangue	8
5.2. Esfregaços sanguíneos	9
5.3. Nível de conhecimento do avaliador	9
5.4. Leitura das lâminas	9
5.5. Análise biométrica	10
5.6. Estatística	11
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
7. CONCLUSÃO	21
8. REFERÊNCIAS	22

1. ENUNCIADO DO PROBLEMA

Tripanosomose é uma doença causada por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma*, sendo os principais encontrados em animais na América do sul o *T. cruzi*, *T. evansi* e *T. vivax*. Destes, o *T. vivax* causa grandes perdas econômicas na bovinocultura da África, Ásia, América Central e do Sul (GARDINER et al., 1989; SILVA et al., 2003; BATISTA et al., 2008).

Na África o principal meio de transmissão é pela mosca *Glossina spp.* (Tsé Tsé), já nas Américas é transmitida mecanicamente por insetos hematófagos, tais como *Tabanus spp.*, *Stomoxys spp.* e *Hematobia irritans* (SILVA et al., 2003; CADIOLI et al., 2012), como também é frequente a transmissão iatrogênica por compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas (SILVA et al., 1999; CADIOLI et al., 2012; COSTA et al., 2013).

No estado de São Paulo, a tripanosomose vem causando um grande impacto na bovinocultura sendo que, na região noroeste do estado, observou-se 16 surtos em 15 municípios que acarretou em 41,5% de óbitos de animais (CADIOLI et al., 2012). O impacto econômico gerado pelo *T. vivax* em rebanhos bovinos é considerável, provém da perda de animais, gastos com diagnóstico e tratamento, além da queda na produção (CARVALHO et al., 2008).

Neste cenário, o diagnóstico é a base para tratamento e controle do *T. vivax*, sendo o método parasitológico o mais usado em rebanhos bovinos brasileiros (MADRUGA, 2004). A técnica parasitológica direta pode ser realizada a partir de esfregaços sanguíneos corados principalmente por Giemsa, e observada por microscopia óptica (SILVA et al., 2002). Também pode ser realizada a técnica da gota espessa que pode ser preparada com 25 µl de sangue depositado numa lâmina e, coberto por uma lâmina, sendo observado a movimentação dos parasitos na microscopia (WILSON, 1969). Entretanto, durante a infecção ocorrem flutuações da parasitemia, tornando difícil a detecção de parasitos nos esfregaços sanguíneos (MADRUGA et al., 2006), a fim

de dar maior sensibilidade ao teste algumas técnicas de concentração podem ser empregadas no diagnóstico de tripanosomas, tal como a técnica do microhematócrito de Woo (1970), consiste no preenchimento de um tubo de hematócrito com posterior centrifugação, podendo ser observado a presença dos parasitos na camada entre o plasma e os leucócitos, esta técnica é considerada a mais comum dentre os exames parasitológicos empregados (MASAKE et al., 1994). Outra técnica muito empregada é a do *buffy coat*, que consiste na quebra do capilar entre a camada plasmática e a camada celular e depositando duas a três gotas em lâmina realizando um esfregaço, que normalmente é corado com Giemsa ou Panótico e observado em microscópio, técnica considerada complementar a técnica de WOO, 1970 (MURRAY et al., 1977). As técnicas parasitológicas apresentam limitações principalmente devido a variação de parasitemia que ocorre durante a infecção por *T. vivax*.

Porém a dificuldade diagnóstica é encontrada mesmo os meios sorológicos como o ELISA não diferenciam animais com infecção ativa daqueles que já foram tratados e tiveram a remissão da parasitemia. Somente os métodos moleculares apresentam uma capacidade alta de constatar a presença do parasito em baixas parasitemias, sendo destacado entre eles o método de amplificação circular isotérmica do DNA (LAMP) sobressaindo ao PCR por maior especificidade e sensibilidade ao *T. vivax* (CASTILHO NETO et al., 2021), porém os custos para tais testes são altos, muitas vezes limitando a testagem de muitos animais dentro de um rebanho, sendo então necessário uma melhoria em técnicas parasitológicas diretas, a fim de aumentar a sensibilidade mesmo em baixas parasitemias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A tripanossomose é uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Trypanosoma*, sendo cosmopolita e espécie-inespecífico. No que diz respeito à Tripanossomose bovina, a espécie *Trypanosomas vivax* é o mais importante do gênero, sendo considerado um hemoprotozoário extracelular, flagelado, de corpo alongado e achatado (formato de foice), membrana ondulante, com cinetoplasto grande em forma de meia lua localizado na porção terminal, bem como possui um núcleo grande e centralizado (DÁVILA et al., 1997; MORAES, 2001). *T. vivax* pertence a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e está contido no grupo Salivaria (que alberga os tripanosomas que são transmitidos através das glândulas salivares do vetor) do gênero *Trypanosoma*, e por fim, ao subgênero *Duttonella* (HOARE, 1972; LOSOS, 1986).

T. vivax é um parasita digenético, ou seja, seu ciclo envolve dois hospedeiros, onde o hospedeiro final é um animal vertebrado, e os hospedeiros intermediários ou vetores, são invertebrados (SILVA et al., 2002). podendo infectar uma grande gama de espécies que geralmente são mamíferos ungulados (selvagens ou domésticos) como: bovinos, búfalos, ovelhas, cabras, cavalos e capivaras e camelos (MOSSAAD et al., 2017; GIMENEZ e BELLO, 2019; OSÓRIO et al., 2008).

Na América Latina a transmissão do *T. vivax* ocorre de forma mecânica, por meio de moscas hematófagas do gênero *Tabanus* spp. (Mutuca) e *Stomoxys* spp (Mosca dos estábulos) ou ainda, de forma iatrogênica, por meio de fômites como o compartilhamento de agulhas (SILVA et al., 2002; CADIOLI et al., 2012).

Bovinos infectados podem se apresentar assintomáticos ou ainda, desenvolverem sinais clínicos que incluem: febre, letargia, apatia, fraqueza, lacrimejamento, conjuntivite, abortos, emaciação, diarreia, incoordenação motora, tremor muscular, opistotono, cegueira, hipermetria, estrabismo lateral e morte (SILVA et al., 2009; CADIOLI et al., 2012; ONO et al., 2017).

É destacado a persistência do *T. vivax* em rebanhos e a causa disto se deve ao parasito possuir a habilidade de realizar mudanças na expressão das suas glicoproteínas de superfície para outra, resultando em mutação antigênica, isso faz com que a resposta imune do hospedeiro seja ineficaz e, é também devido a isso que ocorrem períodos de alta e baixa parasitemia, bem como a principal forma de impedir a eliminação do mesmo (BARRAL, 2010).

A tripanossomose causa um grande impacto econômico, que se relaciona a custos com diagnóstico e tratamento, além da diminuição na produtividade e morte de animais. O custo deste impacto nos rebanhos bovinos, no Brasil, é estimado em US\$ 14,65 por animal ou 4% do valor estimado do rebanho. Sem o tratamento, os custos se elevaram para 17% do valor total do rebanho. Stevenson et al. (1995) afirmaram que no Pantanal, o gasto com tratamento pode chegar a US\$ 37,80 por animal. De modo geral, os prejuízos devido à ocorrência de surto de *T. vivax* em sete rebanhos bovinos de corte, na região do Pantanal, excederam um milhão de dólares (SEIDL et al, 1999). Por outro lado, em rebanhos leiteiros, a queda na produção pode chegar a 41,6% (COSTA et al., 2013).

Os sinais clínicos de tripanossomoses animais não são suficientes, cientificamente específicos para apoiar um diagnóstico clínico e, portanto, são necessários exames laboratoriais para confirmar suspeitas, pode ser realizado por diferentes métodos: parasitológicos, sorológicos e moleculares. Sendo estes muitas vezes usados em conjunto. Porém, há dificuldades em fechar o diagnóstico devido ao fato do parasito desencadear sinais clínicos pouco específicos, e apresentar flutuação na parasitemia durante o curso da doença (BATISTA et al., 2007; CADIOLI et al., 2012).

As provas parasitológicas podem apresentar baixa sensibilidade em baixas parasitemias, porém são as mais usadas no Brasil, dentre as quais se destacam: esfregaços sanguíneos, gota espessa, técnica do microhematócrito ou Woo e técnica de *Buffy coat* (WOO, 1970; MURRAY et. al., 1977; MASAKE et. al., 1994;

SILVA et. al., 2002). A técnica do microhematócrito permite a visualização de tripanosomas principalmente de seis a dez dias pós infecção, onde observa-se a forma tripomastigota entre a camada leucocitária e o plasma no microtubo de hematócrito. (WOO, 1970). Já o método de *Buffy coat* utiliza-se a camada leucocitária do microtubo para se realizar um esfregaço sanguíneo, que é corado com corantes hematológicos e observado no microscópio óptico, onde observa-se as formas tripomastigotas (MURRAY, 1977), estas são as únicas propostas de melhoria diagnóstica aos métodos parasitológico direto.

Os métodos sorológicos são mais sensíveis que os parasitológicos, contudo indicam que o animal suspeito teve contato com o parasito, porém não é possível identificar se a infecção está ativa ou não (NANTULYA, 1990). Dentre as técnicas, destacam-se: Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), onde ambos detectam anticorpos anti-*T. vivax* no soro (VAN DEN BOSSCHE et al., 2001; SILVA et al., 2002). Os testes sorológicos, podem ser usados para triagem, e investigações epidemiológicas (MADRUGA et al., 2006).

E por fim, tem-se os métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e a Amplificação Circular Isotérmica do DNA (LAMP), que indicam a presença do DNA do parasito no sangue dos animais (LAOHASINNARONG et al., 2011; CADIOLI et al., 2015). O PCR convencional possui melhor taxa de detecção quando comparado aos métodos parasitológicos, porém, sua especificidade ainda é reduzida quando há parasitemia baixa e, seu uso a campo se torna inviável economicamente quando usado em larga escalas nos rebanhos devido ao seu alto custo (OSÓRIO et al., 2008; FIDELIS JUNIOR et al., 2019). A LAMP possui alta capacidade de detecção do parasito mesmo em momentos aparasitemicos (NJIRU et al., 2011; CADIOLI et al., 2015) sendo capaz de detectar 1 tripomastigota/mL de sangue (NJIRU et al., 2011), porém sua aplicabilidade ainda é baixa, por ser uma técnica nova e de custos altos.

Os picos de parasitemia do *T. vivax* são elevados em infecções agudas, menores e menos frequentes em infecções crônicas e nulo ou errático no caso de evolução subclínica da doença. Portanto, a eficácia do diagnóstico pode ser seriamente afetada quando realizada em momentos de baixos níveis de parasitemia. Muitos testes de diagnóstico estão disponíveis para detectar tripanossomas e variam quanto a sua sensibilidade, especificidade, facilidade na implementação e, além disso, quanto aos custos que impactam diretamente sua utilização a campo (DESQUESNES et al., 2022).

Muito embora os testes parasitológicos diretos sejam a forma mais difundida de diagnóstico das tripanosomoses (MADRUGA, 2004), apresentando 100% de especificidade (PARIS et al., 1982; BÜSCHER, 2014), este possui baixa sensibilidade que alcançando no máximo 29%, (ALVES et al., 2017) sendo assim, seu resultado pode ser afetado pelo nível de conhecimento do avaliador e, pelo nível da parasitemia.

Os primeiros relatos de melhorias nos métodos parasitológicos diretos do *T. vivax* foram apresentadas por Woo (1970) com a técnica de centrifugação de hematócrito (HCT) e por Murray (1977) com a técnica *buffy coat*, sendo estes métodos utilizados de forma rotineira a campo até os dias de hoje. A técnica de Woo (1977) é a mais usada segundo Okello et al., 2022 que realizou uma revisão sistemática de literatura onde observou na maioria dos estudos, que a comprovação diagnóstica ocorreu através destas técnicas em diversas espécies.

A preparação e o exame microscópico das lâminas coradas consomem tempo tanto para confecção quanto para leitura das mesmas e também requer um nível considerável de conhecimento para identificar o parasito (CHAPPUIS et al., 2005), deste modo, deve-se destacar a importância da pesquisa em métodos diagnósticos, principalmente naqueles aplicáveis com baixo custo como, os testes parasitológicos, os quais desde 1977 (MURRAY) não houve melhora nas técnicas. Um avanço neste sentido é de extrema necessidade pois,

o alto custo de exames moleculares muitas vezes dificultam a aplicabilidade da técnica em rebanhos e, um animal positivo não diagnosticado pode corroborar para expansão do parasito no ao longo do território Brasileiro.

3. JUSTIFICATIVA

O *T. vivax* foi descrito pela primeira vez no Brasil na década de 70 em búfalos (PEREIRA; ABREU, 1978) e posteriormente em surtos no Amapá (SERRA-FREIRE, 1981) e Mato Grosso do Sul (PAIVA et al., 2000) que, até hoje são consideradas áreas endêmicas. Posteriormente relatos de surtos foram descritos em vários estados, indicando que, o parasito está amplamente difundido no território nacional e vem causando grandes perdas econômicas. (FEITOSA JÚNIOR et al., 2004; LINHARES et al., 2006; BATISTA et al., 2007; GUERRA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008, SILVA et al., 2009; CUGLOVICI et al. 2010; BAPTISTA FILHO et al., 2011; PIMENTEL et al., 2012; CADIOLI et al., 2012)

O diagnóstico é a base para detecção, controle e tratamento do *T. vivax* , além do monitoramento do um rebanho infectado, impedindo a movimentação de animais positivos para lotes ou propriedades livres do parasito . Este pode ser feito por meio de testes sorológicos, moleculares e parasitológicos direto, sendo este o mais utilizado no mundo, devido a um menor custo e facilidade em sua realização, não necessitando de muita estrutura do local (MADRUGA, 2004).

A proposta neste trabalho é testar uma técnica parasitológica direta para diagnóstico do *T. vivax* por um meio barato e de fácil realização que, consiste em lisar as hemácias da amostra a ser analisada e posteriormente, submetê-la a centrifugação visando a concentração dos parasitos para que se aumente as chances de visualizá-lo mesmo em baixas parasitemias e em cenários de avaliadores com pouco conhecimento sobre o parasito.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Verificar se a lise e concentração de hemácias melhora o diagnóstico parasitológico direto de *Trypanosoma vivax* em esfregaços sanguíneos corados.

4.2. ESPECÍFICO

Verificar se há diferença no tempo de diagnóstico do *T. vivax* em esfregaços sanguíneos com e sem lise de hemácias.

Verificar se a lise e concentração de hemácias melhora a assertividade diagnóstica no teste parasitológico por pessoas inexperientes no diagnóstico do *T. vivax*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho passou pelo comitê de ética de pesquisa em humanos sob protocolo CEP 069639/2022

5.1. Amostras de sangue

Foi utilizado sangue de ovino parasitado por *T. vivax* em fase aguda da infecção com diferentes níveis de parasitemia sendo $2,0 \times 10^6$ tripomastigotas por mL considerado altamente parasitado $2,9 \times 10^3$ tripomastigotas por mL, considerado sangue pouco parasitado, contagem estimada pela técnica de Brener (1961). Sangue de ovino não-parasitado por *T. vivax* foi utilizado como controle negativo. Ambos coletados em tubos a vácuo de 4 ml com ácido etilenodiaminotetracético di-sódico (EDTA).

As hemácias foram lisadas com água destilada adicionando sangue em diluição de 1:1. O lisado foi homogeneizado suavemente e centrifugado em tubo eppendorf cônico a uma velocidade de 582 G por 5 minutos, sendo a

velocidade e tempo decidida por testes de pré ensaio. Sendo desprezado 70% do sobrenadante e foi ressuspenso os 30% restantes para realizar os esfregaços.

Para o cálculo da densidade média de tripomastigotas/campo (DT) foram contadas n formas tripomastigotas em 100 campos consecutivos, em três repetições por tratamento, no aumento de 40x, sendo calculada por $DT = \frac{\sum n}{3}$

5.2. Esfregaços sanguíneos

Foram confeccionados 20 esfregaços sanguíneos para cada tratamento, com 25 uL de volume final, sendo zero parasitas sem lise de hemácias (TZ), zero parasitas com lise de hemácias (TZL) sendo usados como controle negativo; baixa parasitemia e sem lise de hemácias (TB), baixa parasitemia com lise de hemácias (TBL) e, alta parasitemia sem lise de hemácias (TA) e alta parasitemia com lise hemácias (TAL).

Os esfregaços foram corados com 0,5 mL de Rosenfeld modificado (0,97g de Giemsa; 0,53 g de May Grunwald; 0,5 g de Wrigth, para 1L de metanol [Merck, Darmstadt, Alemanha] descansando 24 h para posterior filtragem). Após três minutos foi adicionado 0,5 mL de água destilada, permanecendo em descanso por mais três minutos, com posterior enxágue em água corrente e secagem. Todas as lâminas foram identificadas com códigos ininteligíveis para os avaliadores.

5.3. Nível de conhecimento do avaliador

Foi avaliado o nível de conhecimento do avaliador, sendo estipulado como sendo nível 1, o avaliador que não tinha nenhum conhecimento prévio sobre o *T. vivax*; nível 2, com conhecimento do hemoparasita, porém nunca realizou diagnóstico e, nível 3, médicos veterinários com conhecimento amplo do parasitos e que já haviam feito diagnóstico parasitológico do *T. vivax*. No nível 1 participaram onze avaliadores, no nível 2, dez avaliadores e no nível 3

nove avaliadores. Após estipulado o nível de conhecimento era apresentado uma foto do *T. vivax*, para então o avaliador iniciar a leitura das lâminas.

5.4. Leitura das lâminas

A observação das lâminas foi realizada em microscópio binocular (MDL-150, Medilux, Curitiba, PR) com instruções aos avaliadores para ajuste do foco do microscópio em objetiva de 10x e buscar pelo parasito no aumento de 40x, aumento padrão para pesquisa de hemoparasitas. Para tanto, disponibilizou-se um conjunto de três lâminas de cada tratamento, totalizando 18 lâminas dispostas em ordem aleatória, perfazendo um total de 540 observações. O tempo até o diagnóstico foi cronometrado, sendo 180 segundos o tempo máximo instituído, toda vez que o avaliador indicasse a identificação do *T. vivax* a cronometragem era pausada, conferido se o diagnóstico estava correto, a era lâmina substituída, retornando a objetiva de 10x. Caso não houvesse confirmação do diagnóstico, a cronometragem continuava até o tempo limite e, nesse caso, o diagnóstico era considerado negativo.

5.5. Análise biométrica

Para a verificar se a LCTe alterava a forma dos tripomastigotas, foram realizadas análises biométricas. Para tanto, foram analisadas três lâminas de cada tipo de tratamento, com lise e sem lise, sendo fotografadas 50 formas tripomastigotas para cada tratamento em objetiva de 100X empregando-se microscópio Olympus BX61 acoplado a câmera digital DP-71. As mensurações foram realizadas com o programa Image Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA). Os parâmetros de avaliados estão demonstrados na figura 1.

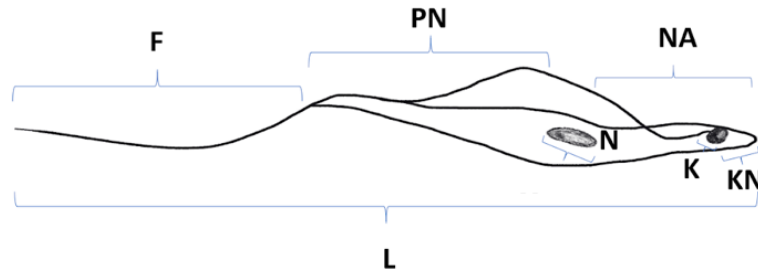


Figura 1: Parâmetros biométricos do *Trypanosoma vivax* (modificado de Hoare, 1972). O comprimento total (L) e do flagelo livre (F), distâncias da extremidade posterior ao núcleo (PN) e do núcleo à extremidade anterior (NA), o índice nuclear (NI), que representa a razão entre a distância do final da extremidade posterior para o núcleo e do núcleo para o final da extremidade anterior (PN/NA) e o índice cinetoplástico (KI), obtido dividindo-se a distância desde ao final da extremidade posterior ao núcleo (PN) pela distância do cinetoplasto ao núcleo (KN).

5.6. Estatística

O seguinte modelo linear misto foi ajustado aos dados:

$$y_{ijkl} = \mu + E_i + C_j + T_k + L_l + e_{ijkl}$$

Onde y_{ijkl} é o tempo do diagnóstico do i -ésimo examinador, pertencente ao grupo j de nível de conhecimento, ao analisar uma lâmina do grupo k de nível de parasitemia e l de lise; μ é o intercepto do modelo; E_i é o efeito aleatório do examinador; C_j é o efeito fixo do nível de conhecimento do examinador (sem conhecimento prévio, com conhecimento prévio mas sem experiência em exames parasitológicos ou com conhecimento e experiência); T_k é o efeito fixo do nível de parasitemia (controle negativo, baixo ou alto); L_l é o efeito fixo de lise (controle sangue total ou tratamento de lise); e e_{ijkl} é o efeito aleatório residual. Os efeitos aleatórios foram assumidos normais, independentes e identicamente distribuídos. Os componentes de variância do modelo foram estimados por meio do método de máxima verossimilhança restrita (REML), e as estimativas de efeitos fixos e aleatórios foram obtidas por meio da resolução

das equações de modelo misto. Todas as análises foram executadas no software R (v4.1.1., R Project, GNU).

Dados biométricos de esfregaços com lise e sem e de infecções naturais da cepa Lins foram submetidos à estatística descritiva e à análise de variância por meio do teste de Tukey a fim de comparar múltiplas das médias a 5% de probabilidade. Foi empregado o uso do software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) para as determinações estatísticas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A “técnica da lise e concentração” (LCTe) ao eliminar as hemácias do esfregaço e concentrar os tripanossomas, facilita o rápido reconhecimento do hemoparasita em diagnóstico direto mesmo por avaliadores com pouco conhecimento do parasito e em parasitemias baixas (Figura 2) como $2,9 \times 10^3$ tripomastigotas/mL, tornando assim, possível observar formas tripomastigotas diretamente, o que é impossível de se obter quando não há lise. Em parasitemias altas (figura 3), $2,0 \times 10^6$ tripomastigotas/mL, a facilidade do diagnóstico é potencializada. Ressaltando também a redução de tempo de coloração das lâminas com uso de Rosenfeld modificado, que chega a ser 3 vezes mais rápido que o Giemsa que normalmente é a coloração de escolha (DESQUESNES et al., 2022)

Além da eliminação das hemácias, a LCTe proporciona a concentração dos hemoparasitas, o que aumenta a Densidade de Tripanossoma (DT) por campo. Em comparações diretas, as DTs para os tratamentos foram TA 4,39; TAL 6,11; TB 0,29 e TBL 0,67, o que representa um aumento de 39,18% para lâminas com alta parasitemia e 131,03% para lâminas de baixa parasitemia. Esta maior concentração favorece a visualização do hemoparasita, principalmente em baixas parasitemias, podendo melhorar o diagnóstico direto nestas condições, visto que autores relatam que as técnicas parasitológicas empregadas como esfregaços sanguíneos e a HCT (WOO, 1970), tendem a apresentar baixa sensibilidade em baixas parasitemias (REBESKI et al., 1999; WAAL, 2012 e ALVES et al., 2017).

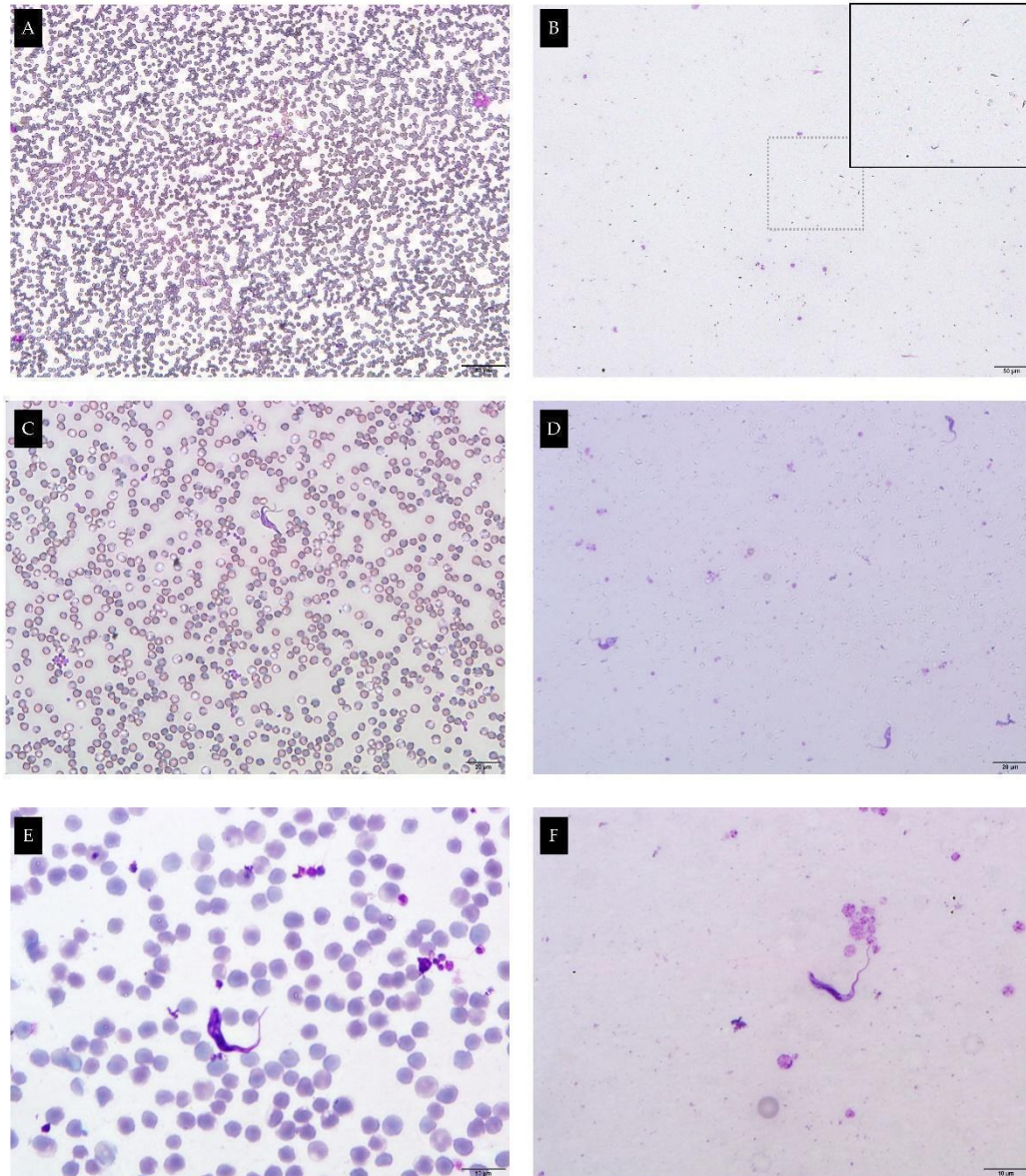


Figura 2 – Esfregaços corados com baixa parasitemia ($2,9 \times 10^3$ tripomastigotas por mL) sem lise (A; C; E) e com lise (B; D; F) em objetivas de 10 (A, B), 40 (C, D) e 100x (E, F) (Rosenfeld Modificado). Notar área aumentada em B.

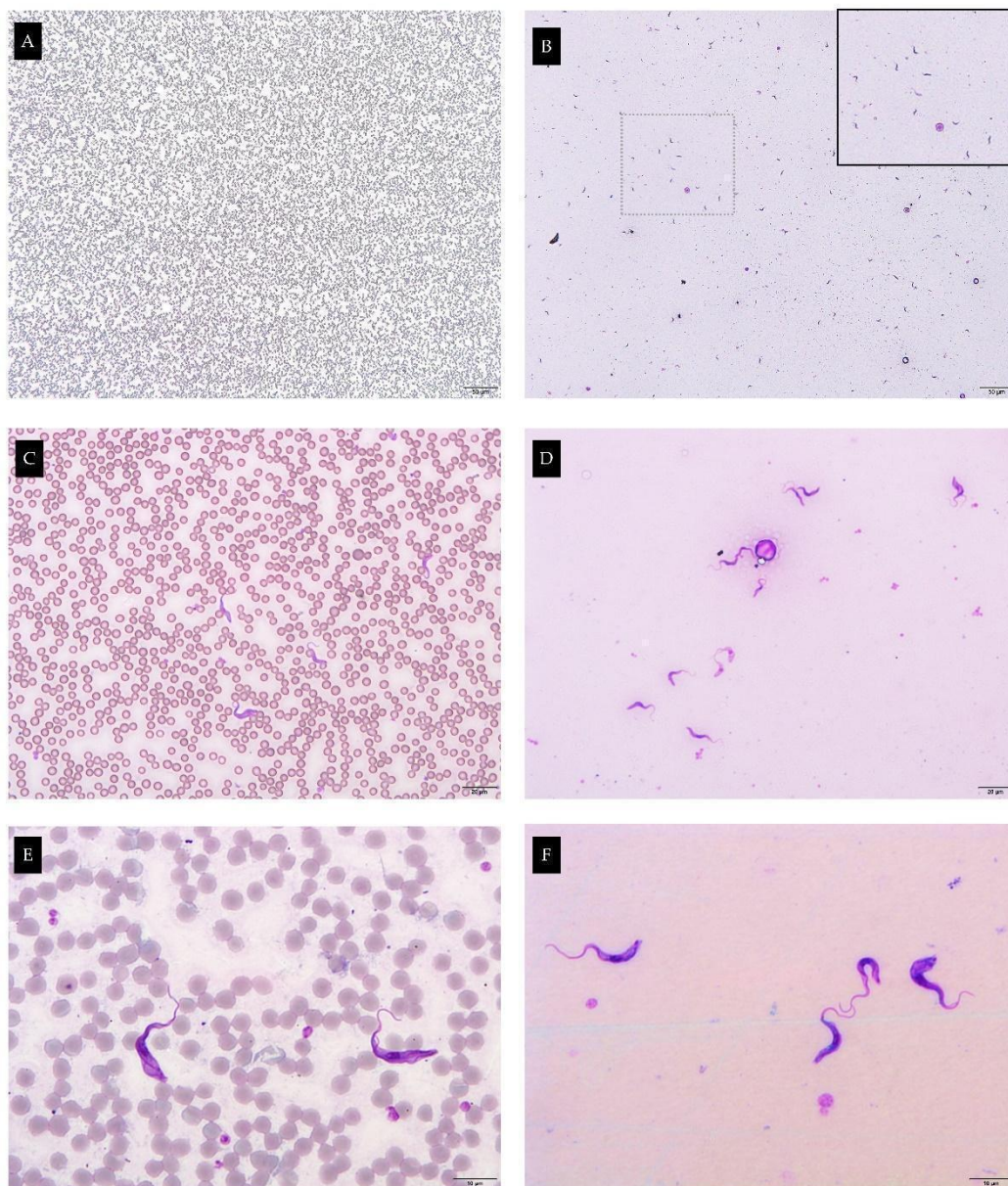


Figura 3 – Esfregaços corados com alta parasitemia ($2,0 \times 10^6$ tripomastigotas por mL) sem lise (A; C; E) e com lise (B; D; F) em objetivas de 10 (A, B), 40 (C, D) e 100x (E, F) (Rosenfeld Modificado). Notar área aumentada em B.

Do ponto de vista estatístico, os valores residuais obtidos no ajuste do modelo linear misto indicam que a pressuposição de normalidade do modelo foi devidamente atendida (Figura 4). Por meio do cálculo do valor do pseudo- R^2 do modelo ajustado, observamos que os efeitos incluídos no modelo explicaram aproximadamente 68% da variação no tempo de diagnóstico.

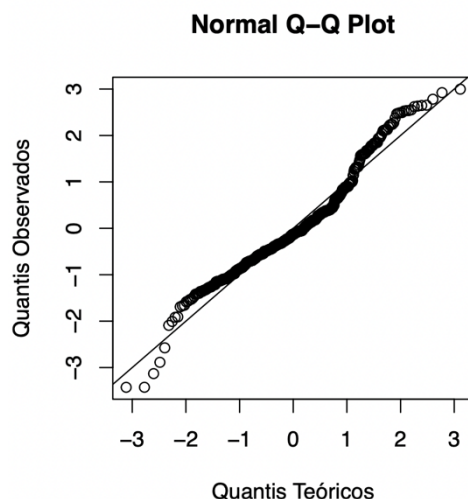


Figura 4 - Gráfico de Quantil-Quantil demonstrando a aderência dos valores residuais a uma distribuição normal padrão.

Conforme detalhado na Tabela 1, diferenças significativas ($p < 0,05$) no tempo de diagnóstico foram produzidas pela variação da parasitemia na amostra, pela lise de hemácias e pelo nível de conhecimento do examinador. Como esperado, lâminas com maior densidade de parasitas apresentaram menor tempo médio de diagnóstico, com redução média de 33 segundos nas amostras de alta parasitemia em comparação às de baixa parasitemia ($p = 3,08 \times 10^{-13}$).

Comparações	Diferença de médias	Erro Padrão	P-valor
Parasitemia baixa (TB) X Controle (TZ)	-89,30	4,421	$8,09 \times 10^{-68}$
Parasitemia alta (TA) X Controle (TZ)	-122,37	4,421	$3,00 \times 10^{-105}$
Parasitemia alta (TA) X Parasitemia baixa (TB)	-33,07	4,421	$3,08 \times 10^{-13}$
Sem experiência (N1) X Sem conhecimento (N2)	-10,70	6,460	0,098
Com experiência (N3) X Sem conhecimento (N2)	-32,70	6,645	$1,15 \times 10^{-6}$
Com experiência (N3) X Sem experiência (N1)	-22,01	6,793	0,001
Lise (TL) X Sangue total ($T_{A,B}$)	-20,87	3,610	$1,3 \times 10^{-8}$

Tabela 1. Estimativas de efeitos fixos obtidos por meio do ajuste do modelo linear misto. Nx = nível de conhecimento.

Apenas diferenças sugestivas foram observadas entre os examinadores sem conhecimento prévio daqueles com conhecimento, mas sem experiência em exames parasitológicos ($p = 0,098$). Indivíduos com experiência foram capazes de detectar a presença de *T. vivax* de 22 ($p = 0,001$) a 33 ($p = 1,15 \times 10^{-6}$) segundos mais rápido que os demais. A lise de hemácias reduziu o tempo de diagnóstico em 21 segundos ($p = 1,3 \times 10^{-8}$), indicando, portanto, que o efeito produzido pelo tratamento é equiparável ao efeito da experiência em exame parasitológico. Este resultado é de extrema importância, pois na aplicabilidade a campo, permitiria que pessoas sem grande conhecimento sobre o *T. vivax* diagnosticasse com mais eficiência lâminas parasitadas, bem como diminuiria o tempo do diagnóstico em pessoas com experiência, permitindo maior eficiência do diagnóstico parasitológico em rebanhos infectados.

Observando-se as tabelas 2 e 3 verifica-se que avaliadores do nível 1 foram os mais beneficiados pela técnica, pois houve melhora de 39,32% no reconhecimento do *T. vivax* em baixa parasitemia e de 21,3% em esfregaços com alta parasitemia, o que se traduz em maior acerto diagnóstico pelo uso da LCTe, levando avaliadores sem conhecimento prévio a um nível de excelência diagnóstica. Entretanto, o tempo diagnóstico para avaliadores de nível 1, sofreu influência da dificuldade de realizar o foco inicial em lâminas com lise em baixa parasitemia, demorando em média 8 segundos a mais para encontrar o parasito, porém, em alta parasitemia este tempo foi reduzido em 17 segundos pela LCTe, provavelmente pela maior concentração visível de *T. vivax* no campo microscópico. Ademais, observamos que a variação no tempo de diagnóstico é causada por diferenças intrínsecas aos examinadores, cuja variância foi de 6,4% (IC 95%: 2,7% X 10,47%), sugerindo que outros fatores individuais não

relacionados ao nível de conhecimento ou experiência também contribuem com uma pequena proporção na diferença de tempo de diagnóstico.

Tratamento	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Média
TB	48,48% (16)	70% (21)	92,59% (25)	68,88% (62)
TBL	87,8% (29)	93,33% (28)	96,2% (26)	88,88% (80)
TA	69,6% (23)	93,33% (28)	100% (27)	85,5% (77)
TAL	90,9% (30)	96,6% (29)	100% (27)	95,5% (86)

Tabela 2: Valor em porcentagem e número de acertos no diagnóstico dos diferentes níveis de conhecimento e tratamento das lâminas.

Tratamento	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Média
TB	74	85	59	77
TBL	82	59	41	61
TA	51	60	32	51
TAL	34	45	17	34

Tabela 3: Tempo em segundos de diagnóstico entre os diferentes níveis de conhecimentos e tratamento das lâminas.

Avaliadores do nível 2 também se beneficiaram com a LCTe. Em baixa parasitemia houve 23,3% mais acertos e em alta parasitemia 3,37%, sendo que em casos com maior conhecimento do parasito, a LCTe propicia incremento no diagnóstico em baixas parasitemias. Efeito similar é observado para os avaliadores do nível 3. Além disso, avaliadores dos níveis 2 e 3 foram capazes de diagnosticar mais rapidamente em baixa parasitemia, 26 s no nível 2 e 18 s no nível 3, equiparando-se em 15 s para alta parasitemia.

O uso de meio hipotônico para a promover a lise de hemácias afeta a biometria do *T. vivax* como pode ser observado na tabela 4. Observou-se aumento ($p<0,05$) do comprimento total (L) e por consequência aumenta-se a distância do núcleo à extremidade posterior (PN) e a distância do núcleo à extremidade anterior (NA), quando comparado aos tripomastigotas de esfregaços sem lise e de outras espécies animais. Diferenças significativas ($p<0,05$) em L, PN e NA também foram observadas quando os parâmetros biométricos do tripomastigotas em esfregaços lisados foram comparados aos de esfregaços de *T. vivax* em infecções experimentais e naturais de caprinos e bovinos. Estas alterações provavelmente estão relacionadas a maior entrada de líquido para o meio intracelular do *T. vivax* por osmolaridade. Porém, não foram constatadas alterações em parâmetros biométricos que caracterizam o *T. vivax*, como tamanho de núcleo (NI), cinetoplasto (KI) e distância de cinetoplasto ao ápice (KN). Como esfregaços permitem a identificação das espécies de tripanossomas com base nas características morfológicas (SINGH, 1985), o uso da LCTe como diagnóstico do *T. vivax* não causa distorções importantes a ponto de inviabilizar o reconhecimento do hemoprotozoário. Entretanto seu uso na pesquisa de novos isolados deve ser melhor investigada, principalmente em espécies de tripanossomas acinetoplásticas.

Tratamento	L	PN	NA	PK	KN	F	NI	KI	
Presente estudo									
(ovino)	com lise	28,24 ± 2,17 = [27,64; 28,84] a	6,94 ± 1,33 = [6,57; 7,31] c	7,56 ± 0,95 = [7,30; 7,82] d	1,35 ± 0,23 = [1,29; 1,41] c	5,70 ± 0,85 = [5,46; 5,94] c	11,0 ± 1,35 = [10,63; 11,37] a	2,74 ± 0,40 = [2,63; 2,85] a	0,93 ± 0,13 = [0,89; 0,97] c
	sem lise	26,48 ± 2,14 = [25,89; 27,07] bc	6,11 ± 1,30 = [5,75; 6,47] d	6,90 ± 0,95 = [6,64; 7,16] e	1,21 ± 0,30 = [1,13; 1,29] c	5,0 ± 0,98 = [4,73; 5,27] d	10,62 ± 1,88 = [10,10; 11,14] a	2,85 ± 0,52 = [2,71; 2,99] a	0,89 ± 0,18 = [0,84; 0,94] c
Infecções naturais									
Espécie	L	PN	NA	PK	KN	F	NI	KI	
caprino*	27,00±1,78 = [26,51; 27,49] b	8,37±1,00 = [8,09; 8,65] a	9,07±1,28 = [8,72; 9,42] bc	1,49±0,34 = [1,40; 1,58] bc	6,88±0,73 = [6,68; 7,08] a	9,49±1,26 = [9,14; 9,84] b	0,94±0,13 = [0,90; 0,98] bc	1,22±0,06 = [1,20; 1,24] b	
bovino*	26,02±1,83 = [25,51; 26,53] bc	8,31±1,00 = [8,03; 8,59] ab	9,63±1,40 = [9,24; 10,02] ab	1,66±0,49 = [1,52; 1,80] b	6,65±0,63 = [6,48; 6,82] a	7,97±1,09 = [7,67; 8,27] c	0,88±0,13 = [0,84; 0,92] cd	1,25±0,08 = [1,23; 1,27] b	
bovino – Sales (SP)	25,75±1,78 = [25,16; 26,24] c	7,82±0,86 = [7,58; 8,06] b	9,78±1,19 = [9,45; 10,11] a	2,00±0,46 = [1,87; 2,13] a	5,83±0,85 = [5,59; 6,07] c	7,85±1,26 = [7,50; 8,20] c	0,81±0,13 = [0,77; 0,85] d	1,35±0,11 = [1,32; 1,38] a	
bovino – Promissão (SP)	24,59±1,74 = [24,11; 25,07] d	8,48±0,73 = [8,28; 8,68] a	8,57±1,44 = [8,17; 8,97] c	1,97±0,50 = [1,83; 2,11] a	6,50±0,59 = [6,34; 6,66] b	7,53±1,18 = [7,20; 7,86] c	1,02±0,21 = [0,96; 1,08] b	1,31±0,09 = [1,29; 1,33] a	

Tabela 4 - Comparação das medidas biométricas (μm) de isolados brasileiros de Trypanosoma vivax em diversas espécies animais e no presente estudo. Onde: L=Comprimento total F=Flagelo livre PN=Distância do núcleo à extremidade posterior NA=Distância do núcleo à extremidade anterior NI=Índice nuclear. KN= distância do cinetoplasto ao núcleo. KI= Índice cinetoplático. *Infecções experimentais. a, b, c, d - Médias com as mesmas letras na mesma coluna não diferem (p>0,05).

O gasto com diagnóstico constitui um dos maiores custos de manejo em propriedades infectadas com *T. vivax*, porém é imprescindível tanto para o monitoramento quanto para o acompanhamento do tratamento no rebanho, a falha diagnóstica em rebanhos infectados contribui para a manutenção de animais infectados, conseqüentemente, a manutenção do parasita na propriedade como também promovem a disseminação do mesmo através de rotas comerciais, tornando-se o principal fator da dispersão do parasita (SILVA et al., 1998; JONES e DÁVILA, 2001; CASTILHO NETO et al., 2021). A aplicabilidade de técnicas moleculares como PCR e LAMP, que tem custos médios de US\$ 25,37 por amostra, se tornando um fator limitante por custo em aplicação em um rebanho, devendo ser reservada apenas para casos pontuais. Neste cenário a LCTe se mostra promissora pois é uma técnica barata, com custo total de aproximadamente US\$ 0,07 dólares por lâmina confeccionada, permitindo que seja adotada como método de rastreio e de monitoramento em conjunto com sorologia e/ou moleculares, tendo a vantagem de ter velocidade de leitura das lâminas mais rápida e também favorecer o diagnóstico para pessoas com menor conhecimento. Além disso seu custo de implementação é praticamente inexistente para a maioria dos laboratórios que realizam os testes parasitológicos diretos para diagnóstico do *T. vivax*.

7. CONCLUSÃO

O uso da “Técnica de Lise e Concentração” (LCTe) permitiu o aumento da assertividade diagnóstica principalmente em avaliadores com menor conhecimento, além disso, possibilitou a redução do tempo diagnóstico por avaliadores com maior conhecimento. A LCTe favorece o diagnóstico do *T. vivax* em baixas parasitemias pois permite maior concentração dos hemoprotozoários ao eliminar as hemácias. Além dos benefícios citados, a LCTe

tem custo irrisório, além de sua facilidade de implementação em laboratórios já existentes.

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; TEBALDI, J. H.; ALESSI, A. C.; MACHADO R. Z.; NASCIMENTO, A. A. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 669-676, 2010.

ALVES W.P; CUGLOVICI D.A; FURTADO L.F.V.; SILVEIRA J.A.G.; FACURY FILHO E.J.; RIBEIRO M.F.B.; RABELO E.M.L. Comparison of three methods for diagnosis of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in cattle. **Genetics and Molecular Research**. 2017.

ANDRIANARIVO, A. G.; MUYRA, P.; OPOLLO, M. M.; LOGAN-HENFREY, L. L. *Trypanosoma congolense*: comparative effects of a primary infection on bone marrow progenitor cells from N'dama and Boran cattle. *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 80, n. 3, p. 407-418, 1995.

ANOSA, V. O.; ISOUN, T. T. Haematological studies on *Trypanosoma vivax* infection of goats and intact and splenectomized sheep. *Journal of Comparative Pathology*, Edinburgh, v. 90, n. 1, p. 155-168, 1980.

BATISTA J.S.; BEZERRA F.S.B.; LIRA R.A.; CARVALHO J.R.G.; ROSADO NETO A.M.; PETRI A.A.; TEIXEIRA M.M.G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesq. Vet. Bras**. 2008.

BATISTA J.S.; RIETXCORREA F.; TEIXEIRA M.M.G.; MADRUGA C.R.; SIMÕES S.D.V.; MAIA T.F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet. Parasitol**. 2007.

BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. G.; MADRUGA, C. R.; SIMÕES, S. D. V.; MAIA, T. F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle

in the Brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 143, n. 2, p. 174-181, 2007.

BRENER Z. 1961. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tese de Livre Docência, UFMG, Belo Horizonte. 90p. Camus E. & Martrenchar A. 1990. Infection expérimentale de zebus guyanais avec *Trypanosoma vivax*. *Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.* 43:467-472.

CADIOLI F.A.; BARNABÉ P.A.; MACHADO R.Z.; TEIXEIRA M.C.A.; ANDRÉ M.R.; SAMPAIO P.H.; FIDÉLIS JUNIOR O.L.; TEIXEIRA M.M.; MARQUES L.C. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brasil. **Revta Bras. Parasitol. Vet.** 2012.

CADIOLI F.A.; FIDELIS JUNIOR O.L.; SAMPAIO P.H.; DOS SANTOS G.N.; ANDRE M.R.; GARCIA A.C., KAYO J.M.; ROSANGELA Z.. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. *Veterinary Parasitology*, v. 214, n. 1X2, p. 174X177, 2015.

CARVALHO A.U.; ABRÃO D.C.; FACURY FILHO E.J.; PAES P.R.O.; RIBEIRO M.F.B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 2008.

CASTILHO NETO K. J. G. A.; FAVARO A. B. C.; FIDELIS JUNIOR G. O. L.; WALTER BETERQUINI NAGATA W. B.; ANDRÉ M.R.; TEIXEIRA M.M.G.; MACHADO R. Z.; CADIOLI F.A. Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 2021.

CHAPPUIS, F. Options for field diagnosis of human African trypanosomiasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 1, p. 133-146, 2005.

CLAUSEN, P. H.; WIEMANN, A.; PATZELT, R.; KAKAIRE, D.; POETZSCH, C.; PEREGRINE, A.; MEHLITZ, D. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. In naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. *Annals of The New York Academy of Sciences*, New York, v. 849, p. 21-31, 1998.

COSTA, A. C.; LOPES, F. C.; CASTRO, A. J.; VALE, D. L.; SILVA, T. F.; FREITAS, C. I. A.; BATISTA, J. S. Trypanossoma vivax: infecção natural afetando a produção de vacas leiteiras. In; **CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA**, 10., 2013, Belm, Anais Eletrônicos. Belém: UFPA, 2013.

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

DESQUESNES M, DAVILA AM. Applications of PCR-based tools for detection and identifcation of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Vet Parasitol.** 2002.

DESQUESNES M. ; GONZATTI M. ; SAZMAND A. ; THÉVENON S. ; BOSSARD G. ; BOULANGÉ A. ; GIMONNEAU G. ;TRUC P. ;HERDER S.; RAVEL S.;SERENO D. ;JAMONNEAU V.T. ; JITTAPALAPONG S. ;JACQUIET P. ; SOLANO P.; BERTHIER D.. A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. **Parasites & Vectors.** 2022.

earchgate.net/publication/330917917_Parasitological_Hematological_and_Immunological_Response_of_Experimentally_Infected_Sheep_with_Venezuelan_Isolates_of_Trypanosoma_evansi_Trypanosoma_equiperdum_and_Trypanosoma_vivax/>

FIDELIS OL JR, SAMPAIO PH, GONÇALVES LR, ANDRÉ MR, MACHADO RZ, WIJFFELS J.l. Comparison of conventional and molecular techniques for Trypanosoma vivax diagnosis in experimentally infected cattle. **Rev Bras Parasitol Vet.** 2019.

GARDINER P.R.; ASSOKU R.K.G.; WHITELAW D.D.; MURRAY M. Haemorrhagic lesions resulting from Trypanossoma vivax infection in Ayrshire cattle. **Vet. Parasitol.** 1989.

GARDINER, P. R.; ASSOKU, R. K. G.; WHITELAW, D. D.; MURRAY, M. Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection in Ayrshire cattle. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 31, n. 3-4, p. 187-197, 1989.

GIMENEZ, N. P.; BELLO, A. R. Parasitological, Hematological, and Immunological Response of Experimentally Infected Sheep with Venezuelan isolates of *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma vivax* *Journal of Parasitology Research*, 2019. Disponível em: <<https://www.res>

HOARE, C. A. The Salivaria: Subgenus *Duttonella* Chalmers, 1918. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. Cap. 11, p. 401-429

LAOHASINNARONG, D.; THEKISOE, O. M. M.; MALELE, I.; NAMANGALA, B.; ISHII, A.; GOTO, Y.; KAWAZU, S.; SUGIMOTO, C.; INOUE, N. Prevalence of *Trypanosoma* sp. in cattle from Tanzania estimated by conventional PCR and loopmediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitology Research*, Berlin, v. 109, n. 6, p. 1735-1739, 2011.

LOSOS, G. J. Infectious tropical diseases of domestic animals. Harlow Essex: Longman Scientific and Technical, 1986. 938 p.

LOSOS, G. J.; IKEDE, B. O. Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodiesiense* and *T. gambiesiense*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 1-71, 1972.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER, I. B.; RIBEIRO, L. R.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MIGUITA, M.; MELO, E. P. S.; ALMEIDA, R. F. C.; LIMA JR, M. M. S. C. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 801-807, 2006

MORAES, M. A. V. *Trypanosoma vivax*: Infecção experimental em bovinos (*Bos indicus*). 2001. 104 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2001.

MOSSAAD, E.; SALIM, B.; SUGANUMA, K.; MUSINGUZI, P.; HASSAN, M. A., ELAMIN, E. A., MOHAMMED, G. E.; BAKHIET, A. O.; XUAN, X.; SATTI, R. A.; INOUE, N. *Trypanosoma Vivax* is the Second Leading Cause of Camel

Trypanosomosis in Sudan after Trypanosoma Evansi .Parasites & Vectors, v. 10, n. 176, 2017. Disponível em < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28403897/>

MURRAY, M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 71, n. 4, p. 325-326, 1977.

NANTULYA, V. M. Trypanosomiasis in domestic' altimals: the problems of diagnosis. Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties, Paris, v. 9, n. 2, p. 357-367, 1990.

NJIRU, Z.; OUMA, J.; BATETA, R. NJERU, S. E.; NDUNGU, K.; GITONGA, P. K.; GUYA, S.; TRAUB, R. Loop-mediated isothermal amplification test for Trypanosoma vivax based on satellite repeat DNA. Veterinary Parasitology, v. 180, p. 358-362, 2011.

OKELLO I.; MAFIE E.; EASTWOOD G.; NZALAWAHE J.; MBOERA L. E. G. African Animal Trypanosomiasis: A Systematic Review on Prevalence, Risk Factors and Drug Resistance in Sub-Saharan Africa. **Journal of Medical Entomology**. 2022.

ONO, M. S. B.; SOUTO, P. C.; CRUZ, J. A. L. O.; GUERRA, N. R.; GUIMARÃES, J. A.; DANTAS, A. C.; ALVES, L. C.; RIZZO, H.; Surto de Trypanosoma vivax em Rebanhos Bovinos na Zona da Mata do Estado de Pernambuco; Medicina Veterinária UFRPE, v. 11, n. 2, p. 96 –101, 2017. Disponível em <<http://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/download/1737/1537>

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

SILVA R.A.M.S.; RAMIREZ E.S.S.L.L.; SOUZA S.S.; ORTIZ A.G.; PEREIRA S.R.; DÁVILA A.M.R. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian Wetlands. **Vet. Parasitol.** 1999.

SILVA R.A.M.S.; SANCHEZ V.; DÁVILA A.M.R. Métodos de Diagnósticos Parasitológicos das Tripanosomoses Bovinas e Equinas. Circ. Téc. 41, **Embrapa Pantanal**, Corumbá, MS. 3p. 2003.

SILVA R.A.M.S.; SEIDL A.; RAMIREZ L.; DAVILA A.M.R. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. **Embrapa Pantanal**, Corumbá, MS. 137p. 2002.

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

SILVA, Roberto Aguilar Machado Santos; SEIDL, Andrew; RAMIREZ, Laura; DÁVILA, Alberto Martín Rivera. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax***: Biologia, Diagnóstico e Controle. 1. ed. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 137 p. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/810940/1/Livro015.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2022.

SOUZA, A. L.; ALVES, A. L. ROCHA, A. R.; BORGES, A. V. F.; REIS, K. B.; SILVA, L. C. S.; OLIVEIRA, L. C.; MAGALHÃES, L. A.; GONÇALVES, M. L. O.; LEMES, N. C. R.; OLIVEIRA, T. R.; SILVA, W. F.; COSTA, C.; SOUSA, F. A.; RIBEIRO, L. F. *Tripanossomose Bovina em um Rebanho Leiteiro no Município de Monte Carmelo, Minas Gerais: Relato de caso. Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 13, n. 10, p. 1-5, 2019. Disponível em < *Tripanossomose bovina em um rebanho leiteiro no município de Monte Carmelo, Minas Gerais: relato de caso* | PUBVET

UNSWORTH, K.; BIRKETT, J. D. The use of antrycide prosalt in protecting cattle against trypanosomiasis when in transit through tse-tse areas. *Veterinary Record*, London, v. 64, p. 351-353, 1952

VAN DEN BOSSCHE, P.; SHUMBA, W.; NJAGU, C.; SHERENI, W. The distribution of bovine *Trypanosomosis* in Zimbabwe and an evaluation of the value of an antitrypanosomal antibody detection ELISA as a tool for monitoring the effectiveness of Tse-tse control operations. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v. 33, n. 5, p. 391-405, 2001.

WILSON, A. J.; CUNNINGHAM, M. P. Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. IV. Patterns in the production of common antibodies. *Tropical Animal Health and Production*, v. 3, n. 3, p. 133-139, 1971.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. *Acta Tropica*, Basel, v. 27, n. 4, p. 384-386, 1970.