

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS,  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE  
*Trypanosoma Vivax* EM BOVINOS NO BRASIL**

**Angelo Estevão Sant'Anna Donadon**

Médico Veterinário

**2023**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS,  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE  
*Trypanosoma Vivax* EM BOVINOS NO BRASIL**

**Angelo Estevão Sant´Anna Donadon**

**Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Zacarias  
Machado**

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

D6741

Donadon, Angelo Estevão Sant'Anna

Levantamento soroepidemiológico de Trypanosoma vivax em bovinos no Brasil / Angelo Estevão Sant'Anna Donadon. -- Jaboticabal, 2023

62 p. : tabs., mapas

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

Orientadora: Rosângela Zacarias Machado

1. Medicina veterinária. 2. Doença grandes animais. 3. Trypanosoma vivax. 4. Soroepidemiologia. 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.

### **Impacto potencial desta pesquisa**

Esta dissertação teve por objetivo detectar anticorpos anti- *Trypanosoma vivax* em rebanhos bovinos no Brasil. Com os resultados obtidos, demonstrou-se que este parasita vem causando prejuízos econômicos na produção nacional de leite e carne bovina.

### **Potential impact of this research**

This dissertation aimed to detect anti- *Trypanosoma vivax* antibodies in cattle herds in Brazil. With the obtained results, it was demonstrated that this parasite causes economic damage in the national milk and beef production

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DO BRASIL

AUTOR: ANGELO ESTEVÃO SANT'ANNA DONADON  
ORIENTADORA: ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:




Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dr. ANDRÉA PEREIRA DA COSTA (Participação Virtual)  
Depto. de Patologia / Universidade Estadual do Maranhão - São Luís/MA



Documento assinado digitalmente  
ANDRÉA PEREIRA DA COSTA  
Data: 21/01/2023 11:57:54-0300  
Verifique em <https://verificador.br.br>



Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV UNESP Câmpus de Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de janeiro de 2023

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Angelo Estevão Sant'Anna Donadon, nascido em 17 de junho de 1993, na cidade de Bebedouro- SP, ingressou no curso técnico em agropecuária na Escola Técnica Estadual Prof. Matheus Leite de Abreu, Mirassol- SP, em 2008, colando grau em 2010. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF) de Garça - SP em fevereiro de 2012, colando grau em janeiro de 2017. Em março 2017, ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional em Clínica Médica de Grandes Animais na Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA) da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Araçatuba – SP, finalizando em fevereiro de 2019. Em março de 2019, 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 da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Aldo Humberto Donadon e Sônia Maria Sant'Anna Donadon, por serem os pilares da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pois sem ELE nada seria na vida.

Aos meus pais, Aldo Humberto Donadon e Sônia Maria Sant'Anna, por todo carinho, educação e sabedoria que me forneceram durante toda a vida e minha irmã Camila Sant' Anna Donadon por sempre estar presente em minha vida incentivando e apoiando.

A minha namorada Brenda Mendonça de Alcântara, pelo imenso apoio e paciência comigo nos momentos mais difíceis.

À Professora Dra. Rosangela Zacarias Machado, pela orientação na pós-graduação e pela sabedoria e disposição em ensinar, que foram fundamentais para minha evolução como pessoa e pesquisador.

Aos colegas da pós-graduação, pela amizade.

A todos aqueles que não citei anteriormente, mas que contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e acadêmico direta ou indiretamente.

À IMUNODOT, pelo fornecimento dos dados para o desenvolvimento do trabalho.

À CEVA Saúde Animal S.A, pelo envio de amostras para a realização dos testes sorológicos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias por terem me acolhido para a realização do curso de Mestrado Acadêmico.

À CAPES, pela bolsa de Mestrado concedida.

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



## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
3. Referências	11
CAPÍTULO 2 - Levantamento soroepidemiológico de <i>Trypanosoma vivax</i> em bovinos no Brasil	19
Introdução	20
Resultados	23
Discussão	27
Referências	31
Anexos	38
Tabelas	38



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Análise de indicadores econômicos e produtivos em propriedades com surto de *Trypanosoma vivax* na região Sudeste do Brasil**", protocolo nº 010276/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 15 de agosto de 2019.

Vigência do Projeto	01/09/2019 a 01/05/2020
Espécie / Linhagem	Bovina
Nº de animais	400 animais
Peso / Idade	400 kg / Média 4 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Estância Nogueira

Jaboticabal, 15 de agosto de 2019.

*Fabiana Pilarski*  
**Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellano, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal-SP - Brasil  
tel. 13 3209 7100 - www.fcv.unesp.br

## LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE *Trypanosoma Vivax* EM BOVINOS NO BRASIL

**RESUMO-** O *Trypanosoma vivax* é responsável por significativas perdas econômicas na bovinocultura da América do Sul e África. No Brasil, observa-se a disseminação da doença em bovinos nos países, através dos relatos de surtos que encontramos na literatura. Durante o ciclo de vida do parasita, observam-se diferentes fases. Onde ocorrem períodos de alta parasitemia com a presença na circulação sanguínea e baixa parasitemia podendo estar em órgãos, gordura e pele. Os métodos de diagnósticos utilizados são: parasitológico necessitando a presença do parasita circulante, métodos imunológicos realizando a detecção de anticorpos no soro dos animais e métodos moleculares detectando a presença do DNA do parasita. Nos métodos imunológicos o Elisa teste é o mais indicado devido sua sensibilidade e especificidade. Neste estudo, foi utilizado para o Elisa teste a proteína recombinante Tv (Imunodot®). O estudo avaliou amostras de soros bovinos de propriedades com suspeita de infecção de *T. vivax*, no período de junho de 2020 a julho de 2021. As amostras de soros foram coletadas e enviadas de 14 estados brasileiros, provenientes de 287 municípios, totalizando 5.114 amostras, das quais 2.886 positivas (56,5%) e 2.228 amostras negativas (43,5%). As positivas foram classificadas em positivas fracas, médias e fortes. Dessa forma, foi possível obter um panorama de como o *T. vivax* vem se disseminando pelos estados e pelos municípios do território nacional desde os primeiros relatos até os dias de hoje.

Palavras-chave: Elisa-teste, *Trypanosoma vivax*, tripanossomíase, sorologia, proteína recombinante e epidemiologia.

## **SEROEPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF *Trypanosoma Vivax* IN CATTLE IN BRAZIL**

**ABSTRACT-** *Trypanosoma vivax* is responsible for significant economic losses in cattle in South America and Africa. In Brazil, the spread across the country is observed due to reports of outbreaks found in the literature. Due to the life cycle of the parasite, different phases are observed, where there are phases of high parasitaemia with the presence in the circulation and low parasitaemia that may be in organs, fat and skin. The diagnostic methods used are: parasitological requiring the presence of the circulating parasite, immunological methods performing the detection of antibodies in the serum of the animals and molecular methods detecting the presence of the parasite's DNA. In immunological methods, the Elisa test is the most indicated due to its sensitivity and specificity. In this study, we used the recombinant protein Tv (Imunodot®) for the Elisa test. The study evaluated samples of bovine sera from properties with suspected *T. vivax* infection, from June 2020 to July 2021. Samples were collected and sent from fourteen Brazilian states, from 287 municipalities, totaling 5.114 samples, from of which 2.228 negative samples (43.5%) and 2.886 positive (56.5%) positive samples were divided into weak positive, medium positive and strong positive. In this way, it was possible to obtain an overview of how *T. vivax* is spreading through the states and municipalities of the national territory from the first reports to the present day.

**Keywords:** Elisa test, *Trypanosoma vivax*, trypanosomiasis, serology, recombinant protein and epidemiology.

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### 1. Introdução

Hemoparasitas do gênero *Trypanosoma* acometem humanos e espécies de animais domésticos e silvestres nos continentes africano, asiático e americano (Dávila et al., 2003). No continente africano, as espécies *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma congolense* são as principais causadoras de enfermidades em bovinos, porém, as espécies *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma brucei brucei* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* também são encontrados em bovinos (Haji et al., 2015; Morrison et al., 2016). No continente americano, a espécie *T. vivax* é o principal agente da tripanosomíase, causando sinais clínicos da doença em ruminantes (Jones e Dávila, 2001). Há relatos de surtos da doença no Brasil desde os anos de 1972 chegando aos últimos anos (Shaw e Lainson, 1972; Batista et al., 2017; Lopes et al., 2018).

A transmissão desse protozoário no continente africano é cíclica, e se dá principalmente pela picada das moscas do gênero *Glossina* spp. (tsé-tsé) (Cuglocivi et al., 2010; Laohasinnarong et al., 2015), e há relatos de transmissão mecânica em regiões que não se encontra a presença da *Glossina* spp. (Giordani et al., 2016).

No continente americano, não há moscas do gênero *Glossina*, a forma de transmissão é mecânica ou não cíclica em outros insetos picadores e sugadores sendo *Tabanus nebulosus*, *Tabanus importunus* e *Cryptotylus unicolor*, principalmente em regiões inundáveis do pantanal brasileiro e boliviano, Colômbia e Guiana Francesa (Madruga, 2004; Osório et al., 2008). Localidades não inundáveis, *Stomoxys calcitrans* tem papel fundamental na transmissão do parasita nos rebanhos bovinos, devido ao aumento de sua população na estação chuvosa ou pela utilização de resíduos de usinas de álcool e açúcar nos canaviais que estão em torno das propriedades, em conjunto com temperaturas ambientes acima de 20°C (Batista et al., 2007; Cadioli et al., 2012; Cuglovici et al., 2010). Outra espécie *Haematobia irritans*, possui grande importância na transmissão de *T. vivax*, visto que o parasita já foi detectado na probóscide e tórax-abdômen da mosca (Salas et al., 2017).

No decorrer da infecção causada por *T. vivax*, observam-se flutuações da parasitemia, ocorrendo até mesmo intervalos aparasitêmicos (Moraes, 2001;

Almeida et al., 2010; Fidelis Junior et al., 2016). Recentemente Machado et al. (2021) apresentaram em seu estudo com caprinos experimentalmente infectados por *T. vivax*, o achado de lesões em muitos tecidos inclusive tecido adiposo e pele, podendo justificar as fases de baixa parasitemia ou aparasitemia. Devido aos sinais clínicos inespecíficos e períodos de baixa parasitemia ou aparasitêmicos, realizar o diagnóstico do parasita é desafiador, podendo este ser realizado por métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (Fidelis Junior et al., 2016).

Os métodos parasitológicos utilizados são a técnica de gota espessa (Brenner, 1961), centrifugação de micro hematócrito (Woo, 1970), esfregaço da camada leucocitária corada (buffy coat) (Murray et al., 1977) e esfregaço sanguíneo corado (Ndao et al., 2000), demonstrando baixa sensibilidade em hospedeiros na fase crônica da infecção, devido a baixa parasitemia (Rebeski et al., 1999; Waal, 2012; Haji et al., 2015, Fidelis Junior et al., 2016). Nas fases de baixa parasitemia ou aparasitemia, o diagnóstico baseado na resposta imunológica humoral, como ELISA, se torna uma ferramenta de extrema importância, por apresentar maior sensibilidade, tornando-se a principal forma para a realização de “screening” de rebanhos suspeitos tanto no continente americano (Osório et al., 2008), quanto africano (Dagnachew e Bezie, 2015). Os métodos sorológicos indiretos indicam o contato do hospedeiro com o parasita, impossibilitando identificar se a doença está ativa ou não (Nantulya, 1990). A persistência de anticorpos contra *T. vivax* no hospedeiro pode ocorrer ou não por longos períodos após o tratamento, e esta detecção pode variar de acordo com a natureza do antígeno utilizado nos ensaios, apresentando permanência por trinta a cem dias (Bengaly et al., 2001; Pillay et al., 2013). Um fator a ser considerado sobre métodos de diagnóstico imunológicos indiretos são que esses métodos tendem a não detectar animais soropositivos no início da infecção (Sampaio, 2017). Deste modo o presente estudo teve como objetivo avaliar resultados de Elisa teste de amostras de soros bovinos de propriedades com suspeita de infecção natural e assim buscando o entendimento sobre como o *T. vivax* vem se disseminando pelo país.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 Etiologia e Taxonomia

Hemoparasitas do gênero *Trypanosoma* acometem humanos e espécies de animais domésticos e silvestres nos continentes, Africano, Asiático e Americano (Dávila et al., 2003). No continente Africano as espécies *Trypanosoma vivax* e *T. congolense* são as principais causadoras de enfermidades em bovinos e sendo responsáveis pelo impacto econômico na atividade, porém as espécies *T. evansi*, *T. b. brucei* e *T. b. rhodesiense* são encontrados em bovinos (Haji et al., 2015; Morrison et al., 2016). No continente Americano a principal espécie *T. vivax* é o agente, causando sintomas clínicos como perda de peso, anemia e problemas reprodutivos em ruminantes (Jones e Dávila, 2001), porém, as espécies *T. evansi* e *T. theileri* também são encontradas parasitando bovinos e bubalinos, *T. evansi* por sua vez quase não apresenta sintomas clínicos nos bovinos e *T. theileri* é apatogênica (Dávila et al., 2003; Rodrigues et al., 2003; Gonzales et al., 2007; Ramírez-Iglesias et al., 2017).

*Trypanosoma vivax* é um protozoário da ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina e família pertence ao gênero *Trypanosoma*, subgênero *Duttonella* (HOARE, 1972).

### 2.2 Morfologia

O *T. vivax* apresenta forma variável de circular a elíptica, apresentando cinetoplasto grande e localizado na porção subterminal, sendo a posição um fator de identificação morfológica da espécie (Moraes, 2001). O *T. vivax* pode ser caracterizado por possuir único flagelo livre e de tamanho variado, sendo descritos parasitos medindo de 13,72 até 31  $\mu\text{m}$  de comprimento. Isolados de *T. vivax* de vários países da América do Sul após estudos morfométricos, mostrou-se morfológicamente próximos aos isolados de *T. vivax* encontrados na África Ocidental, indicando que os protozoários encontrados no continente Americano possuem origem a partir daquela região (Jones e Dávila, 2001). É um protozoário pleomórfico, apresentando na corrente sanguínea de vertebrados a forma tripomastigota, onde se multiplica por fissão binária (Uilenberg e Boyt, 1998). Análises filogenéticas utilizando cepas de *T. vivax*

provenientes de países da América do Sul, e países da África Ocidental e Oriental, demonstraram que possui algumas diferenças genotípicas, sendo assim o *T. vivax* do “Novo Mundo” filogeneticamente próxima aos parasitos da África Ocidental, reforça a hipótese que os isolados da América do Sul são provenientes de ancestrais comuns, introduzidos no continente a partir da África Ocidental (Garcia, et al., 2014).

### 2.3 Ciclo Biológico e Transmissão

O gênero *Trypanosoma* é dividido em seções Salivaria e Stercoraria. Os tripanosomas que pertencem à seção Stercoraria se desenvolvem no interior do tubo digestório posterior dos vetores e a transmissão se dá por meio das fezes durante a picada (Hoare, 1972).

Os parasitos da seção Salivaria o ciclo de desenvolvimento ocorre no interior do vetor e completado no tubo digestório anterior, se localizando nas glândulas salivares e probóscide, realizando a transmissão através de inoculação da saliva de seus vetores durante alimentação. A seção Salivaria pode ser dividida em quatro subgêneros *Trypanosoma* (*Dutonella*), *Trypanosoma* (*Nannomonas*), *Trypanosoma* (*Pycnomonas*) e *Trypanosoma* (*Trypanozoon*). Sendo o *T. vivax* um hemoprotozoário pertencente à família Trypanosomatidae, seção Salivaria, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Trypanosoma* (*Dutonella*).

As formas de transmissão deste protozoário têm suas particularidades nos continentes; no continente Africano, nas regiões onde a mosca do gênero *Glossina* spp. (tsé-tsé) estão presentes, a transmissão ocorre ciclicamente (Cuglocivi et al., 2010; Laohasinnarong et al., 2015), na América possui relatos de transmissão mecânica em regiões que não se encontra a presença da *Glossina* spp. (Giordani et al., 2016) e não cíclica em outros invertebrados picadores sendo eles *Tabanus nebulosus*, *Tabanus importunus* e *Cryptotylus unicolor*, principalmente em regiões inundáveis do pantanal brasileiro e boliviano, Colômbia e Guiana Francesa (Madruga, 2004; Osório et al., 2008). Em localidades não inundáveis a *Stomoxys calcitrans* tem papel fundamental na transmissão da doença nos rebanhos bovinos, devido o aumento de sua população durante estação chuvosa ou pela utilização de resíduos de usinas de álcool e açúcar nos canaviais que estão em torno das propriedades, em



conjunto com temperaturas ambientes acima de 20°C (Batista et al., 2007; Cadioli et al., 2012; Cuglovici et al., 2010). Outro gênero de invertebrado picador *Haematobia irritans* possui grande importância na transmissão do *T. vivax* em uma propriedade, devido o parasita já ter sido detectado na probóscide e tórax-abdômen da mosca (Salas et al., 2017).

#### 2.4 Formas de Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no Brasil

O primeiro caso relatado no Brasil de tripanossomíase ocorreu em 1972 em búfalos que ocupavam áreas alagadas na cidade de Belém, estado do Pará (Shaw e Lainson, 1972). Mais adiante o *T. vivax* foi diagnosticado no Amapá (Serra Freire, 1981), nos estados do Mato Grosso (Silva et al., 1996) e Mato Grosso do Sul (Paiva et al., 1997; Barbosa et al., 2001) na região do pantanal. Foram observados surtos da tripanossomíase no Maranhão (Feitosa Júnior et al., 2004), Tocantins (Linhares et al., 2004), Paraíba (Batista et al., 2007), Minas Gerais (Carvalho et al., 2008), Rio Grande do Sul (Silva et al., 2009), Pernambuco (Pimentel et al., 2012), São Paulo (Cadioli et al., 2012), Alagoas (Andrade Neto et al., 2015), Santa Catarina (Fávero et al., 2016), Goiás (Bastos et al., 2017), Sergipe (Vieira et al., 2017), Ceará (Batista et al., 2017) e Piauí (Lopes et al., 2018).

Com relação à distribuição geográfica de *T. vivax*, houve uma rápida disseminação desse parasita no Brasil e nos países Sul Americanos, principalmente pela ocorrência de rotas de transporte e comércio de bovinos entre as regiões. Por consequência, a introdução de animais portadores favorece a disseminação do protozoário, especialmente pelas condições climáticas favoráveis à presença de vetores mecânicos. Outra situação é a utilização compartilhada de agulhas e seringas (Silva et al., 1998; Jones e Dávila, 2001; Gonzales et al., 2007; Cadioli et al., 2012).

#### 2.5 Patogenia

Segundo Shaw e Lainson (1972) e Gonzalez et al. (2007) os diferentes tamanhos de flagelo são associados com a patogenicidade do isolado, infectados com *T. vivax* de diferentes tamanhos apresentavam hematócrito e escore corporal diferentes. Segundo Silva et al. (1996), animais infectados com parasitas menores apresentaram quadro de doença aguda e parasitos maiores

estão relacionados a infecções crônicas.

## 2.6 Resposta Imune

No decorrer da infecção causada por *T. vivax*, a imunossupressão do hospedeiro é relatada e há predisposição a co-infecções ou falhas vacinais contra outros patógenos (Giordani et al., 2016; Yaro et al., 2016). Observam-se flutuações da parasitemia ocorrendo até mesmo intervalos aparasitêmicos (Moraes, 2001; Almeida et al., 2010; Fidelis Junior et al., 2016), que estão relacionados à resposta imunológica do hospedeiro e à variação antigênica das glicoproteínas variantes de superfície (GVS) dos tripanossomos (Nantulya, 1990; Cross, 2003; Stijlemans et al., 2010, Yaro et al., 2016). As glicoproteínas variantes de superfície revestem a superfície dos protozoários do gênero *Trypanosoma* spp. que pertencem a seção Salivaria, ocorrendo a perda e substituição na medida que há resposta de anticorpos do hospedeiro. Na literatura, descreve-se mais de 1000 genes diferentes, que permitem ao hemoprotozoário produzir mais de 10.000.000 de ondas sucessivas de antígenos GVS diferentes (Yaro et al., 2016), desta forma obtendo êxito a evasão do parasita do sistema imune do hospedeiro (Nantulya, 1990; Stijlemans et al., 2010).

## 2.7 Sinais Clínicos

Na infecção por *T. vivax* observa-se a ocorrência da doença clínica, constituída pelas fases aguda e crônica, das quais os sinais clínicos são poucos específicos podendo ser caracterizados por anemia, anorexia, apatia, febre, emagrecimento progressivo, diminuição da produção de leite, diarreia, abortamentos, metrite, infertilidade nos machos podendo apresentar esterilidade, sinais neurológicos e óbito (Batista et al., 2007; Oliveira et al., 2009; Cadioli et al., 2012; Betancur Hurtado et al., 2016; Fidelis Junior et al., 2016). Ainda, descrevem-se alterações nervosas de incordenação motora, dismetria, cegueira, fasciculações, tremores musculares e opistótono (Batista et al., 2007). Em isolados africanos de *T. vivax* altamente patogênico, descrevem-se a síndrome hemorrágica aguda, tratando-se da forma clínica mais grave da doença com alta taxa de mortalidade, caracterizada por hemorragias em mucosa nasal, orelhas e trato gastrointestinal (Magona et al., 2008).

## 2.8 Perdas Econômicas

Porém, o impacto econômico que o *T. vivax* gera nos rebanhos bovinos é complexo para ser calculado, porém vem sendo estimado em 4.5 bilhões de dólares por ano, com perdas diretas e indiretas na bovinocultura africana (Yaro et al., 2016). Segundo Mateus et al., (1992) o prejuízo por animal chega a US\$72,00 e as perdas em um rebanho podem chegar a US\$1.000.000,00. A dificuldade em calcular as perdas econômicas com precisão está relacionada ao fato de existirem doenças concomitantes à tripanosomiase (Touratier, 1993). Seidl et al. (1999) estimaram o custo da enfermidade de US\$ 14,68 por animal ou 4% do valor estimado do rebanho. Sem a realização de tratamento os custos se elevaram a US\$ 64 por animal chegando a 17% do valor total do rebanho. Segundo Stevenson et al. (1995) os custos para o tratamento podem chegar a US\$ 37,80 por animal. Relatos sobre a diminuição de produção leiteira nos rebanhos infectados ocorrem de 20 a 25% (MATEUS, et al., 1992). Outros relatos calculam a perda de produção de 27 a 28,5% da produção total (Carvalho et al., 2008; Bastos et al., 2017); segundo Costa et al. (2013) a queda na produção pode chegar a 41,6% em rebanhos leiteiros.

## 2.9 Diagnóstico

Devido aos sinais clínicos inespecíficos e também a presença de períodos de baixa parasitemia ou aparasitemicos, fazer o diagnóstico da doença é desafiador, podendo ser realizado por métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (Fidelis Junior et al., 2016). Os métodos parasitológicos utilizados são a técnica de gota espessa (Brenner, 1961), centrifugação de micro hematócrito (Woo, 1970), esfregaço da camada leucocitária corada (buffy coat) (Murray et al., 1977) e esfregaço sanguíneo corado (Ndao et al., 2000), porém apresentam baixa sensibilidade em hospedeiros na fase crônica da infecção, devido a associação com a baixa parasitemia (Rebeski et al., 1999; Waal, 2012; Haji et al., 2015, Fidelis Junior et al., 2016). Ainda assim, as técnicas citadas anteriormente são utilizadas comumente para o diagnóstico em áreas com poucos recursos ou como triagem (Sow et al., 2012; Dagnachew et al., 2015).

Em consequência às fases de baixa parasitemia ou aparasitemia, o diagnóstico baseado pela resposta imunológica humoral, como ELISA é a ferramenta de extrema importância para o diagnóstico, por apresentar maior

sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos, tornando-se a forma principal para realização de “screening” de rebanhos suspeitos tanto no continente Americano (Osório et al., 2008) e Africano (Dagnachew e Bezie, 2015). Todavia, os métodos sorológicos indiretos indicam o contato do hospedeiro com o parasito, impossibilitando identificar se a doença está ativa ou não (Nantulya, 1990). A persistência de anticorpos contra *T. vivax* no hospedeiro pode ocorrer por longos períodos após o tratamento, por período variável de acordo com a natureza do antígeno utilizado nos ensaios, pois a literatura apresenta permanência por trinta a cem dias (Bengaly et al., 2001; Pillay et al., 2013), entretanto, outro estudo observaram que após o tratamento os níveis de anticorpos diminuía chegando a ausência de resposta nos trinta dias (Castilho Neto et al., 2021). Um fator a ser considerado sobre métodos de diagnóstico imunológicos, é que esses métodos tendem a não detectar animais infectados nos dias iniciais, comprometendo o diagnóstico do rebanho infectado precocemente, favorecendo a disseminação do parasito (Sampaio, 2017). Outro ponto a ser considerado sobre a técnica de ELISA é a possibilidade de ocorrer reação sorológica cruzada entre espécies de tripanosomas, incluindo *T. b. brucei*, *T. evansi*, *T. congolense* e *T. theileri*, observada em ensaios de imunodiagnóstico com a utilização de antígenos brutos solúveis (Luckins, 1977; Desquesnes et al., 2001; Jones e Dávila, 2001). Para o isolado GCTvPPO1-CO de *T. vivax*, o teste de ELISA utilizando antígeno bruto solúvel, apresentou alta sensibilidade (97,6%) e especificidade (96,9%) para o diagnóstico sorológico por *T. vivax*, e obtendo valor muito baixo de reação cruzada com *T. evansi* (Madruga et al., 2006). Portanto, essa técnica recomendada. Vale ressaltar que a presença de *T. brucei* e *T. congolense* ainda não foi diagnosticada em nosso país, mas existe a possibilidade de reação cruzada com *T. evansi* e *T. theileri*. Por outro lado o *T. evansi* não apresentam sinais clínicos nos bovinos.

Métodos moleculares estão sendo empregados para a realização de diagnóstico da tripanossomíase, entre eles a reação em cadeia de polimerase (PCR) (Cortez et al., 2009). Oligonucleotídeos são utilizados como indicadores específicos para uma região de DNA, sendo uma técnica com alta especificidade para *Trypanosoma* spp, demonstrando bons indicadores para detecção da presença de DNA de *T. vivax* no sangue de bovinos, animais que

apresentam parasitemia indetectável nos exames parasitológicos diretos são detectados nessa técnica (Garcia et al., 2005). Esse teste auxilia na detecção dos animais que estão com a infecção ativa, pois alguns indivíduos podem apresentar níveis baixos de anticorpos, podendo ser negativos em exames parasitológicos e imunológicos. Uma das dificuldades encontradas para essa técnica são as amostras inadequadas obtidas a campo, devido à contaminação por resquícios de heparina, mioglobina, hemoglobina livre, anticorpos e fezes, afetando a sensibilidade do teste (Schrader et al., 2012). A amplificação circular isotérmica do DNA (LAMP) se apresenta como uma técnica menos susceptível para a presença de inibidores nas amostras sanguíneas do que a técnica de PCR convencional (Grab et al., 2011). A LAMP é uma técnica de execução simples, rápida, podendo ser realizada em locais que possuem recursos laboratoriais limitados (Notomi et al., 2000; Njiru et al., 2011). As vantagens da LAMP em relação a PCR são a utilização de equipamentos para aquecimento simples, mantendo a temperatura entre 60 e 65°C e a amplificação pode ser realizada sem submeter as amostras à extração de DNA (Grab et al., 2011). Outra vantagem que essa técnica demonstra maior capacidade de detecção que a PCR e testes parasitológicos, até mesmo em amostras sanguíneas de bovinos supostamente aparasitêmicos (Cadioli et al., 2015; Haji et al., 2015; Laohasinnarong et al., 2015; Sampaio, 2017). Porém no Brasil ainda não foram identificados o *T. b. brucei* e *T. congolense*. Portanto, a reatividade cruzada na sorologia ocorreria com *T. evansi* e *T. theileri*.

## 2.10 Tratamento e Profilaxia

Quanto ao tratamento, no continente africano, as principais moléculas utilizadas para a quimioterapia e quimioprofilaxia da tripanossomíase animal são o aceturado de diminazene, cloridrato de isometamidium e cloridrato de homidium (Giordani et al., 2016). Para controlar a dispersão do parasita, o controle de vetores é realizado por meio de armadilhas e inseticidas (Sow et al., 2012). No continente Americano são utilizados fármacos tripanocidas, sendo o aceturato de diminazene o mais utilizado, em algumas regiões o cloridrato de isometamidium vem sendo o fármaco de eleição para o tratamento. Foram relatados no continente Sul Americano que isolados de *T. vivax* apresentaram resistência ao aceturato de diminazene, devido a

observação de parasitas circulantes após alguns dias da utilização desse fármaco para o tratamento, inclusive no Brasil, onde evidências de resistência foram observadas a esse fármaco (Jones e Dávila, 2001; Gonzales et al., 2007; Cadioli et al., 2012; Bastos et al., 2017; Sampaio, 2017).

A farmacocinética do cloridrato de isometamidium mostra que, após sua aplicação, o pico da concentração plasmática é atingida dentro de uma hora, durante a primeira semana após tratamento ocorre uma queda relativamente rápida, após esse período a diminuição da concentração plasmática é mais gradual. A meia vida do fármaco é relatada de aproximadamente de dez a vinte e cinco dias. O fármaco se acumula no local da aplicação, rins, fígado e baço, e, a partir desses locais ocorre sua liberação lenta para o plasma, realizando sua função profilática. A excreção dos resíduos ocorre através do suco biliar principalmente e também se relata a presença de baixos níveis no leite (Giordani et al., 2016). Estudos com *T. congolense* sugere que o mecanismo de ação da droga acontece por dois sistemas de transporte, o primeiro fundamentado em transporte passivo pela membrana plasmática e o segundo é o transporte ativo através da membrana mitocondrial (Koning, 2001).

No continente Africano a literatura demonstra que há controvérsias sobre a efetividade do cloridrato de isometamidium no tratamento de ruminantes infectados com *T. vivax*. Alguns autores observaram que a dose de 0,5mg/Kg do fármaco foi eficaz para o combate da infecção (Olila et al., 2002; Ogbage et al., 2015). Outros demonstraram que há ocorrência de isolados de *T. vivax* resistentes ao fármaco, utilizando a dosagem de 0,5 mg/Kg (Vitouley et al., 2012; Dagnachew et al., 2015) e 1mg/Kg (Awa e Ndamkou, 2006; Sow et al., 2012; Dagnachew et al., 2017). No Brasil o tratamento utilizando o fármaco tem se observado eficaz (Cadioli et al., 2012). A resistência aos fármacos se faz pela utilização errônea dos princípios ativos como a utilização por longo período de tempo, alta frequência de utilização do mesmo em um espaço pequeno de tempo, utilização de sub dosagens (Dagnachew et al., 2015; Dagnachew et al., 2017; Tekle et al., 2018). Outro fator importante é o pequeno número de fármacos tripanocidas disponíveis para comercialização e sua similaridade na composição química dos mesmos (Yaro et al., 2016).

### 3. Referências

- ANDRADE NETO, A. Q.; AFONSO, J. A. B.; MENDONÇA, C. L.; SOUTO, R. J.C.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Surtos de tripanossomíase em bovinos leiteiros no agreste dos estados de Pernambuco e Alagoas. **O biológico**. Resumos, v. 77, p.143, 2015.
- 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** v. 11, p. 669-676, 2010.
- AWA, D.N.; NDAMKOU, C.N. Response of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* in zebu cattle in North Cameroon to prophylactic treatment with two formulations of isometamidium. **Preventive Veterinary Medicine** v. 70, p. 90-96, 2006.
- BARBOSA JÚNIOR, R. N. S. et al. Descrição de surto de tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax*, com morte perinatal no Pantanal de Aquidauana, MS. In: **IV Congresso Brasileiro de Buiatria**. Resumos, Campo Grande, MS, p. 135, 2001.
- BASTOS, T. S. A.; FARIA, A. M.; MADRID, D. M. C.; BESSA, L. C.; LINHARES, G. F. C.; FIDELIS-JUNIOR, O. L.; SAMPAIO, P. H.; CRUZ, B. C.; CRUVINEL, L. B.; NICARETTA, J. E.; MACHADO, R. Z.; COSTA, A. J.; LOPES, W. D. Z. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, p. 366-371, 2017.
- BATISTA, J.S; RIET-CORREA, F.; TEXEIRA, 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** v. 143, p.174–181, 2007.
- BATISTA, J.S.; FREITAS, C.I.A.; SILVA, J.B.; CAVALCANTE, T.V.; PAIVA, K.A.R.; LOPES, F.C.; LIRA, R. Clinical evaluation and reproductive indices of dairy cows naturally infected with *Trypanosoma vivax*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 5, p. 3031-3038, 2017. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n5p3031
- BENGALY, Z.; KASBARI, M.; DESQUESNES, M.; SIDIBÉ, I. Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. **Veterinary Parasitology** v. 96, p. 101-113, 2001.
- BETANCUR HURTADO, O.J.; CASTRO, P.D.J.; GIRALDO-RIOS, C. Reproductive failures associated with *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*. **Veterinary Parasitology** v. 229, p. 54-59, 2016

BRENER, Z. **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas**. 1961 79 f. Tese (Livre Docência) Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia e Farmácia.

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.G.; MARQUES, L.C. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 21, p. 118-124, 2012.

CARVALHO, A. U.; ABRÃO, D. C.; FACURY FILHO, P. R. O.; RIBEIRO, M. F. B. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p. 769-771, 2008.

CORTEZ, A.P.; RODRIGUES, A.C.; GARCIA, A.H.; BATISTA, J.S.; BENGALY, Z.; PAIVA, F.; TEIXEIRA, M.M.G. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America – characterization, relationships and diagnostic implications. **Molecular and Cellular Probes** v. 23, p. 44-51, 2009.

CASTILHO NETO, K.J.G.A.; GARCIA, A.B.C.F.; FIDELIS JUNIOR, O.L.; 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. **Braz J Vet Parasitol**, 2021 30(1): e020220. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021019>

COSTA, A. C. et al. *Trypanosoma vivax*: infecção natural afetando a produção de vacas leiteiras. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA**, 10, 2013, Belem. Anais Eletrônicos... Belém: UFPA, 2013. 1 CD-ROM.

CROSS, G.A.M (2003). Antigenic variation in Africa Trypanosomes and malária. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecky RW. **Molecular Medical Parasitology**. San Diego: Academic Press, p. 82-110.

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

DAGNACHEW, S.; TEREFE, G.; ABEBE, G.; BARRY, D.; MCCULLOH, R.; GODDEERIS, B. In vivo experimental drug resistance study in *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. **Acta Tropica**, v. 146, p. 95-100, 2015.

DAGNACHEW, S.; BEZIE, M. Review on *Trypanosoma vivax*. **African Journal of Basic & Applied Sciences** v. 7, p. 41-64, 2015.



DAGNACHEW, S.; TSEGAYE, B.; AWUKEW, A.; TILAHUN, M.; ASHENAFI, H.; ROWAN, T.; ABEBE, G.; BARRY, D.J.; TEREFE, G.; GODDEERIS, B.M. Prevalence of bovine trypanosomiasis and assessment of trypanocidal drug resistance in tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. **Parasite Epidemiology and Control** v. 2, p. 40-49, 2017.

DÁVILA, A.M.R.; HERRERA, H.M.; SCHLEBINGER, T.; SOUZA, S.S.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomiasis in the Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology** v. 117, p. 1-13, 2003.

DESQUESNES, M.; BENGALY, Z.; MILLOGO, L.; MEME, Y.; SAKANDE H. The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology** v. 95, p. 141-155, 2001.

FÁVERO, J. F.; ALEKSANDO, S. S.; BIAZUS, A. H.; VOLPATO, A. *Trypanosoma vivax* infection in goat in west of Santa Catarina state, Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v, 25, p. 497-499, 2016.

FEITOSA JÚNIOR, A. B.; GUERRA, R. M. S. N. C.; SANTOS, H. P.; ABREU-SILVA, A. L. Registro e morfometria de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo de bovino no município de Itapecuru-Mirim, Maranhão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 1, supl. 1, p. 232, 2004.

FIDELIS JUNIOR, O.L.; SAMPAIO, P.H.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; MARQUES, L.C.; CADIOLI, F.A. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology** v. 25, p. 69-81, 2016.

GARCIA, H.A.; RODRIGUES, A.C. et al. (2014) Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. **Parasites & Vectors** v. 7, p. 1-13.

GARCIA, H.; GARCIA, M.E.; PEREZ, H.; MENDOZA-LEON, A. The detection and PCR-based characterization of the parasites causing trypanosomiasis in water buffalo herds in Venezuela. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** v. 99, p. 359-370, 2005.

GIORDANI, F.; MORRISON, L.J.; ROWAN, T.G.; DE KONING, H.P.; BARRETT, M.P. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology** v.143, p. 1862-1889, 2016.

GONZALES, J.L.; CHACON, E.; MIRANDA, M.; LOZA, A.; SILES, L.M. Bovine trypanosomiasis in the Bolivian Pantanal. **Veterinary Parasitology** v. 146, p. 9-16, 2007.

GRAD, D.J.; NIKOLSKAIA, O.V.; INOUE, N.; THEKISOE, O.M.; MORRISON, L.J.; GIBSON, W.; DUMLER, J.S Using detergente to enhance detection sensitivity of African trypanosomes in human CSF and blood by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 5, p. 1249, 2011.

HAJI, I.; SUGIMOTO, C.; KAJINO, K.; MALELE, I.; SIMUKOKO, H.; CHITAMBO, H.; NAMANGALA, B. Determination of the prevalence of trypanosome species in cattle from Monduli district, northern Tanzania, by loop mediated isothermal amplification. **Tropical Animal Health and Production** v. 47, p. 1139 – 1143, 2015.

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

JONES, T.; DÁVILA, A.M.R. *Trypanosoma vivax* out of África. **Trends in Parasitology** v. 2, p. 99–101, 2001.

KONING, H.P. Transporters in African trypanosomes: role in drug action and 570 resistance. **Internacional Journal for Parasitology** v. 31, p. 512-522, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>. PMID:5432063

LAOHASINNARONG, D.; GOTO, Y.; ASADA, M.; NAKAO, R.; HAYASHIDA, K.; KAJINO, K.; KAWAZU, S.; SUGIMOTO, C.; INOUE, N.; NAMANGALA, B. Studies of trypanosomiasis in the Luangwa valley, north-eastern Zambia. **Parasites & Vectors** v. 8, p. 1-8, 2015.

LINHARES, G. F. C. DIAS FILHO, F. C.; FERNANDES, P. R.; DUARTE, S. C. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins. In: **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Resumos. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.1, supl. 1, p. 232, 2004.

LOPES, S. T. P.; PRADO, B. S.; MARTINS, G. H; C.; BESERRA, H. E. A.; SOUSA FILHO, M. A. C.; EVANGELISTA, L. S. M.; CARDOSO, J. F. S.; MINEIRO, A. L. B. B.; SOUZA, J. A. T. *Trypanosoma vivax* em bovino leiteiro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.46, p.1-5, 2018.

LUCKINS, A.G. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. **Tropical Animal Health and Production** v. 9, p. 53-62, 1977.

MACHADO, R.Z.; MONTASSIER, H.J.; PINTO, A.A.; LEMOS, E.G.; MACHADO, M.R.F.; VALADÃO, I.F.F.; BARCI, L.G.; MALHEIROS, E.B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 1, p.17-26, 1997.

MACHADO, R.Z.; NETO, K.J.G.A.C.; GONÇALVES, L.R.; MACHADO, G.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; VASCONCELOS, R.O.; JUSSIANI, G.; SILVA, T.M.V.; GIMENES, L.U.; JACKSON, A.; WRIGHT, G.; TEIXEIRA, M.M.G. Detection of *Trypanossoma vivax* in tissues of experimentally infected goats: what is the role of adipose tissue in the life cycle of this protozoon?. **Braz J Vet Parasitol** 2021; 30(4):e017721.

MADRUGA, C.R. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanossoma (Duttonella) vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 13, p. 46-47, 2004.

MAGONA, J.W.; WALUBENGO, J.; ODIMIN, J.T. Acute haemorrhagic syndrome of bovine trypanosomosis in Uganda. **Acta Tropical** v. 107, p. 186-191, 2008.

MATEUS, G.; GARCIA, O.; LEON, J. Use of trypanidum in an integrated control method of *Trypanosoma vivax* in Colombia. Premier Séminaire International sur les Trypanosomose Animales Non Transmises par les Glossines, p. 14-16, 1992.

MORAES, M.A.V. ***Trypanosoma vivax*: Infecção experimental em bovinos (Bos indicus)**. 2001 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

MORRISON, L.J.; VEZZA, L.; ROWAN, T.; HOPE, J.C. Animal African Trypanosomiasis: Time to Increase Focus on Clinically Relevant Parasite and Host Species. **Trends in Parasitology** v. 33 p. 599-607, 2016.

MURRAY, M.; MURRAY, P.K.; MCINTYRE, W.I.M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene** v. 71, p. 317–318, 1977.

NANTULYA, V.M. Trypanosomiasis in domestic' animals: the problems of diagnosis. **Revue Scientifique et Technique** v. 9, p. 357-367, 1990.

NDAO, M.; KELLY, N.; NORMANDIN, D.; MACLEAN, J.D.; WHITEMAN, A.; KOKOSKIN, E.; AREVALO, I.; WARD, B.J. *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkeysrelated injuries. **Comparative Medicine** v. 50, p. 658-665, 2000.

NANTULYA, V.M. Trypanosomiasis in domestic' altimals: the problems of diagnosis. **Revue Scientifique et Technique** v. 9, p. 357-367, 1990.

NJIRU, Z.K.; OUMA, J.O.; 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. 3, n. 4, p. 358-362, 2011.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T.; Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research** v. 28, p. 63, 2000.

OGBAJE, C.L.; LAWAL, A.I.; AJANUSI, O.J. Sensitivity of Nigerian field isolates of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* to commonly available trypanocides. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease** v. 5, p. 214-218, 2015.

OLILA, D.; MC DERMOTT, J.J.; EISLER, M.C.; MITEMA, E.S.; PATZELT, R.J.; CLAUSEN, P.H.; POETZSCH, C.J.; ZESSIN, K.H.; MEHILTZ, D.; PEREGRINE, A.S. Drug sensitivity of trypanosome populations from cattle in a peri-urban dairy production system in Uganda. **Acta Tropical** v. 84, p. 19-30, 2002.

OSÓRIO, A.L.A.R.; MADRUGA, C.R.; DESQUESNES, M.; SOARES, C.O.; RIBEIRO, L.R.R.; 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.

PAIVA, F.; LEMOS, R. A. A.; OSHIRO, E. T. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p. 349, 1997.

PILLAY, D.; IZOTTE, J. *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomiasis in Cattle. **Plos One** 8:e78565, 2013.

RAMÍREZ-IGLESIAS, J.R.; ELEIZALDE, M.C.; REYNA-BELLO, A.; MENDOZA, M. Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. **Journal of Parasitic Diseases** v. 41 p. 450-458, 2017.

REBESKI, D.E.; WINGER, E.M.; ROGOVIC, B.; ROBINSON, M.M.; CROWTHER, J.R.; DWINGER, R.H. Improved methods for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 94 p. 249-253,1999.

RODRIGUES, A.C.; CAMPANER, M.; TAKANA, C.S.A, DELL' PORTO, A.;MILDER, R.V.; TAKEDA, G.F.; TEIXEIRA, M.M.G. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. **Veterinary Parasitology** v. 116 p. 185-207, 2003.

SAMPAIO P.H. **Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação da efetividade do tratamento contra *Trypanosoma vivax* em caprinos experimentalmente infectados.** 2017,92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

SALAS, R.Z.; ZULUAGA, E.A.C.; VÉLEZ, J.R.; CHÁVEZ, O.T.; GARCÍA, V.H.P.; OSORIO, L.A.R.; ROSALES, R.B.; ECHEVERRY, D.P. Tripanosomiasis bovina en ganadería lechera de trópico alto: primer informe de *Haematobia irritans* como principal vector de *T. vivax* y *T. evansi* en Colombia. **Revue de Médecine Vétérinaire** v. 33 p. 21-34, 2017.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors – occurrence properties and removal. **Journal of Applied Microbiology** v. 113, p. 1014-1026, 2012.

SEIDL, A.F., DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A.M.S. Estimated Financial Impacto of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 64, p. 269-272, 1999.

SERRA-FREIRE, N. M.Oiapoque – outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 4, p. 30-31, 1981.

SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; FREITAS, J.; MESQITA, D.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. P. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovine of the Pantanal Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 52, p. 561-562, 1996.

SILVA, R.A.M.S.; EGUEZ, A.; MORALES, G.; EULERT, E.; MONTENEGRO, A.; YBAÑEZ, R.; DÁVILA, A.M.R.; RAMIREZ, L. Bovine Trypanomiasis in Bolivian na Brsazilian Lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 93, p. 29-32, 1998.

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

SHAW, J. J.; LAISON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 66, p, 25–32, 1972.

SOW, A.; SIDIBÉ, I et al. (2012) Field detection of resistance to isometamidium chloride and diminazene aceturate in *Trypanosoma vivax* from the region of the Boucle du Mouhoun in Burkina Faso. **Veterinary Parasitology** v.187 p. 105-111 2012.

STIJEMANS, B.; VANKRUNKELSVEN, A.; CALJON, G.; GUILLIAMS, M.; BOSSCHAERTS, T.; BESCHIN, A.; RAES, G.; MAGEZ, S.; DE BAETSELIER, P. The central role of macrophages in trypanosomiasis-associated anemia: rationale for therapeutical approches. **Endocrine, Metabolic Immune Disorders- Drug Targets** v. 10, p. 71-82, 2010.

TEKEL, T.; TEREFE, G. et al. Aberrant use and poor quality of trypanocides: a risk for drug resistance in South western Ethiopia. *Veterinary Research* v. 14, p. 1-8, 2018.

TOURATIER L. Rapport de la treizième réunion internationale du groupe ad hoc de l'OIE sur les trypanosomose animales non transmises par les glossines. **Res. tech. Off. Int. Epiz.** v. 12, p. 237-248, 1993.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**; v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>. PMID:388439

UILENBERG, G. A Field Guide for the Diagnosis, Treatment and Prevention of African Animal Trypanosomosis. **FAO Corporate Document Repository** 1998.

VIEIRA, O. L. E.; MACEDO, L. O.; SANTOS, M. A. B.; SILVA, J. A. B. A.; MENDONÇA, C. L.; FAUSTINO, M. A. G.; RAMOS, C. A. N.; ALVES, L. C.; RAMOS, R. A. N.; CARVALHO, G. A. Detection and molecular characterization of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.26, p.516-520, 2017

WAAL, T. Advances in diagnosis of protozoan diseases. **Veterinary Parasitology** v. 189 p. 65-74, 2012.

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

YARO, M.; MUNYARD, K.A.; STEAR, M.J.; GROTH, D.M. Combatting African Animal Trypanosomiasis (AAT) in livestock: The potential role of trypanotolerance. **Veterinary Parasitology** v. 225 p. 43-52, 2016.

## CAPÍTULO 2 - Levantamento soroepidemiológico de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Brasil

Angelo Estevão Sant'Anna Donadon<sup>1</sup>; Marcos Rogério André<sup>1</sup>; Márcia Mariza Gomes Jusi<sup>2</sup>; Gener Tadeu Pereira<sup>3</sup>; Rosângela Zacarias Machado<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

<sup>2</sup> Imunodot

<sup>3</sup> Departamento de Engenharia e Ciências Exatas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

\*Autor para correspondência: Rosângela Zacarias Machado. E-mail: rzacariasmachado@gmail.com

### Abstract

*Trypanosoma vivax* is responsible for significant economic losses in cattle in South America and Africa. In Brazil, the spread across the country is observed due to reports of outbreaks found in the literature. Due to the life cycle of the parasite, different phases are observed, where there are phases of high parasitaemia with the presence in the circulation and low parasitaemia that may be in organs, fat and skin. The diagnostic methods used are: parasitological requiring the presence of the circulating parasite, immunological methods performing the detection of antibodies in the serum of the animals and molecular methods detecting the presence of the parasite's DNA. In immunological methods, the Elisa test is the most indicated due to its sensitivity and specificity. In this study, we used the recombinant protein Tv (Imunodot®) for the Elisa test. The study evaluated samples of bovine sera from properties with suspected *T. vivax* infection, from June 2020 to July 2021. Samples were collected and sent from fourteen Brazilian states, from 287 municipalities, totaling 5.114 samples, from of which 2.228 negative samples (43,5%) and e 2.886 positive (56,5%) positive samples were divided into weak positive, medium positive and strong positive. In this way, it was possible to obtain an overview of how *T. vivax* is spreading through the states and municipalities of the national territory from the first reports to the present day.

**Keywords:** Elisa test, *Trypanosoma vivax*, trypanosomiasis.

### Resumo

O *Trypanosoma vivax* é responsável por significativas perdas econômicas na bovinocultura da América do Sul e África. No Brasil, observa-se a disseminação pelo país devido os relatos de surtos que encontramos na literatura. Devido o ciclo de vida do parasita, observam-se diferentes fases, onde ocorrem fases de alta parasitemia com a presença na circulação e baixa parasitemia podendo estar em órgãos, gordura e pele. Os métodos de diagnósticos utilizados são: parasitológico, métodos imunológicos realizando a detecção de anticorpos no soro dos animais e métodos moleculares. Nos métodos imunológicos o Elisa teste é o mais indicado devido sua sensibilidade e especificidade. Neste estudo, utilizamos para o Elisa teste a proteína recombinante Tv (Imunodot®). O estudo avaliou amostras de soros bovinos de propriedades com suspeita de infecção de *T. vivax*, no período de junho de 2020 a julho de 2021. As amostras foram coletadas e enviadas de 14 estados brasileiros, provenientes de 287 municípios, totalizando 5.114 amostras, das quais 2.228 amostras negativas (43,5%) e 2.886 positivas (56,5%) as amostras positivas foram divididas em positivas fracas, positivas médias e positivas fortes. Desta foram, foi possível obter um panorama de como o *T. vivax* está se disseminando pelos estados e pelos municípios do território nacional desde os primeiros relatos até os dias de hoje.

**Palavras-chave:** Elisa, *Trypanosoma vivax*, tripanossomíase.

## Introdução

Hemoparasitas do gênero *Trypanosoma* acometem humanos e espécies de animais domésticos e silvestres nos continentes africano, asiático e americano (Dávila et al., 2003). No continente africano, as espécies *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma congolense* são as principais causadoras de enfermidades em bovinos, sendo responsáveis pelo grande impacto econômico na atividade, porém as espécies *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma brucei brucei* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* também são encontrados em bovinos (Haji et al., 2015; Morrison et al., 2016). No continente americano, a espécie *T. vivax* é o principal agente e causa sinais clínicos da doença em ruminantes (Jones e Dávila, 2001), enquanto as espécies *T. evansi* e *Trypanosoma theileri* também são encontradas parasitando bovinos e bubalinos, porém *T. evansi* em bovinos pode apresentar sinais clínicos sutis ou a não demonstração, podendo ter indivíduos acometidos com o parasita e sendo reservatório sem apresentar alterações físicas e comportamentais (Pochini, 2000) e *T. theileri* é apatogênico (Dávila et al., 2003; Rodrigues et al., 2003; Gonzales et al., 2007; Ramírez-Iglesias et al., 2017).

As formas de transmissão deste protozoário têm suas particularidades nos continentes africano e americano. No continente africano, nas regiões onde as moscas do gênero *Glossina* spp. (tsé-tsé) estão presentes, a transmissão ocorre ciclicamente (Cuglocivi et al., 2010; Laohasinnarong et al., 2015), ainda assim, existem relatos de transmissão mecânica em regiões que não se encontra a presença da *Glossina* spp. (Giordani et al., 2016). No continente americano, onde não há moscas do gênero *Glossina* spp., a forma de transmissão do parasita é mecânica ou não cíclica por insetos picadores e sugadores sendo eles *Tabanus nebulosus*, *Tabanus importunus* e *Cryptotylus unicolor*, principalmente em regiões inundáveis do pantanal brasileiro e boliviano, Colômbia e Guiana Francesa (Madruga, 2004; Osório et al., 2008). Em localidades não inundáveis, *Stomoxys calcitrans* tem papel fundamental na transmissão da doença nos rebanhos bovinos, devido ao aumento de sua população durante a estação chuvosa ou pela utilização de resíduos de usinas de álcool e açúcar nos canaviais que estão em torno das propriedades, em conjunto com temperaturas ambientes acima de 20°C (Batista et al., 2007; Cadioli et al., 2012; Cuglovici et al., 2010). Outro gênero de invertebrado picador, *Haematobia irritans*, possui grande importância na transmissão de *T. vivax*, visto que o parasita já foi detectado na probóscide e tórax-abdômen da mosca (Salas et al., 2017).

No decorrer da infecção causada por *T. vivax*, a imunossupressão do hospedeiro é relatada, bem como a predisposição a co-infecções ou falhas vacinais contra outros patógenos (Giordani et al., 2016; Yaro et al., 2016). Observam-se flutuações da parasitemia, ocorrendo até mesmo intervalos aparasitêmicos (Moraes, 2001; Almeida et al., 2010; Fidelis Junior et al., 2016). Recentemente, Machado et al. (2021) apresentam em seu estudo com caprinos experimentalmente infectados por *T. vivax*, o achado de lesões em vários tecidos inclusive tecido adiposo e pele, podendo justificar assim as fases de baixa parasitemia ou aparasitemia. Devido aos sinais clínicos inespecíficos e também à presença de períodos de baixa parasitemia ou aparasitêmicos, realizar o diagnóstico da doença é desafiador, podendo este ser realizado por métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (Fidelis Junior et al., 2016). Os métodos parasitológicos utilizados são a técnica de gota espessa (Brenner,



1961), centrifugação de micro hematócrito (Woo, 1970), esfregaço da camada leucocitária corada (buffy coat) (Murray et al., 1977) e esfregaço sanguíneo corado (Ndao et al., 2000), porém apresentam baixa sensibilidade em hospedeiros na fase crônica da infecção, devido à associação com a baixa parasitemia (Rebeski et al., 1999; Waal, 2012; Haji et al., 2015, Fidelis Junior et al., 2016). Ainda assim, as técnicas citadas anteriormente são utilizadas comumente para o diagnóstico em áreas com poucos recursos ou como triagem (Sow et al., 2012; Dagnachew et al., 2015).

Em consequência às fases de baixa parasitemia ou aparasitemia, o diagnóstico baseado na resposta imunológica, como ELISA, é uma ferramenta de extrema importância, por apresentar maior sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos, tornando-se a principal forma para a realização de “screening” de rebanhos suspeitos tanto no continente americano (Osório et al., 2008), quanto africano (Dagnachew e Bezie, 2015). Todavia, os métodos sorológicos indiretos indicam o contato do hospedeiro com o parasito, impossibilitando identificar se a doença está ativa ou não (Nantulya, 1990). A persistência de anticorpos contra *T. vivax* no hospedeiro pode ocorrer ou não por longos períodos, após o tratamento, por período variável de acordo com a natureza do antígeno utilizado nos ensaios, pois a literatura apresenta permanência por trinta a cem dias (Bengaly et al., 2001; Pillay et al., 2013). Um fator a ser considerado sobre métodos de diagnóstico imunológicos é que esses métodos tendem a não detectar animais infectados precocemente nos dias iniciais (Sampaio, 2017), a imunossupressão que o parasita causa do hospedeiro pode interferir na resposta por anticorpos, podendo assim comprometer o diagnóstico do rebanho infectado, favorecendo a disseminação do parasito. Outro ponto a ser considerado sobre a técnica de ELISA é a possibilidade de ocorrer reação sorológica cruzada entre espécies de tripanosomas, incluindo *T. b. brucei*, *T. evansi*, *T. congolense* e *T. theileri*, observada em ensaios de imunodiagnóstico com a utilização de antígenos brutos solúveis (Luckins, 1977; Desquesnes et al., 2001; Jones e Dávila, 2001). No Brasil não foi diagnosticado *T. b. brucei* e *T. congolense*.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência de rebanhos bovinos naturalmente infectados por *T. vivax* no período de junho de 2020 a julho de 2021, a partir do Elisa-teste, utilizando o antígeno recombinante com a proteína Tv Imunodot, o qual demonstrou maior reatividade frente a soros de animais experimentalmente infectados, tanto na fase aguda quanto crônica da doença.

## **Material e Métodos**

Foram utilizadas quatro mil novecentas e uma (5.114) amostras de soros bovinos com suspeita de infecção por *T. vivax*, naturalmente infectados no período de junho de 2020 a julho de 2021. As amostras foram provenientes dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Ceará, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Bahia e Alagoas. As amostras foram coletadas e enviadas devidamente refrigeradas à empresa Imunodot por intermédio de médicos veterinários autônomos e da empresa CEVA, por correios ou transportadoras terrestres/ aéreas, a fim de pesquisar a presença de anticorpos contra o parasita *T. vivax*. Para realizar o teste sorológico, uma proteína recombinante clonada e expressada pela empresa Imunodot foi

utilizada no Elisa-teste. A empresa Immunodot cedeu gentilmente os resultados.

### 1.1 Produções da proteína de *Trypanosoma vivax* em escala industrial

As construções plasmidiais pETSUMO\_pTvivax que produziram a proteína recombinante foram adaptadas para a produção em escala industrial, pela empresa Immunodot e diagnóstico Ltda.

Inicialmente, a proteína recombinante pETSUMO\_pTvivax foi analisada pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições desnaturantes, de acordo com técnica preconizada por Laemmli (1970). Amostra do extrato bruto de bactérias após a indução, assim como a proteína pTvivax purificada, foram analisadas, posteriormente, pelo *Western-blotting* (Towbin et al., 1979). A incubação foi realizada utilizando anticorpo monoclonal Anti-PoliHistidina (Sigma). O sobrenadante obtido após lise celular foi aplicado a uma coluna de cromatografia de afinidade, His GraviTrap (GE), para purificação da proteína recombinante, conforme instruções do fabricante.

### 1.2 Elisa Teste

O teste de ELISA indireto foi realizado de acordo com a técnica descrita por Machado et al. (1997) para *Babesia bovis* com algumas modificações.

Foram adicionados 100µL de antígeno recombinante de *T. vivax*, diluído na concentração de 1 µg/mL (100µL- 0,1µg por pocinho) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,6, em cada cavidade das microplacas de fundo plano (Nunclon TM Surface, Nunc. Denmark). Após incubação da placa por 8 a 10 horas em câmara úmida a 4º C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens consecutivas, com tampão PBS 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween 20). As placas foram bloqueadas com PBS-Tween 20, acrescido de 10% de leite em pó desnatado (Molico®), em câmara úmida, a 37°C por 90 minutos. Após nova lavagem para retirada do bloqueador, foram adicionados, em duplicata, 100 µL dos soros testes e dos soros de referência positivos e negativos diluídos 1: 100 em PBS-Tween 20. As microplacas foram então novamente incubadas a 37°C por 60 minutos e lavadas, como descrito anteriormente; 100 µL do conjugado bovino acoplado a fosfatase alcalina (Ig de coelho anti IgG de bovino, Sigma A-0705), diluído 1:30.000 em PBS-Tween 20, foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se nova incubação e lavagem como as anteriores. O substrato da enzima fosfatase alcalina (paranitrofenilfosfato diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8; Sigma N-9389) foi adicionado, incubando-se a reação por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido esse período, a leitura da reação foi realizada em um leitor de microplacas de ELISA (iMark, Bio-Rad), a um comprimento de onda de 405 nm.

### 1.3 Estatística

Calculou-se a frequência de soros bovinos positivos e negativos obtidos no Elisa-teste pelo número de animais e dentro de cada região. Foram também avaliados os resultados obtidos entre animais não tratados e tratados por drogas tripanocidas. Para tal foi utilizado o software "SAS INSTITUTE Inc. SAS/STAT" User's guide, version 9.1. Cary: SAS Institute, 2005.

Amostras provenientes dos estados do Rio de Janeiro, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul não foram utilizadas para realização das análises estatísticas devido ao pequeno número.

## Resultados

Foram obtidas amostras de soros de 287 municípios, totalizando 5.114 amostras. Após a realização do ensaio para a detecção de anticorpos anti *T. vivax* por Elisa-teste, com antígeno recombinante, obteve-se 2.228 amostras negativas (43,5%), estando a leitura da densidade ótica abaixo do ponto de corte ( $pc \bar{x} = 0,334$ ), 1.307 amostras positivas fracas, entre o ponto de corte e 0,500, 788 amostras positivas médias obtidas dentro do resultado de densidade ótica de 0,500 a 0,700 e 791 amostras classificadas positivas fortes com o resultado acima de 0,700, totalizando 2.886 (56,5%) amostras positivas, desse total 51,6% (1.446) das amostras estavam no período das chuvas sendo do mês de outubro de 2020 a março de 2021 (Os dados sobre quantidade de amostras e períodos estão no Anexo 2).

Foram obtidas 333 amostras de soros de bovinos de propriedades diferentes, os quais receberam tratamento quimioterápico utilizando o protocolo completo de aplicação de cloridrato de isometamidium. Após a realização do Elisa-teste totalizou-se 117 amostras negativas (31,83%), por estarem abaixo do ponto de corte ( $pc \bar{x} = 0,305$ ), 109 amostras positivas fracas que se posicionaram entre o ponto de corte e 0,500; 61 amostras foram positivas médias por estarem entre 0,500 e 0,700 e 47 amostras foram positivas fortes cujo resultado foi acima de 0,700, totalizando 227 (68,17%) amostras positivas. Na figura 1 apresentamos a distribuição das amostras de soros bovinos enviados para a realização de Elisa-teste.

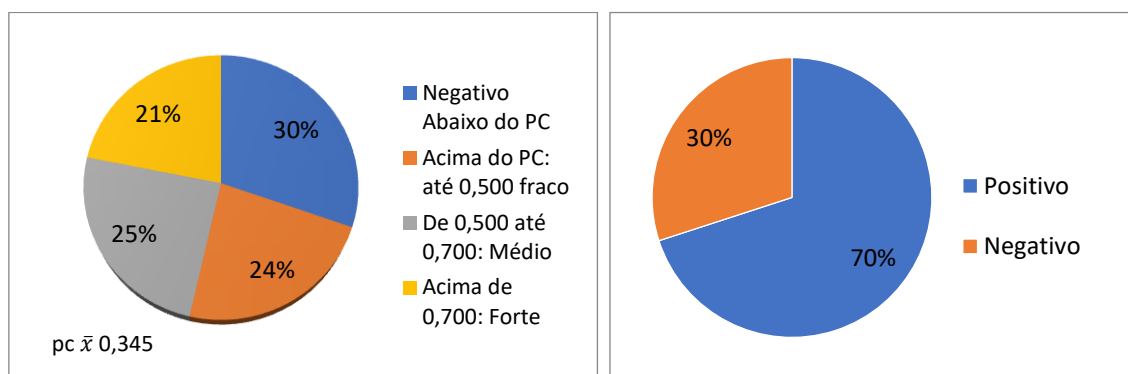


**Figura 1.** Mapa do Brasil demonstrando a origem das amostras de soros bovinos, enviadas para a realização do Elisa-teste anti *T. vivax*.

As amostras foram separadas por regiões do país, Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul.

As amostras de soro da região Nordeste foram provenientes de quarenta e cinco municípios, totalizando 594 amostras, o ponto de corte do ELISA-Teste foi de ( $pc \bar{x} = 0,345$ ). Avaliando o resultado, trinta por cento ( $n=178$ ) das

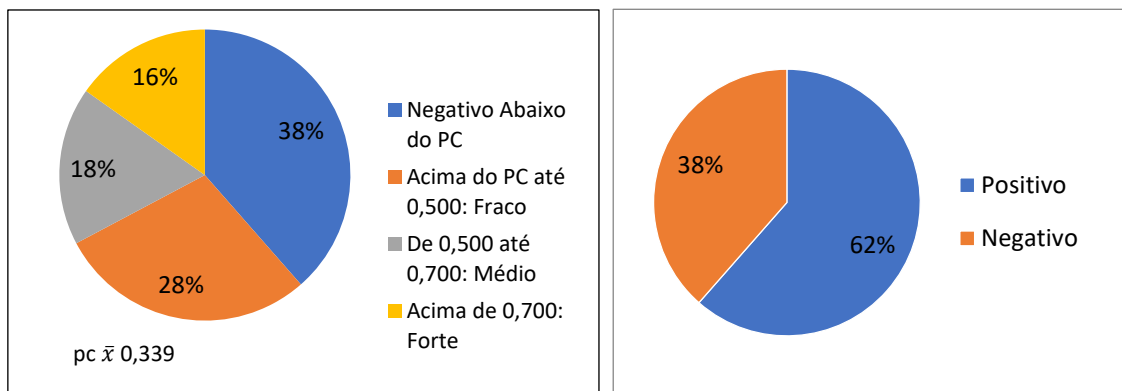
amostras foram negativas e setenta por cento de amostras positivas (n=416) considerando, vinte e quatro por cento (n=141) positivas fracas, vinte e cinco por cento (n=147) positivas médias e vinte e um por cento (n=128) positivas fortes (Figura 2).



**Figura 2.** Porcentagens de amostras de soros anti - *T. vivax* provenientes de bovinos do nordeste brasileiro, analisados pelo ELISA-Teste, com os resultados negativos (n=178), positivas fracas (n=141), médias (n=147) e fortes (n=128).

Segundo IBGE 2020, a região Nordeste possui o rebanho bovino de 28.601.643 animais com média de 3.462.265 cabeças ordenhadas no ano, produzindo 4.943.689 mil litros de leite. Os estados de Pernambuco e Ceará foram responsáveis pela maioria das amostras de soro analisadas. Os municípios com maior número de amostras analisadas foram Pedra – PE totalizando 47 amostras sendo 31 positivas (66%); São Bento da Una com 20 amostras e positivando 19 amostras (95%); Quixadá – CE com total de 33 amostras, 25 amostras foram positivas (75%); Limoeiro do Norte – CE 32 amostras de soro de bovinos e todas foram positivas para *T. vivax* e Quixaramobim com 19 amostras e pelo Elisa-teste positivou quinze (79%) amostras de soro. No estado da Bahia, o município de Capim Grosso foi encaminhado 24 amostras obtendo o resultado positivo de 22 amostras (91,5%) e Miguel Calmom com 24 amostras das quais 21 amostras (87,5%) foram positivas. No estado do Rio Grande do Norte, o município de Jucurutu enviou vinte e três amostras, positivando oito amostras (34,5%), já no estado da Paraíba, os municípios de Barra de Santana e Pilões enviaram 23 e 12 amostras, respectivamente, das quais, 6 (26%) e 11 (91%) foram positivas, respectivamente.

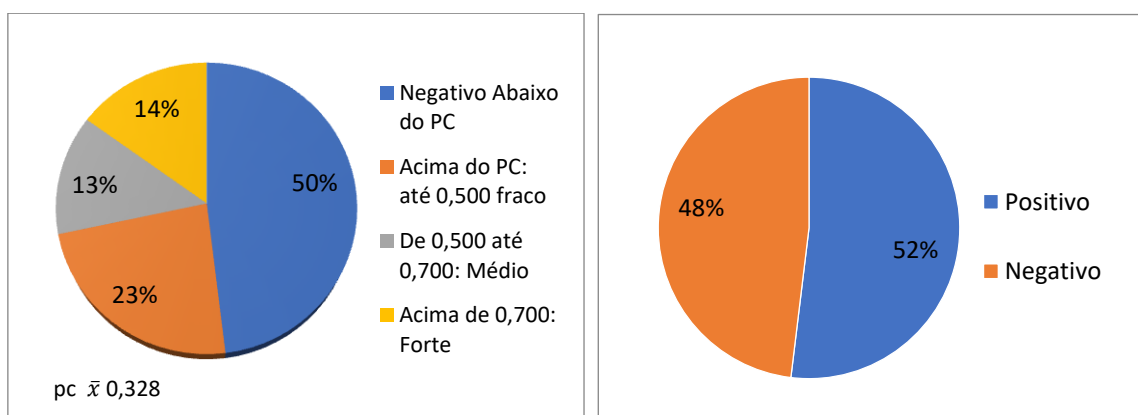
Amostras de soro de bovinos da região Centro-Oeste, foram provenientes de trinta e três municípios, somando 755 amostras de soros, avaliadas pelo teste ELISA, o ponto de corte foi (pc  $\bar{x}$  = 0,339). Do total, 38% (n=288) foram negativas e 62% (n=467) foram positivas. Dentre as positivas, 28 % (n=217) foram positivas fracas, 18% (n=132) foram positivas médias e 16% (n=118) foram positivas fortes. (Figura 3).



**Figura 3.** Porcentagens de amostras de soros b anti - *T. vivax* provenientes de bovinos do centro-oeste brasileiro, analisados pelo ELISA-Teste, com os resultados negativos (n=288), positivos fracos (n=217), médios (n=132) e fortes (n=118).

A região Centro-Oeste possui rebanho de 75.440.444 cabeças sendo 2.446.406 bovinos ordenhados no ano de 2020, produzindo o total de 4.132.075 mil litros de leite segundo IBGE 2020. Amostras de soro de bovinos da região Centro-Oeste foram enviadas do estado de Goiás, sendo o município de Pontalina responsável pelo maior número de soros avaliados, sendo cento e sessenta e quatro amostras, tendo como resultado positivo no Elisa-teste, setenta amostras (42,6%), em segundo lugar ficou o município de Edealina de onde foram analisadas 92 amostras de soros bovinos, dos quais, foram positivas 54 amostras (58,6%). Orizona mandou 80 amostras e dessas 64 (80%) foram positivas.

Na Região Sudeste, foram amostrados 82 municípios num total de 1431 amostras, avaliadas pelo Elisa-teste, com ponto de corte de  $pc \bar{x} = 0,328$ . Observaram-se cinquenta por cento (n=799) das amostras negativas e cinquenta por cento (n=800) amostras positivas, destas vinte e três por cento (n=360) positivas fracas, treze por cento (n=215) positivas médias e quatorze por cento (n=225) positivas fortes (Figura 4).



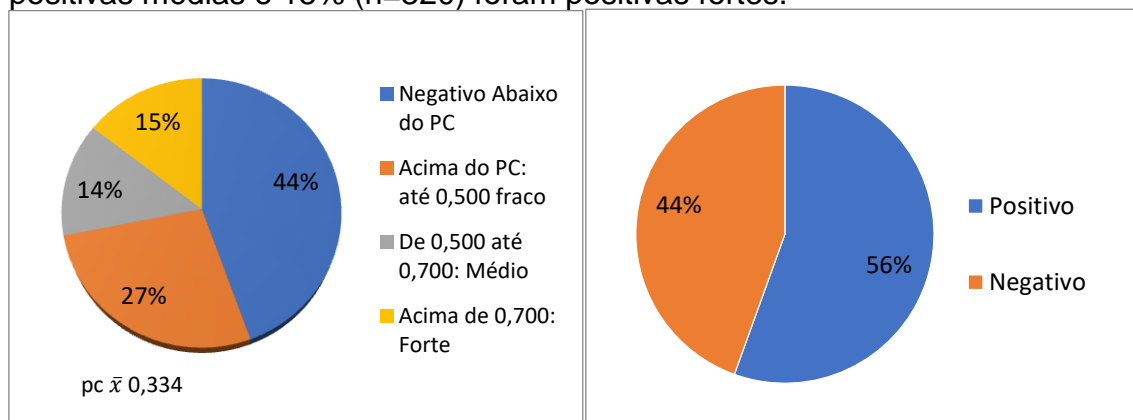
**Figura 4.** Porcentagens de amostras de soros anti - *T. vivax* de bovinos provenientes da região Sudeste do Brasil, pelo ELISA-Teste, com os resultados negativos (n=799), positivos fracos (n=360), médios (n=215) e fortes (n=225).

O Sudeste produziu em 2020, 121.738.841 mil litros de leite, com rebanho bovino de 37.441.512 cabeças com 4.717.228 animais em lactação. O estado de Minas Gerais é responsável pelo maior número de vacas lactantes com 3.122.017 cabeças segundo IBGE 2020. Na região Sudeste, as amostras de soros bovinos são provenientes dos estados de São Paulo e Minas Gerais.

No estado de São Paulo, a cidade de São José dos Campos – SP é o município que mais encaminhou amostras de soro, (n=48) das quais 17 (35,4%) amostras foram positivas. Marília encaminhou quarenta e seis amostras de soros, que resultaram em 12 (26%) positivas e Guaratinguetá enviou 24 amostras das quais 13 (54%) foram positivas.

No estado de Minas Gerais, o município de Governador Valadares é responsável por setenta e três amostras de soros e com quarenta (54,7%) positivas. A cidade de Coromandel encaminhou para a realização do Elisa-teste quarenta e cinco amostras das quais 37 (82%) foram positivas. Patos de Minas enviou 38 amostras, que resultaram em 27 (71%) positivas.

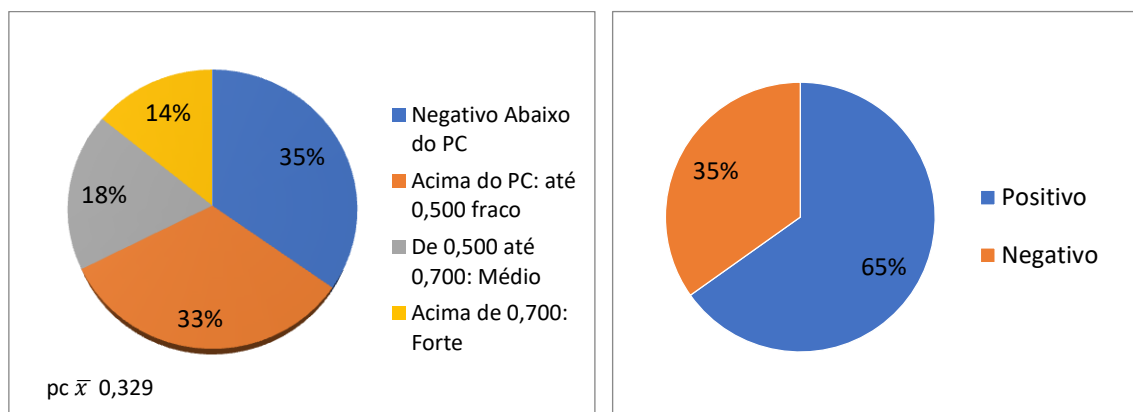
A região Sul totalizou cento e vinte municípios e 2.166 amostras de soros, com ponto de corte de ( $pc \bar{x} = 0,334$ ) no Elisa-teste. Quarenta e quatro por cento das amostras foram negativas (<PC) para a presença de anticorpos anti *T. vivax* e cinquenta e seis por cento (n=1.203) foram positivas. Dentre as positivas, 27% (n=589) foram positivas fracas, 14% (n=294) foram positivas médias e 15% (n=320) foram positivas fortes.



**Figura 5.** Porcentagens de amostras de soros anti - *T. vivax* de bovinos provenientes da região Sul do Brasil, pelo ELISA-Teste, com os resultados negativos (n=963), positivos fracos (n=589), médios (n=294) e fortes (n=320).

A região Sul possui rebanho bovino de 24.245.576 cabeças, onde o estado do Paraná possuiu 1.329.009 bovinos produzindo leite no ano de 2020 e Rio Grande do Sul no total de 1.160.993 bovinos em lactação. Os municípios de Senador Salgado Filho e Santo Cristo que pertencem ao estado do Rio Grande do Sul são responsáveis pelo maior número de amostras de soros no estado, totalizando cinquenta e duas em cada, sendo positivas trinta e seis (64%) amostras e trinta e duas (61,5%), respectivamente. Vista Gaúcha teve elevado número de amostras de soros positivas com 74% (n=20) do total de vinte e sete amostras, como também o município de Boa Vista que encaminhou vinte e três amostras, das quais 78% (n=18) foram positivas. No estado de Santa Catarina, Chapecó foi responsável por cento e cinco amostras das quais 58 (55%) foram positivas. O município de Xavantina apresentou maior percentual de amostras positivas no Elisa-teste 93% (n=28) de trinta amostras. No estado do Paraná, Manoel Ribas encaminhou cento e sessenta e três amostras de soros, positivando cento e duas (62,5%). O município de Cascavel vem em seguida totalizando cento e cinquenta e nove amostras, com o resultado positivo no Elisa-teste de noventa (56,6%) amostras. A cidade de Castro enviou oitenta e uma amostras sendo 44,5% (n=36) das amostras com resultados positivos.

As amostras de soro de propriedades que realizaram o tratamento quimioterápico utilizando o protocolo completo de aplicação de cloridrato de isometamidium foram provenientes de dezoito municípios de quatro estados, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Rio Grande do Sul, totalizando 333 amostras. Estas amostras foram avaliadas pelo Elisa-teste com ponto de corte de  $pc \bar{x} = 0,329$ , onde trinta e cinco por cento ( $n=116$ ) delas foram negativas para a presença de anticorpos anti *T. vivax*. Sessenta e cinco por cento positivaram ( $n=217$ ), sendo 33% positivas fracas ( $n=110$ ) ponto de corte (0,329 a 0,500), 18% ( $n=60$ ) positivas médias (0,500 a 0,700) e acima de 0,700 foram consideradas positivas fortes o total de 14% ( $n=47$ ) (Figura 6).



**Figura 6.** Porcentagens de amostras de soros anti - *T. vivax* de bovinos que foram submetidos ao tratamento quimioterápico com o princípio ativo de cloridrato de isometamidium, pelo ELISA-Teste, com os resultados negativos ( $n=116$ ), positivos fracos ( $n=110$ ), médios ( $n=60$ ) e fortes ( $n=47$ ).

Os municípios que realizaram tratamento quimioterápico com maior número de amostras de soros enviadas foram oriundos do estado de Goiás. Pires do Rio e Itumbiara totalizando vinte e duas amostras de soros, positivando dezessete (77%). Pará de Minas encaminhou trinta e quatro amostras sendo vinte e sete delas positivas (79%) e Serro enviou trinta amostras obtendo resultado positivo em quinze amostras (50%) para presença de anticorpos anti *T. vivax* no estado de Minas Gerais. No estado do Rio Grande do Sul, somente o município de Santa Rosa encaminhou amostras de soros bovinos nos quais o protocolo quimioterápico foi realizado, totalizou-se dezenove amostras e treze positivaram (68%). No estado de São Paulo, São José dos Campos enviou vinte e duas amostras com treze amostras positivas (59%), também na cidade de Assis dezessete amostras de soros foram analisadas e quatorze (82%) amostras positivaram. No município de Garça foram analisadas quinze amostras de soros com resultado de doze amostras positivas (80%). Por tanto, esses municípios apresentados acima demonstram alta porcentagem de positividade nas amostras de soros de animais que receberam o tratamento quimioterápico.

## Discussão

O diagnóstico da tripanosomose em bovinos por *T. vivax* é feito com base nos sinais clínicos, também comuns a outras doenças (tristeza parasitaria), resultando em erros de diagnóstico. Neste estudo observamos o potencial imunodiagnóstico da proteína recombinante Tv antígeno Imunodot para evidência sorológica de exposição de bovinos por *T. vivax*.

Em nosso trabalho utilizamos soros bovinos naturalmente infectados



oriundo de diversas regiões (Nordeste, Centro-Oeste, Suldeste e Sul) com suspeita de infecção por *T. vivax*, utilizando o método sorológico Elisa-teste.

A proteína utilizada no estudo a Tv (Imunodot) é uma proteína de superfície expressada e purificada, tendo uma estrutura de domínio ISG (glicoproteína de superfície invariante) típica, consistindo de um peptídeo sinal N-terminal, um domínio ISG, um domínio transmembrana e um pequeno domínio intracelular, determinado por um estudo de miniproteômica, tendo 39 Kilodaltons, solúvel apresentando alta reatividade com anticorpos anti – *T. vivax* de animais experimentalmente e naturalmente infectados, demonstrando nível de sensibilidade e especificidade no Elisa indireto. Optou-se por investigar esses antígenos porque os ISGs já provaram ser bons antígenos diagnósticos para *T. brucei*, *T. congolense* e *T. evansi*. Estudos sorológicos de reatividade cruzada com outras tripanossomoses (*T. cruzi* e *T. evansi*) não foram realizados. No Elisa com soros de bovinos experimentalmente infectados foi possível detectar anticorpos anti-*T. vivax* no período de 10 – 20 dias e até 589 dias pós-infecção, resultados apresentados por Júnior (2022). *Trypanosoma vivax* é conhecido por ser geneticamente diverso, e estudos mostraram que cepas do oeste da África e América do Sul são geneticamente distintas de isolados do leste africano (Garcia et al., 2014).

Em outro estudo foi sequenciada uma proteína do gene TvGM6 dos isolados da África Oriental e Ocidental, que permitiu a detecção de anticorpos em animais de ambas regiões africanas. A proteína GM6 é naturalmente pequena e insolúvel e está localizada na haste do flagelo, conforme estudos de imunolocalização (Pillay et al., 2013). Porém, testes realizados com esta proteína na imunocromatografia não detectaram anticorpos, utilizando soros de animais positivos em alguns locais de São Paulo (comunicação pessoal).

Nos nossos estudos podemos inferir que resultados negativos podem ser decorrentes da queda do nível de parasitemia, pois em estudos realizados em caprinos experimentalmente infectados verificou-se que o título de anticorpos reduzidos ou não detectáveis, ocorre quando o nível de parasitemia chega a zero. Por tanto a presença de trypanosomas circulantes é importante na detecção de anticorpos (Machado et al., 2018 , Machado et al.,2021). Dentre os animais utilizados no presente estudo, informações sobre a presença de sinais clínicos não foram comunicados. Em trabalhos publicados, vários autores descrevem os sinais clínicos como, anemia, emagrecimento progressivo, diminuição de produção, problemas reprodutivos (abortamento, repetição de cio e anestro) e quadros mais graves apresentam sinais neurológicos (Cadioli et al., 2012; Betancur Hurtado et al., 2016; Fidelis Junior et al., 2016). Desquesnes (2004) relatou que a proporção de bovinos infectados na América do Sul é alta e não apresentam sinais clínicos. Porém, os bovinos apresentam sintomas na fase aguda e na fase crônica, podendo ainda haver indivíduos com sintomatologia, mas não patognomônicos e também há infecções secundárias em rebanhos com histórico da presença do *T. vivax*.

A região Nordeste apresentou uma elevada porcentagem de amostras positivas totalizando 70% dos soros bovinos. Segundo o IBGE 2020 a região é responsável pela produção de 4.943.689 mil litros de leite, com média de 3,5 milhões de cabeças ordenhadas. Os estados de Pernambuco e Ceará foram os que mais enviaram amostras para realização do Elisa-teste. Nos municípios de Pedra-PE e Quixadá-CE observamos elevada porcentagem de amostras



positivas 66% e 75%, respectivamente.

Em 2020 a região Centro-Oeste produziu 4.132.075 mil litros de leite, onde o estado de Goiás foi o principal produtor de leite. No Centro-Oeste do Brasil, o estado que enviou amostras para a realização do Elisa-teste foi Goiás, e o município de Pontalina obteve 42,6% das amostras positivas; Edealina encaminhou elevado número de amostras, ressaltando que esses municípios possuem grande relevância na produção de leite.

O estado de Minas Gerais é o principal estado produtor de leite na região sudeste, possuindo um rebanho em torno de três milhões de vacas lactantes segundo o IBGE 2020. No estado de São Paulo nosso estudo obteve maior número de amostras do município de São José dos Campos sendo 48% positivas. Vale ressaltar que este município se encontra em uma região com alta produção de leite do estado e estando próximo da divisa dos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Na região sul do país o estado do Paraná no ano de 2020 segundo o IBGE possuía 1.329.009 cabeças em lactação, no qual a região do município de Castro possui por principal característica a produção leiteira, este mesmo município foi o principal no envio de soros de bovinos suspeitos parasitados por *T. vivax*, obtendo o resultado positivo em 44,5% das amostras.

Em nosso estudo observamos que nas regiões citadas acima, elevados resultados sorológicos positivos foram obtidos, sendo essas amostras próximas de localidades que possuem a produção de leite como uma das principais fontes econômicas. Desta forma, esses resultados vêm demonstrar que o *T. vivax* está se disseminando por vários municípios, sendo um dos problemas é a falta de diagnóstico na aquisição de animais, ou seja, em leilões e exposições, porém os produtores justificam o custo sobre esses exames. Assim os produtores correm o risco de adquirir animais infectados com o *T. vivax*. Outro ponto importante é a prática comum em propriedades leiteiras, é o uso de agulhas compartilhadas para a aplicação de ocitocina, vacinas e outros medicamentos assumem o risco de transmitir o parasita aos animais que não tinham contato com o *T. vivax*.

Castilho Neto et al., (2021) em seu trabalho a resposta de anticorpos anti – *T. vivax* em animais tratados com diaceturato de diminazeno, cloridrato de isometamidium ou ambos reduziu após 30 a 45 dias dos tratamentos. Portanto, a presença do *trypanosomas vivax* no sangue é importante para a detecção de anticorpos, ou seja, é provável que um certo nível de parasitemia é necessária para estimular a resposta por células B. Na ausência desta estimulação quando a parasitemia cai abaixo da carga parasitaria necessária, a resposta de anticorpos é de curta duração. Portanto, em nosso estudo dentre os resultados em todas as regiões tivemos o percentual de soros negativos variando de 30% na região Nordeste, 52% Centro-Oeste, 48% Sudeste e 44% na região Sul, porém nesses resultados, não temos a informação exata sobre tratamento, levando-nos a inferir que resultados de sorologia negativa poderiam ser decorrente de animais tratados, ou falsos negativos.

Recentemente a Imunodot desenvolveu um teste de Imunocromatografia para detecção de anticorpos, também demonstrando alta sensibilidade e especificidade quando avaliando infecções de campo por *T. vivax*. A comparação realizada entre o teste rápido e as provas realizadas entre os testes de referência RIFI e ELISA, comprova a correlação de resultados em amostras positivas e negativas, ratificando a sensibilidade e especificidade do

"IMUNOTESTE - *Trypanosoma vivax* (TESTE RÁPIDO) - BOVINO. Kit para Diagnóstico da Tripanossomíase Bovina por Imunocromatografia".

Vale a pena citar que a proteína TvGM6 (Pillay et al., 2013) em teste imunocromatografia foi testado a campo com soros de bovinos de animais doentes ou suspeitos no Brasil. Entretanto, esses testes não obtiveram bons resultados, detectando falsos negativos, com baixa sensibilidade, podendo também ser de animais tratados, mas não informados. Vale ressaltar que os produtores não gostam de informar a presença da doença e se realizou tratamento.

Pillay et al., (2013) referiram-se a utilização da proteína do gene TvGM6 no Elisa e a não detecção de anticorpos, um mês após tratamento, ou seja, com a parasitemia não detectável no sangue, desta forma, o teste não será positivo em infecções silenciosas aparentemente. Assim, devido a diminuição rápida de anticorpos pós-tratamento o TvGM6 Elisa não foi adequado para detectar infecção ativa ou pós tratamento. No estudo de Machado et.al. 2021 com caprinos experimentalmente infectados por *T. vivax* mostrou que o parasita migra para o tecido adiposo e pele, não estando circulante, fazendo que os níveis de anticorpos diminuam e os testes sorológicos possam ser falsos negativos, assim podendo ocorrer a reinfecção dos animais após os níveis de medicamento reduzirem.

As altas prevalências de *T. vivax* nas regiões do país confirmam a disseminação, e pesquisando na literatura, o primeiro surto de *T. vivax* ocorreu na região Nordeste do país, no estado do Maranhão (Feitosa et al., 2004) Pernambuco (Pimentel et al., 2012) relata o primeiro encontro do parasita e sua caracterização molecular, Alagoas (Andrade Neto et al., 2015), Sergipe (Vieira et al., 2017), Ceará (Batista et al., 2017) e Piauí (Lopes et al., 2018). Em nosso estudo foram analisados soros dos estados Ceará, Bahia, Rio Grande do Norte e da Paraíba onde não possuíamos relatos de surtos pelo parasita até o momento, e o estado de Pernambuco teve relatado no ano de 2012 o encontro do *T. vivax* em nosso estudo obteve-se resultados sorológicos positivos. Por tanto o *T. vivax* está sendo disseminado na região Nordeste, provavelmente pelo comércio de animais não diagnosticados.

A região Centro-Oeste possui seus primeiros relatos de surtos em 1996 no estado de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul em 1997 e depois em 2001 (Silva et al., 1996; Paiva et al., 1997; Barbosa et al., 2001). As literaturas mais recentes, que diagnosticaram o *T. vivax* na região do pantanal de Mato Grosso do Sul, relataram o encontro de anticorpos anti-*T.vivax* em 363 amostras do total de 400 amostras sendo 197 amostras positivas de bovinos fêmeas com idade acima de seis anos e 166 amostras positivas de fêmeas bovinas com idade entre sete a doze meses, animais da raça nelore, observando que o parasita estava presente em animais que possuíam outros hemoparasitas (André et al., 2020). Echeverria (2021) descreve o encontro do parasita em amostras de soros bovinos de quatro propriedades, voltadas à produção de bovinos de corte; no Elisa-teste obtiveram 50,59% de amostras reagentes, da soma de todas as amostras das propriedades. Na realização da PCR obtiveram resultado positivo de um bovino jovem e os demais bovinos eram adultos, todos assintomáticos. Echeverria (2021) conclui que a espécie *T. vivax* está em equilíbrio endêmico em bovinos no Pantanal Sul-mato-grossense. Em nosso estudo os estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul não enviaram amostras suficientes para serem analisadas. O estado de Goiás teve um surto

relatado em 2017 (Bastos et al., 2017) onde foram introduzidos animais oriundos de outro estado infectados por *T. vivax*. Em nosso estudo, o estado de Goiás enviou amostras de vários municípios, demonstrando que o parasita vem se disseminando rapidamente.

O primeiro relato de surto de *T. vivax* em Minas Gerais foi descrito por Carvalho et al. (2008) e desde então, a doença se disseminou pelo estado, sendo o estado de referência em genética animal para produção leiteira, o que contribuiu para a disseminação da doença para outras regiões, devido a comercialização e o trânsito de animais infectados. O primeiro relato no estado de São Paulo ocorreu em 2012 no município de Lins (Cadioli et al., 2012) e no presente estudo foram avaliados soros de vários municípios, principalmente da região do Vale do Paraíba, com alta porcentagem de soros positivos. Podemos inferir que a presença do parasita na região do Vale do Paraíba se faz pela proximidade do estado de Minas Gerais, onde provavelmente ocorre o comércio e trânsito de animais pelos estados disseminando a doença pelas propriedades leiteiras.

No sul do Brasil, o estado do Rio Grande do Sul relata o primeiro surto em 2009 (Silva et al., 2009) e o estado de Santa Catarina no ano de 2016 (Fávero et al., 2016). Como observamos em nosso estudo a região sul do país e as demais regiões demonstram um aumento de bovinos soropositivos para *T. vivax*. O estado do Paraná possui uma região com grande importância na produção leiteira, observamos um número elevado de resultados sorológicos positivos, assim deixando em alerta de como a doença vêm se disseminando por estados e municípios.

Os dados do nosso estudo demonstram que o *T. vivax* vem se disseminando pelo País, deixando o alerta para a orientação dos produtores, recomendações de realização dos exames de diagnóstico para a aquisição de novos animais, a conscientização da necessidade da não utilização de agulhas compartilhadas no uso da ocitocina e outros medicamentos, bem como a realização de diagnóstico de animais suspeitos nas propriedades onde houve a realização do tratamento completo e controle das formas de transmissão.

## Referências

André MR, Calchi AC, Herrera HM, Zanatto DCS, Horta BCLS, Tasso JB, Ramos IAS, Mello VVC, Machado RZ. The co-infection with *Ehrlichia minasensis*, *Anaplasma marginale* and *Anaplasma platys* is not associated with anemia in beef cattle in the Brazilian Pantanal. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 21 2020; 100437

Almeida KS, Freitas FLC, Tebaldi JH, Alessi AC, Machado RZ, Nascimento AA. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. *Ciênc Anim Bras* 2010; (11):669-676.

Auty H, Anderson NE, Picozzi K, Lembo T, Mubanga J et al. Trypanosome diversity in wildlife species from the serengeti and luangwa valley ecosystems. *PLoS Negl Trop. Drosophila* 2012; Inf Serv (6): e1828.

Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet Parasitol* 2007; (143):174–181.

Batista JS, Freitas CIA, Silva JB, Cavalcante TV, Paiva KAR, Lopes FC, Lira R. Clinical evaluation and reproductive indices of dairy cows naturally infected with *Trypanosoma vivax*. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 38, n. 5, p. 3031-3038, 2017. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n5p3031

Bengaly Z, Kasbari M, Desquesnes M, Sidibé I. Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. *Vet Parasitol* 2001; (96):101-113.

Betancur Hurtado OJ, Castro PDJ, Giraldo-Ríos C. Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. *Vet Parasitol* 2016; (229):54-59.

Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG et al. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 1999; (102):249-261. doi:[10.1016/S0166-6851\(99\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00098-5). PubMed: [10498181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10498181/).

Brener Z. *Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas*. [Tese] Belo Horizonte:Universidade Federal de Minas Gerais; 1961.

Cadioli FA, Barnabé PA, Machado RZ, Teixeira MCA, André MR, Sampaio PH, Fidélis Junior OL, Teixeira MMG, Marques LC. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21:118-124.

Castilho Neto KJGA, Garcia ABCF, Fidelis Junior OL, Nagata WB, André MR, Teixeira MMG, et al. Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(1): e020220. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021019>

Coppel RL, Cowman AF, Anders RF, Bianco AE, Saint RB et al. Immune sera recognize on erythrocytes *Plasmodium falciparum* antigen composed of repeated amino acid sequences. *Nature* 1984; (310): 789-792. doi:[10.1038/310789a0](https://doi.org/10.1038/310789a0). PubMed: [6382025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6382025/)

Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MFB. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol* 2010; (169):320-326.

Dagnachew S, Terefe G, Abebe G, Barry D, McCulloch R, Goddeeris B. In vivo experimental drug resistance study in *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. *Acta Trop* 2015; (146):95- 100.

Dagnachew S, Bezie M. Review on *Trypanosoma vivax*. *ABJAS*, 2015; (7):41-64.

Dávila AMR, Herrera HM, Schlebinger T, Souza SS, Traub-Cseko YM. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol* 2003; (117):1-13,

Desquesnes M, Bengaly Z, Millogo L, Meme Y, Sakande H. The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; (95):141-155.

Desquesnes M, Bengaly Z, Dia ML. Evaluation de la persistance des anticorps détectés par Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* après traitement trypanocide chez des bovins naturellement infectés. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 2003;(56):141–4

Desquesnes M. *Livestock trypanosomes and their vectors in Latin America*. Paris: OIE (World Organisation for animal health), 2004.

Desquesnes M, Gonzatti M, Sazmand A, Thévenon S, Bossard G, Boulangé A, et al. A review on the diagnosis of animal trypanosomoses, *Parasit Vectors* 2022; (15):64 <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1>

Echeverria JT. *Trypanosoma* spp. em bovinos no pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil. [Tese] Campo Grande: Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2021.

Fidelis Junior OL, Sampaio PH, Machado RZ, André MR, Marques LC, Cadioli FA. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Braz Journal Vet Parasitol* 2016; (25):69-81.

Garcia HA, Rodrigues AC, Rodrigues CM, Bengaly Z, Minervino AH, Riet-Correa F, et al. Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. *Parasit Vectors* 2014; 7(210): 1-13. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-210>. PMID:24885708

Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, De Koning HP, Barrett MP. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology* 2016; (143):1862-1889.

Gonzales JL, Chacon E, Miranda M, Loza A, Siles LM. Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. *Vet Parasitol* 2007; (146):9-16.

Goto Y, Carter D, Guderian J, Inoue N, Kawazu S et al. Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania* amastigotes. *Infect Immun* 2010;(78): 2138-2145. doi:[10.1128/ IAI.01102-09](https://doi.org/10.1128/IAI.01102-09). PubMed: [20160013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20160013/).

Gruber A, Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp Parasitol* 1993; (76): 1-12. doi:[10.1006/expr.1993.1001](https://doi.org/10.1006/expr.1993.1001). PubMed: [8467895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8467895/).

Haji I, Sugimoto C, Kajino K, Malele I, Simukoko H, Chitambo H, Namangala B. Determination of the prevalence of trypanosome species in cattle from Monduli district, northern Tanzania, by loop mediated isothermal amplification. *Trop Anim Health Prod* 2015; (47):1139 – 1143.

Hamilton PB. Is *Trypanosoma vivax* genetically diverse? *Trends Parasitol* 2012; (28): 173. doi:[10.1016/j.pt.2012.02.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.02.003). PubMed: [22459431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22459431/).

Jones T, Dávila AMR. *Trypanosoma vivax* out of África. *Trends Parasitol* 2001; (2):99–101.

Júnior RBD. *Trypanossoma vivax: aspectos sobre diagnóstico, persistência, transmissão e viabilidade em medicamentos* [Tese] Goiânia : Universidade Federal de Goiás; 2022.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-685. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>. PMID:5432063

Laohasinnarong D, Goto Y, Asada M, Nakao R, Hayashida K, Kajino K, Kawazu S, Sugimoto C, Inoue N, Namangala B. Studies of trypanosomiasis in the Luangwa valley, north-eastern Zambia. *Parasit Vectors* 2015; 8:1-8.

Luckins AG. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop Anim Health Prod* 1977; 9:53-62.

Madruga CR. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanossoma (Duttonella) vivax* no Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004; 13:46-47.

Madruga CR, Araujo FR, Cavalcante-Goes G, Martins C, Pfeifer IB, Ribeiro LR, et al. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:801–7. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000700016>

Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos EG, Machado MRF, Valadão IFF, Barci LG, Malheiros EB. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet Parasitol*, 1997; 71 (1): 17-26.

Machado et al. - Relatório Técnico - contrato 1027/2018 - Universidade de Liverpool – Funep

Machado RZ, Neto KJGAC, Gonçalves LR, Machado GF, Luvizotto MCR, Vasconcelos RO, et al. Detection of *Trypanosoma vivax* in tissues of experimentally infected goats: what is the role of adipose tissue in the life cycle of this protozoon?. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(4):e017721.

Moraes MAV. *Trypanosoma vivax: Infecção experimental em bovinos (Bos indicus)*. [Dissertação] Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2001

Morrison LJ, Vezza L, Rowan T, Hope JC. Animal African Trypanosomiasis: Time to Increase Focus on Clinically Relevant Parasite and Host Species. *Trends Parasitol* 2016; 33:599-607.

Müller N, Hemphill A, Imboden M, Duvallet G, Dwinger RH et al. Identification and characterization of two repetitive non-variable antigens from African trypanosomes which are recognized early during infection. *Parasitology*, 1992; 104 (1):111-120. doi:[10.1017/S0031182000060856](https://doi.org/10.1017/S0031182000060856). PubMed: [1614728](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1614728/).

Murray M, Murray PK, McIntyre WIM. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; (71):317–318.

Ndao M, Kelly N, Normandin D, Maclean JD, Whiteman A, Kokoskin E, Arevalo I, Ward BJ. *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkey-related injuries. *Comp Med* 2000; 50:658-665.

Nantulya VM. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. *Rev Sci Tech* 1990; 9:357-367.

Osório ALAR, Madruga CR, Desquesnes M, Soares CO, Ribeiro LRR, Costa SCG. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103:1-13.

Pillay D, Izotte J et al. *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomiasis in Cattle. *PLoS One* 2013; 8:e78565.

Pimentel SP, Ramos CAN, Ramos RAN, Araújo FRB, Faustino MAG, Alves LC. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. *Vet Parasitol* 2012; 185:286-289 (n2-4)

Pochini LR. *Infecção Experimental em bovinos com Trypanosoma evansi Steel, 1885*. [Dissertação] Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2000

Ramírez-Iglesias JR, Eleizalde MC, Reyna-Bello A, Mendoza M. Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *J Parasit Dis* 2017; 41:450-458.



Rebeski DE, Winger EM, Rogovic B, Robinson MM, Crowther JR, Dwinger RH. Improved methods for the diagnosis of african trypanosomosis. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 1999; 94:249-253.

Rodrigues AC, Campaner M, Takana CSA, A Dell' Porto, Milder RV, Takeda GF, Teixeira MMG. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Vet Parasitol* 2003; 116:185-207.

Sampaio PH. *Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação da efetividade do tratamento contra Trypanosoma vivax em caprinos experimentalmente infectados*. [Tese] Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2017.

Salas RZ, Zuluaga EAC, Vélez JR, Chávez OT, García VHP, Osorio LAR, Rosales RB, Echeverry DP. Tripanosomiasis bovina en ganadería lechera de trópico alto: primer informe de *Haematobia irritans* como principal vector de *T. vivax* y *T. evansi* en Colombia. *Rev Med Vet* 2017; 33:21-34.

Smuts CM. *Development of tools to improve the detection of Trypanosoma evansi in Australia* [PhD Tese]. Perth: Murdoch University; 2009.

Sow A, Sidibé I et al. Field detection of resistance to isometamidium chloride and diminazene aceturate in *Trypanosoma vivax* from the region of the Boucle du Mouhoun in Burkina Faso. *Vet Parasitol* 2012; 187:105-111.

Taylor KA, Authié E. Pathogenesis of African Trypanosomiasis. In: Maudlin I, Holmes PH, Miles MA, editors. *The Trypanosomiasis*. Wallingford: CAB International; 2004. p. 331-353.

Thuy NT, Goto Y, Lun ZR, Kawazu SI, Inoue N. Tandem repeat protein as potential diagnostic antigen for *Trypanosoma evansi* infection. *Parasitol Res*, 2011; 110: 733-739. PubMed: [21927872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21927872/).

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76(9): 4350-4354. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>. PMID:388439

Van den Bossche P, Chigoma D, Shumba W. The decline of anti-trypanosomal antibody levels in cattle after treatment with trypanocidal drugs and in the absence of tsetse challenge. *Acta Trop* 2000;77:263–70. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00138-8)

Waal T. Advances in diagnosis of protozoan diseases. *Vet Parasitol* 2012; 189:65-74.

Woo PTK. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. *Acta Trop* 1970; 27:384-386.



Yadav SC, Kumar R, Manuja A, Goyal L, Gupta AK. Early detection of *Trypanosoma evansi* infection and monitoring of antibody levels by ELISA following treatment. *J Parasit Dis* 2014;38:124–7. <https://doi.org/10.1007/s12639-012-0204-2>

Yaro M, Munyard KA, Stear MJ, Groth DM. Combatting African Animal Trypanosomiasis (AAT) in livestock: The potential role of trypanotolerance. *Vet Parasitol* 2016; 225:43-52.

## Anexos Tabelas

**Tabela 1.** Estados e municípios da região Nordeste que encaminharam amostras de soros para detecção de anticorpos anti – *T. vivax* pelo ELISA-teste com resultados positivos e negativos.

Estado	Município	Número de amostras		
		Negativo	Positivo	Total
Ceará	Limoeiro do Norte	0	32	32
	Quixadá	8	25	33
	Quixaramobim	4	15	19
	Ocara	0	12	12
	Maranguape	1	11	12
	Tabuleiro	0	10	10
	Umiri	1	9	10
	Caucaia	1	9	10
	Orós	2	8	10
	Jaguarana	5	6	11
	Iguatu	4	5	9
	Morada Nova	3	2	5
	Cratéus	3	0	3
	Icó	1	0	1
			<b>33</b>	<b>144</b>
Pernambuco	Pedra	16	31	47
	São Bento da Uma	1	19	20
	Itaíba	10	15	25
	Venturosa	0	10	10
	Buique	8	7	15
	Brejo da Madre de Deus	10	7	17
	Bom Conselho	2	6	8
	Pesqueira	4	6	10
	Águas Belas	1	5	6
	Saloá	0	2	2
			<b>54</b>	<b>110</b>
Bahia	Capim Grosso	2	22	24
	Miguel Calmon	3	21	24
	Jacobina	1	11	12
	Queimadas	1	11	12
	Itarantim	10	6	16
	Ubatã	9	5	14
			<b>26</b>	<b>76</b>
Paraíba	Pilões	1	11	12
	Sapé	2	9	11
	Mogéiro	5	7	12
	Barra de Santana	17	5	22
	Mamanguape	4	5	9
		<b>29</b>	<b>37</b>	<b>68</b>

	Jucurutu	15	8	23
	Tenente Laurentino	5	5	10
<b>Rio Grande do Norte</b>	Santana do Mato	1	5	6
	São Vicente	2	3	5
	Lagoa Nova	6	2	8
	Currais Novos	6	0	6
		<b>35</b>	<b>23</b>	<b>58</b>
	Olho D'água do Casado	1	10	11
<b>Alagoas</b>	Major Izidoro	0	10	10
	Joaquim Gomes	2	8	10
		<b>3</b>	<b>28</b>	<b>31</b>

**Tabela 2.** Estados e municípios da região Centro-Oeste que encaminharam amostras de soros para detecção de anticorpos anti – *T.vivax* pelo ELISA-teste com resultados positivos e negativos.

Estado	Município	Número de amostras		
		Negativo	Positivo	Total
	Pontalina	94	70	164
	Orizona	16	64	80
	Edealina	38	54	92
	Catalão	21	37	58
	Maripotaba	16	22	38
	Joviania	8	18	26
	Itarumã	4	18	22
	Aragoiânia	0	12	12
	Vicentinópolis	11	11	22
	Água Limpa	1	11	12
	Gameleira de Goiás	0	11	11
	Buriti Alegre	3	10	13
<b>Goiás</b>	Itumbiara	0	10	10
	Rio Verde	11	9	20
	Ipameri	5	8	13
	Luiziânia	0	9	9
	Goiatuba	6	5	11
	Edéia	5	7	12
	Goiânia	0	7	7
	Pires do Rio	7	6	13
	Serranópolis	4	6	10
	Urutai	0	6	6
	Cezarina	5	5	10
	Bela Vista de Goiás	5	5	10
	Piracanjuba	2	5	7
	Santa Cruz de Goiás	0	4	4
	Morrinhos	2	4	6

	Caldas Novas	0	4	4
	Aloândia	3	2	5
	Caçu	12	1	13
	Rio Quente	1	0	1
		<b>280</b>	<b>441</b>	<b>721</b>
<b>Mato Grosso do Sul</b>	Nioaque	0	16	16
<b>Mato Grosso</b>	Pontes e Lacerda	8	8	16

**Tabela 3.** Estados e municípios da região Sudeste que encaminharam amostras de soros para detecção de anticorpos anti – *T.vivax* pelo ELISA-teste com resultados positivos e negativos.

Estado	Município	Número de amostras		
		Negativo	Positivo	Total
Minas Gerais	Governador Valadares	33	40	73
	Coromandel	8	37	45
	Patos de Minas	11	27	38
	Pará de Minas	7	27	34
	Maribá	16	21	37
	Três Corações	4	21	25
	Unai	3	19	22
	Frei Gaspar	7	17	24
	Abadia dos Dourados	8	16	24
	Prata	5	16	21
	Poté	10	12	22
	Araguari	9	12	21
	Belo Horizonte	0	12	12
	Pratinha	0	12	12
	Arceburgo	0	12	12
	Patrocínio	11	12	23
	Itambucuri	12	12	12
	Lagoa da Prata	20	12	32
	Martinho Campos	10	11	21
	Contagem	13	11	24
	Paracatu	13	11	24
	Santa Rita do Sapucaí	11	11	22
	Mateus Leme	14	11	25
	Sabinópolis	12	11	23
	São Gotardo	3	10	13
	Passos	13	10	33
	Morro da Garça	5	10	15
	Recreio	5	10	15
	Fernandes Tourinho	5	10	15
	Abaté	1	10	11
Uberlândia	7	10	17	

Bertópolis	6	8	14
Faria Lemos	7	8	15
Uberaba	7	5	12
Arcos	0	5	5
Martelândia	8	4	12
São Pedro dos Ferros	8	4	12
Jaboticatubas	5	4	9
São Gonçalo do Sapucaí	0	4	4
Virginópolis	9	3	12
Chalé	9	3	12
Serro	10	2	12
São Lourenço	8	2	10
Raul Soares	4	2	6
Ibitira	0	2	2
Carlos Chagas	23	1	24
Medeiros	11	1	12
Carmópolis	11	1	12
Perdizes	11	1	12
Bambuí	11	1	12
Monte Formoso	11	1	12
Guanhães	10	1	11
Coroaci	3	1	4
Entre Rios de Minas	2	1	3
São João Del Rei	12	0	12
Sete Lagoas	12	0	12
Águas Formosa	9	0	9
	<b>488</b>	<b>536</b>	<b>1024</b>

Estado	Município	Número de amostras		
		Negativo	Positivo	Total
São Paulo	São José dos Campos	31	17	48
	Rancharia	1	16	17
	Guaratinguetá	11	13	24
	Marília	34	12	46
	Itu	16	11	27
	Taubaté	1	11	12
	Taquarituba	1	11	12
	Itapetininga	1	11	12
	Brotas	3	11	14
	Caiuá	3	10	13
	Ribeirão do Sul	5	10	15
	Guzolândia	5	10	15

Cruzeiro	3	9	12
Mococa	3	9	12
Assis	3	9	12
Garça	3	9	12
Caçapava	3	8	11
Lourdes	9	8	17
Pedranópolis	3	8	11
Sales Oliveira	2	7	9
São Miguel Arcanjo	9	7	16
Brodowski	5	7	12
Norungaba	1	6	7
Avaré	11	5	16
Presidente Alves	10	5	15
Bananal	8	5	13
Cerqueira César	8	4	12
Santo Antônio da Alegria	19	3	22
Presidente Prudente	9	3	12
Colina	7	3	10
Patrocínio Paulista	10	2	12
Votuporanga	8	2	10
Fernão	33	1	34
Iacanga	11	1	12
Penápolis	11	0	11
Buri	10	0	10
	<b>311</b>	<b>264</b>	<b>575</b>

**Tabela 4.** Estados e municípios da região Sul que encaminharam amostras de soros detecção de anticorpos anti – *T.vivax* pelo ELISA-teste com resultados positivos e negativos.

Estado	Município	Número de amostras		
		Negativo	Positivo	Total
Paraná	Manoel Ribas	61	102	163
	Cascavel	69	90	159
	Castro	45	36	81
	Pitanga	14	25	39
	Laranjeiras do Sul	5	20	25
	Palmeira	46	19	65
	Boa Ventura do São Roque	12	11	23
	Campina Simão	1	11	12
	Roncador	0	11	11
	Entre Rios do Oeste	3	9	12
	Maripá	18	8	26
	Cândido de Abreu	10	8	18

Arapoti	5	7	12
Araruna	3	7	10
Engenheiro Beltrão	3	7	10
Virmond	0	7	7
Marmeleiro	0	6	6
Altamira do Paraná	6	5	11
Campina da Lagoa	6	4	10
Santa Maria do Oeste	13	3	16
Francisco Beltrão	10	3	13
Santo Antônio da Platina	10	2	12
Nova Tebas	7	2	9
Reserva	4	2	6
Enéas Marques	13	2	15
Pato Bragado	11	2	13
Terra Boa	12	1	22
Laranjal	12	1	13
	<b>400</b>	<b>411</b>	<b>811</b>

Estado	Município	Número de amostras		
		Negativo	Positivo	Total
Santa Catarina	Chapecó	47	58	105
	Quilombo	22	31	53
	Guatambú	12	29	41
	Xavantina	2	28	30
	São Carlos	33	26	59
	Xaxim	40	24	64
	São José do Cedro	8	18	26
	São Lorenzo do Oeste	4	11	15
	Pinhalzinho	10	10	20
	Nova Itaberaba	0	10	10
	Descanso	0	10	10
	Cordilheira Alta	0	10	10
	Vargeão	0	10	10
	Planalto Alegre	9	9	18
	Novo Horizonte	1	9	10
	Romelândia	1	9	10
	Águas de Chapecó	14	8	22
	Caibi	2	8	10
	Ouro Verde	2	8	10
	Braço do Norte	0	8	8
Rio Fortuna	0	8	8	
Saudades	8	9	17	
Marema	13	8	21	

Coronel Freitas	17	7	24
Campo Erê	7	7	14
São Vicentin	6	7	13
União do Oeste	0	7	7
Abelardo Luz	7	6	13
Bom Jesus	7	6	13
Modelo	7	6	13
Jupia	5	6	11
Guarujá do Sul	0	6	6
Cidade Cerqueira	6	5	11
Xanxerê	3	5	8
Faxinal dos Guedes	3	5	8
Treze de Maio	0	5	5
Anchieta	7	4	11
Grão Pará	4	4	8
Água Doce	8	3	11
São Domingos	1	3	4
Sul Brasil	11	2	13
Paial	4	2	6
	<b>331</b>	<b>455</b>	<b>786</b>

Estado	Município	Número de amostras		
		Negativo	Positivo	Total
	Senador Salgado Filho	16	36	52
	Santo Cristo	20	32	52
	Vista Gaúcha	7	20	27
	Trindade do Sul	14	19	33
	Boa Vista	5	18	23
	Cândido Godói	7	17	24
	Garruchos	4	16	20
	São Paulo das Missões	11	13	24
	Ubiretama	1	12	13
<b>Rio Grande do Sul</b>	São Jose Inhacorá	5	11	16
	Panambi	1	9	10
	Itacurubi	2	8	10
	Bom Jesus	0	8	8
	Santa Rosa	3	7	10
	Gramado dos Loureiros	1	7	8
	Alegria	0	7	7
	Sede Nova	8	6	14
	Augusto Pestana	4	6	10
	Rosário do Sul	4	6	10
	Campinas das Missões	3	6	9



Três Palmeiras	7	5	12
Mato Queimado	4	5	9
Rio Pardo	1	5	6
São Martinho	1	5	6
Pejuçara	6	4	10
Dois Irmãos	2	4	6
Charqueadas	2	4	6
Roca Sales	2	4	6
São José dos Ausentes	0	4	4
Victor Graeff	8	3	11
Santo Angelo	3	3	6
Miraguaí	2	3	5
Nova Bréscia	1	3	4
Ijuí	0	3	3
Tenente Portela	10	2	12
Nova Bassano	5	2	7
Giruá	3	2	5
Bozano	3	2	5
Não Me Toque	11	1	12
Erval Seco	8	1	9
Caiçara	4	1	5
Tuporendi	3	1	4
Três de Maio	3	1	4
Ronda Alta	3	1	4
Jaboticaba	1	1	2
Santiago	2	1	3
Palmeira das Missões	7	1	8
Salvador das Missões	6	1	7
Novo Machado	4	0	4
Humaitá	5	0	5
	<b>232</b>	<b>337</b>	<b>569</b>

**Tabela 5.** Estados e municípios que encaminharam amostras de soros de animais tratados com cloridrato de isometamidium para detecção de anticorpos anti – *T.vivax* pelo ELISA-teste com resultados positivos e negativos.

Municípios	UF	Número de amostras		
		Negativo	Positivo	Total
Pires do Rio	GO	5	17	22
Itumbiara	GO	5	17	22
Vicentinópolis	GO	12	7	19
Pontalina	GO	5	8	13
Pará de Minas	MG	7	27	34
Serro	MG	15	15	30

Prata	MG	11	15	26
Contagem	MG	7	14	21
Morro da Garça	MG	5	12	17
Martelândia	MG	8	8	16
Medeiros	MG	1	8	9
Mateus Leme	MG	2	7	9
Santa Rosa	RS	6	13	19
Assis	SP	3	14	17
São José dos Campos	SP	9	13	22
Garça	SP	3	12	15
Marília	SP	7	5	12
Presidente Prudente	SP	5	5	10
		<b>216</b>	<b>217</b>	<b>333</b>

**Tabela 6.** Número de amostras positivas por estados, nos períodos de seca e período de águas entre junho de 2020 a junho de 2021.

<b>Ceará</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	1	2	1	2			
jul/20	6	1	2	5			
ago/20	0	0	0	0			
set/20	0	0	0	0			
out/20	16	21	14	7	<b>Águas</b>	<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
nov/20	3	2	11	14			
dez/20	7	4	10	36			
jan/21	0	0	0	0			
fev/21	0	0	0	0			
mar/21	0	2	6	4			
abr/21	0	0	0	0			
mai/21	0	0	0	0	<b>SECA</b>	<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
jun/21	0	0	0	0		20	13
					<b>TOTAL</b>	<b>177</b>	<b>144</b>

<b>Permambuco</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	0	0	0	0			
jul/20	0	0	0	0			
ago/20	22	11	2	0			
set/20	1	12	5	2			
out/20	0	0	0	0	<b>Águas</b>	<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
nov/20	10	5	5	4			
dez/20	0	2	5	11			
jan/21	0	0	0	0			
fev/21	11	2	4	3			
mar/21	0	4	10	8			
abr/21	0	0	0	0			

mai/21	0	0	0	0	SECA	Total	Positivas
jun/21	8	10	3	0		76	45
					<b>TOTAL</b>	<b>160</b>	<b>108</b>
<b>Bahia</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	0	0	0	0			
jul/20	0	0	0	0			
ago/20	0	0	0	0			
set/20	0	0	0	0			
out/20	18	0	0	0			
nov/20	0	0	0	0		<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
dez/20	0	0	0	0	Águas	18	0
jan/21	0	0	0	0			
fev/21	0	0	0	0			
mar/21	0	0	0	0			
abr/21	0	0	0	0			
mai/21	2	12	8	2	SECA	Total	Positivas
jun/21	6	15	29	10		84	76
					<b>TOTAL</b>	<b>102</b>	<b>76</b>
<b>Paraíba</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	0	0	0	0			
jul/20	0	0	0	0			
ago/20	5	0	0	0			
set/20	0	0	0	0			
out/20	0	0	0	0			
nov/20	12	3	1	2		<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
dez/20	0	0	0	0	Águas	18	6
jan/21	0	0	0	0			
fev/21	0	0	0	0			
mar/21	0	0	0	0			
abr/21	8	14	10	4			
mai/21	0	0	0	0	SECA	Total	Positivas
jun/21	4	3	0	0		48	31
					<b>TOTAL</b>	<b>66</b>	<b>37</b>
<b>Rio Grande do Norte</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	0	0	0	0			
jul/20	0	0	0	0			
ago/20	11	2	0	0			
set/20	0	0	0	0			
out/20	0	0	0	0			
nov/20	0	0	0	0		<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
dez/20	16	3	10	4	Águas	45	21
jan/21	8	2	2	0			
fev/21	0	0	0	0			
mar/21	0	0	0	0			

abr/21	0	0	0	0			
mai/21	0	0	0	0	SECA	Total	Positivas
jun/21	0	0	0	0		13	2
					<b>TOTAL</b>	<b>58</b>	<b>23</b>
<b>Alagoas</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	0	0	0	0			
jul/20	0	0	0	0			
ago/20	0	0	0	0			
set/20	0	0	0	0			
out/20	0	0	0	0			
nov/20	1	3	8	9		<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
dez/20	0	0	0	0	Águas	31	28
jan/21	0	0	0	0			
fev/21	0	0	0	0			
mar/21	2	6	1	1			
abr/21	0	0	0	0			
mai/21	0	0	0	0	SECA	Total	Positivas
jun/21	0	0	0	0		0	0
					<b>TOTAL</b>	<b>31</b>	<b>28</b>
<b>Goiás</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	20	2	9	1			
jul/20	17	33	7	6			
ago/20	41	4	4	10			
set/20	0	0	0	0			
out/20	102	66	24	14			
nov/20	9	2	12	22		<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
dez/20	23	31	29	24	Águas	437	277
jan/21	0	0	0	0			
fev/21	10	10	9	14			
mar/21	16	10	2	8			
abr/21	4	21	13	4			
mai/21	13	6	1	1	SECA	Total	Positivas
jun/21	25	22	14	6		284	164
					<b>TOTAL</b>	<b>721</b>	<b>441</b>
<b>Minas Gerais</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	0	0	0	0			
jul/20	6	13	12	8			
ago/20	36	4	8	9			
set/20	59	17	4	1			
out/20	68	3	0	0			
nov/20	39	29	34	22		<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
dez/20	20	31	31	62	Águas	505	309
jan/21	3	4	2	2			
fev/21	25	26	14	16			

mar/21	41	21	5	7			
abr/21	24	16	11	5			
mai/21	19	21	2	2	SECA	Total	Positivas
jun/21	148	37	32	25		519	227
					<b>TOTAL</b>	<b>1024</b>	<b>536</b>
<b>São Paulo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	15	17	7	5			
jul/20	36	7	4	2			
ago/20	68	7	2	0			
set/20	10	12	1	0			
out/20	15	16	4	1			
nov/20	18	4	5	3		<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
dez/20	12	11	12	32	Águas	<b>250</b>	<b>126</b>
jan/21	21	10	5	0			
fev/21	11	0	1	0			
mar/21	47	9	6	7			
abr/21	4	12	4	9			
mai/21	35	22	3	4	SECA	Total	Positivas
jun/21	19	11	6	3		325	138
					<b>TOTAL</b>	<b>575</b>	<b>264</b>
<b>Rio Grande do Sul</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	28	8	8	7			
jul/20	43	40	18	25			
ago/20	56	8	10	5			
set/20	28	2	0	2			
out/20	0	0	0	0			
nov/20	1	8	6	5		<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
dez/20	2	4	4	0	Águas	<b>78</b>	<b>52</b>
jan/21	0	0	0	0			
fev/21	17	13	4	2			
mar/21	6	4	0	2			
abr/21	6	11	7	3			
mai/21	20	42	18	10	SECA	Total	Positivas
jun/21	25	33	16	12		491	285
					<b>TOTAL</b>	<b>569</b>	<b>337</b>
<b>Santa Catarina</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	11	15	6	11			
jul/20	51	27	13	6			
ago/20	7	2	1	1			
set/20	0	0	0	0			
out/20	95	31	11	10			
nov/20	1	11	17	64		<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
dez/20	12	15	3	5	Águas	<b>465</b>	<b>257</b>

jan/21	21	25	5	1			
fev/21	45	17	4	4			
mar/21	34	22	3	9			
abr/21	4	13	1	2			
mai/21	2	14	10	18	SECA	Total	Positivas
jun/21	48	24	22	12		321	198
					<b>TOTAL</b>	<b>786</b>	<b>455</b>
<b>Paraná</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo Fraco</b>	<b>Positivo Médio</b>	<b>Positivo Forte</b>			
jun/20	8	10	2	4			
jul/20	64	12	8	3			
ago/20	48	1	1	1			
set/20	20	25	9	6			
out/20	13	11	3	0			
nov/20	3	5	1	0		<b>Total</b>	<b>Positivas</b>
dez/20	10	12	8	9	Águas	<b>300</b>	<b>176</b>
jan/21	10	7	0	1			
fev/21	62	13	17	17			
mar/21	26	31	14	27			
abr/21	4	5	18	18			
mai/21	43	30	5	7	SECA	Total	Positivas
jun/21	89	38	21	11		511	235
					<b>TOTAL</b>	<b>811</b>	<b>411</b>