



**MATHEUS DE OLIVEIRA REIS**

**PERDAS ECONÔMICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO POR  
*Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DE MINAS GERAIS**

**LAVRAS – MG  
2021**

**MATHEUS DE OLIVEIRA REIS**

**PERDAS ECONÔMICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO POR *Trypanosoma vivax* EM  
BOVINOS DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Patologia Animal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dra. Mary Suzan Varaschin  
Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Reis, Matheus de Oliveira.

Perdas econômicas associadas à infecção por *Trypanosoma vivax* em bovinos de Minas Gerais / Matheus de Oliveira Reis. - 2021.

57 p. : il.

Orientador(a): Mary Suzan Varaschin.

Coorientador(a): Elaine Maria Seles Dorneles.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Anemia. 2. Doenças parasitárias. 3. Ruminantes. I. Varaschin, Mary Suzan. II. Dorneles, Elaine Maria Seles. III. Título.

**MATHEUS DE OLIVEIRA REIS**

**PERDAS ECONÔMICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO POR *Trypanosoma vivax* EM  
BOVINOS DE MINAS GERAIS**

**ECONOMIC LOSSES ASSOCIATED WITH *Trypanosoma vivax* INFECTION IN  
CATTLE FROM MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Patologia Animal, para a obtenção do título de Doutor

APROVADA em 25 de agosto de 2021

Dra. Mary Suzan Varaschin -UFLA  
Dra. Angélica Terezinha Barth Wouters -UFLA  
Dr. Djeison Lutier Raymundo -UFLA  
Dr. Flademir Wouters -UFLA  
Dr. Pedro Soares Bezerra Júnior -UFPA

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mary Suzan Varaschin  
Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde e por ser luz em meu caminho.

À minha mãe Romilda, meu amor maior, meu melhor exemplo de pessoa, obrigado por ser exatamente quem você é, por estar sempre comigo; Deus me deu de presente a oportunidade de ser seu filho. Aos meus avós, Dona Maria (*in memoriam*) e Seu Joaquim, por serem meu porto seguro, meus guias e mestres, formados pelo dia-a-dia no campo, onde conquistaram o sucesso através do próprio suor, e me mostraram que os dias de glória sempre vem depois dos dias de luta. Ao Jonathan, pelo companheirismo e presença nos dias bons e também nos dias difíceis.

A Universidade Federal de Lavras, por fazer parte da minha história e trajetória como médico veterinário. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A Mary Suzan Varaschin, minha orientadora, sou imensamente grato e feliz por ter você em minha vida, que me ajudou de forma tão intensa a trilhar este caminho, ensinando e orientando da melhor forma. Também aos demais professores da Patologia, Angélica T. B. Wouters, Djeison L. Raymundo e Flademir Wouters, foi um privilégio aprender com vocês. Vocês foram essenciais na minha trajetória e eu sou eternamente grato por isso.

A Elaine Maria Seles Dorneles, minha coorientadora, que me auxiliou em diversos momentos. Obrigado pela paciência e por dividir comigo seus conhecimentos.

A todos os pós-graduandos do Setor de Patologia Veterinária, obrigado pela ajuda na execução deste trabalho. Em especial a Adriana Albuquerque, Fernanda Souza e Ivam Moreira Júnior, por serem amigos que compartilharam conhecimento, boas risadas e suporte em momentos difíceis.

Aos estagiários do Setor, obrigado por toda a ajuda de vocês, em especial, aos alunos de Iniciação Científica, Fernanda Monteiro, Thaís Aurora e Débora Procópio.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro.

**Muito obrigado!**

“O que passou, passou, mas o que passou luzindo, resplandecerá para sempre.”  
(Johann Goethe)

## RESUMO

A tripanossomíase é uma doença causada por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma*, sendo *T. vivax* o agente etiológico mais importante para bovinos. O objetivo deste estudo foi descrever as perdas econômicas associadas à infecção por *Trypanosoma vivax* em fazendas de diferentes regiões de Minas Gerais. Nos anos de 2016 a 2019 foram acompanhadas 46 fazendas com bovinos suspeitos de infecção por *T. vivax*. Nestas, além do acompanhamento clínico e tratamento dos animais, foi aplicado um questionário visando quantificar as perdas econômicas da propriedade. Quatorze rebanhos foram positivos para *T. vivax*, com diagnóstico realizado por meio de esfregaços sanguíneos, PCR do sangue e sequenciamento de algumas amostras. Entre elas foram selecionadas oito propriedades para análise das perdas econômicas. Foram avaliados os custos referentes às mortes de vacas e bezerros, queda na produção leiteira, custos com veterinários, custos com tratamentos e perdas com abortos. Os principais sinais clínicos observados foram apatia, anorexia, queda na produção de leite, emagrecimento progressivo e alterações reprodutivas. O prejuízo econômico nestas propriedades variou de R\$ 10.610,00 a 154.130,00. Nestes valores a perda com a produção de leite está demonstrada como valor diário. Se incluído o período de recuperação da produção láctea, com uma média de 120 dias, este valor pode variar de R\$ 23.700,00 a 242.600,00. A tripanossomíase pode levar a perdas econômicas significativas na cadeia produtiva leiteira de Minas Gerais. O diagnóstico correto aliado a tratamento rápido e medidas de controle contribuem para a redução significativa destes custos.

**Palavras-chave:** Anemia. Doenças parasitárias. Ruminantes. Tripanossomíase.

## ABSTRACT

Trypanosomiasis is a disease caused by a pathogenic protozoa of the genus *Trypanosoma*, and *T. vivax* is the most important etiologic agent for cattle. The aim of this study was to describe the economic losses associated with *T. vivax* infection in farms from different mesoregions of Minas Gerais. In the years 2016 to 2019, 46 farms with cattle suspected of being infected with *T. vivax* were monitored. In addition to the clinical monitoring and treatment of the animals, a questionnaire was applied to quantify the economic losses of the farm. Fourteen herds were positive for *T. vivax*, diagnosed by visualization of trypomastigote forms in blood smears, PCR and DNA sequencing of some samples. Among them, eight farms were selected for analysis of economic losses. The costs related to the death of cows and calves, drop in milk production, costs with veterinarians assistance, treatments and losses with abortions were evaluated. The main clinical signs observed were apathy, anorexia, drop in milk production, weight loss and reproductive failures. The economic losses on these properties ranged from R\$ 10,610.00 to 154,130.00. In these values, the loss with milk production is shown as a daily value. If we amplify it for the period of milk production recovery, with an average of 120 days this value can vary from R\$ 23.700,00 to 242.600,00. Trypanosomiasis can lead to significant economic losses in the milk production chain in Minas Gerais. Correct diagnosis with rapid treatment and control measures contribute to a significant reduction in these costs.

**Keywords:** Anemia. Parasitic diseases. Ruminants. Trypanosomiasis.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figura 1-	Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. Vaca com emagrecimento progressivo. ....	42
Figura 2-	Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. Vaca com edema submandibular .....	42
Figura 3-	Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. <i>Trypanosoma vivax</i> na forma tripomastigota em esfregaço sanguíneo. Panótico Rápido. 100x. ....	43

### ARTIGO 2

Figura 2-	Meningoencefalite necrotizante fatal por <i>Sarcocystis hirsuta</i> em bovino. Infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos em SNC. HE. 20x .....	55
Figura 2-	Meningoencefalite necrotizante fatal por <i>Sarcocystis hirsuta</i> em bovino. Protozoário morfológicamente compatível com <i>Sarcocystis</i> spp. HE. 100x. ..	55
Figura 3-	Meningoencefalite necrotizante por <i>Sarcocystis hirsuta</i> em bovino. Protozoários em forma de rosetas, morfológicamente compatíveis com <i>Sarcocystis</i> spp. HE. 40x. ....	56
Figura 4-	Meningoencefalite necrotizante por <i>Sarcocystis hirsuta</i> em bovino. Protozoário em forma de roseta, morfológicamente compatíveis com <i>Sarcocystis</i> spp. HE. 100x. ....	56

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
2.1 Etiologia.....	12
2.2 Taxonomia.....	12
2.3 Morfologia.....	12
2.4 Ciclo biológico.....	12
2.5 Epidemiologia.....	13
2.6 Transmissão.....	14
2.6.1 Transmissão por <i>Glossina</i> spp. (Tsé-tsé).....	14
2.6.2 Transmissão mecânica por dípteros.....	14
2.6.3 Transmissão transplacentária.....	15
2.6.4 Transmissão por colostro.....	16
2.6.5 Transmissão iatrogênica.....	16
2.6.6 Transmissão por carrapatos.....	17
2.7 Sinais clínicos.....	18
2.8 Aspectos imunológicos.....	18
2.9 Diagnóstico.....	19
2.9.1 Esfregaço sanguíneo.....	19
2.9.2 Lesão de necropsia e histopatologia.....	19
2.9.3 PCR.....	20
2.10 Tratamento.....	20
2.11 Avaliação Econômica.....	21
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>22</b>

### SEGUNDA PARTE

<b>ARTIGO 1 – Impacto econômico da tripanossomose em rebanhos bovinos de Minas Gerais, Brasil.....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO 1 – Questionário de perdas econômicas.....</b>	<b>44</b>
<b>ARTIGO 2 – Meningoencefalite necrotizante fatal por <i>Sarcocystis hirsuta</i> em bovinos..</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As mortes de bovinos associadas às várias espécies de *Trypanosoma* na África podem chegar a três milhões de mortes/ano, com um prejuízo econômico na pecuária de aproximadamente US\$ 1,2 bilhão (CHAMOND et al., 2010). Minas Gerais possui um rebanho bovino efetivo de 19.575.830 cabeças, bastante significativo na Região Sudeste, principalmente no que diz respeito à pecuária de leite. O estado é considerado o maior produtor de leite no Brasil, responsável pela produção de 8.746.559 de litros em 2017 (IBGE, 2017), desta forma, o impacto da tripanossomíase para a economia da região pode ser considerável.

Manifestações clínicas associadas à tripanossomíase são inespecíficas, podendo ser confundidas com outras doenças. A tripanossomíase em ruminantes tem sido relacionada com sinais clínicos de apatia, anorexia, febre, anemia severa, perda de peso (SILVA et al., 1997; BATISTA et al., 2007; GALIZA et al., 2011; REIS et al., 2019), alterações neurológicas como incoordenação, hipermetria, tremores musculares, fasciculações, opistótono, cegueira, estrabismo (SILVA et al., 1997; BATISTA et al., 2007) e pressão da cabeça contra obstáculos (GALIZA et al., 2011). Também são relatados abortos e mortes neonatais (GALIZA et al., 2011; REIS et al., 2019). Porém, em visitas a propriedades na área de estudo com tripanossomíase, a infecção foi identificada também em bovinos clinicamente normais, podendo esses animais estar numa fase inicial da doença ou mesmo ter infecção subclínica, sugerindo o aparecimento de cepas adaptadas ao hospedeiro vertebrado. A severidade da doença depende da cepa parasitária, se a ocorrência é endêmica e também da espécie hospedeira, porém aspectos importantes da interação de *T. vivax* e seus hospedeiros continuam desconhecidos (CHAMOND et al., 2010). Várias evidências fragmentadas apontam para a importância de fatores genéticos do hospedeiro vertebrado para determinar a suscetibilidade individual e/ou resistência à infecção (CHAMOND et al., 2010).

Lesões microscópicas podem ser um indicativo da doença, sendo descritas hiperplasia da polpa branca do baço e nefrite intersticial. Quando há acometimento do sistema nervoso central (SNC), podem ocorrer meningite, meningoencefalite e meningoencefalomielite (BATISTA et al., 2008; REIS et al., 2019). Por não serem lesões características, outras doenças devem ser incluídas no diagnóstico diferencial. Desta forma, para o diagnóstico

conclusivo torna-se necessária a realização de esfregaços sanguíneos, necropsia, avaliação histopatológica e PCR.

Nos relatos da infecção por *T. vivax* (REIS et al., 2019), ficam evidentes os prejuízos causados pelo parasito na pecuária, no entanto, dados estatísticos sobre as perdas econômicas provocadas por essa enfermidade no Brasil são escassos (SEIDL et al., 1999). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar as perdas econômicas causadas pela infecção por *T. vivax* em rebanhos bovinos do estado de Minas Gerais.

## **1. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.1. Etiologia**

A tripanossomíase é uma doença causada por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma* (BATISTA et al., 2007), sendo *T. vivax* considerado o agente mais importante da tripanossomíase em bovinos (BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008) e ovinos (GALIZA et al., 2011). *T. evansi* é considerado bastante patogênico para equinos, causando o “Mal das cadeiras”. Já em bovinos, asininos, caprinos e ovinos a doença causada por *T. evansi* ocorre de forma mais branda (CARNEIRO, 2010).

### **1.2. Taxonomia**

*Trypanosoma vivax* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, espécie *Trypanosoma vivax*, subgênero *Duttonellae* (SOULSBY, 1982; CARNEIRO, 2010).

### **1.3. Morfologia**

*T. vivax* é achatado, tem forma de foice, núcleo grande e central, cinetoplasto grande, extremidade posterior arredondada e um flagelo livre. Ele deve ser diferenciado de *T. evansi*, que possui os mesmos vetores de *T. vivax* e, na sua forma tripomastigota, apresenta núcleo bem visível, cinetoplasto pequeno (praticamente invisível), membrana ondulante bem visível e grânulos no citoplasma (CARNEIRO, 2010).

### **1.4. Ciclo biológico**

Os tripanossomas são classificados com base no modo de transmissão em Seção Stercoraria e Seção Salivaria. Na Stercoraria a transmissão é contaminativa, ou seja, o agente é transmitido através das fezes do hospedeiro invertebrado. Nesta seção está *T. cruzi*, agente

etiológico da doença de Chagas, que tem como hospedeiro vertebrado humanos e outros primatas, cães, gatos e reservatórios silvestres e, como hospedeiros invertebrados, hemípteros hematófagos conhecidos como “barbeiros” (CARNEIRO, 2010). Na seção Salivaria a transmissão ocorre pela picada do hospedeiro invertebrado ou por inoculação direta. Esta Seção inclui *T. vivax* e *T. evansi*, os agentes mais importantes da tripanossomíase na América do Sul (SILVA et al., 2002).

Durante seu ciclo biológico os tripanossomas podem apresentar formas estruturalmente distintas, denominadas estádios. Os estádios têm a seguinte terminologia: amastigota - corpo arredondado, sem flagelo livre; promastigota - corpo alongado, com flagelo na extremidade anterior, sem membrana ondulante; epimastigota - o cinetoplasto é próximo e anterior ao núcleo e o flagelo sai livremente, com membrana ondulante curta; tripomastigota metacíclico - nome dado para a forma infectante no hospedeiro vertebrado, possui as mesmas características dos tripomastigotas, porém são menores; tripomastigota - o blefaroplasto (estrutura onde se origina o flagelo) e o cinetoplasto (organela formada por um segmento de mitocôndria que contém um tipo especial de DNA, o kDNA, que nomeia a ordem Kinetoplastida) são posteriores ao núcleo e próximos à extremidade posterior, a membrana ondulante percorre todo o corpo do parasito e há flagelo livre na extremidade anterior (SOULSBY, 1982; CARNEIRO, 2010).

No hospedeiro vertebrado não se observa reprodução sexuada no ciclo de vida de *Trypanosoma* spp., todos se multiplicam por fissão binária ou múltipla. A divisão começa no cinetoplasto, seguido do núcleo e do citoplasma. Na Seção Salivaria, a divisão é principalmente no estágio tripomastigota e ocorre no sangue (SOULSBY, 1982).

### **1.5. Epidemiologia**

A tripanossomíase por *T. vivax* é uma doença que acomete bovinos (BATISTA et al., 2007), ovinos (GALIZA et al., 2011), caprinos, equinos, camelos, búfalos e antílopes (RIET-CORREA, 2007). O primeiro relato de infecção por *T. vivax* no Brasil ocorreu em búfalos no estado do Pará em 1972 (SHAW; LAINSON, 1972). Posteriormente, casos de tripanossomíase por *T. vivax* foram diagnosticados em bovinos nos estados do Amapá (SERRA-FREIRE, 1981), Mato Grosso (SILVA et al., 1996), Mato Grosso do Sul (PAIVA et al., 1997), Tocantins (LINHARES et al., 2006), Paraíba (BATISTA et al., 2008), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009), Maranhão (MELO et al., 2011), São Paulo (CADIOLI et al., 2012, SALGADO et al., 2011), Goiás (BASTOS et al., 2017), Sergipe (VIEIRA et al., 2017), Rio Grande do Norte (BATISTA et al., 2018), Pernambuco e Alagoas (ANDRADE NETO et

al., 2019), Rio de Janeiro (COSTA et al., 2020), Espírito Santo (SCHMITH et al., 2020) e Bahia (GOMES et al., 2021). Também foram identificados caprinos infectados no estado de Santa Catarina (FÁVERO et al., 2016) e equinos no Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2011). Em Minas Gerais, o primeiro diagnóstico ocorreu na região de Igarapé, região metropolitana de Belo Horizonte (CARVALHO et al., 2008). Anos mais tarde, a doença se alastrou pelo estado, sendo diagnosticada na Região Sul e Sudoeste de Minas Gerais (REIS et al., 2019). Estes achados demonstraram a disseminação da infecção pelo parasito no estado de Minas Gerais.

A doença apresenta alta morbidade, com mortalidade variável. Em um surto ocorrido no Semiárido Brasileiro, de 130 vacas da propriedade, 64 (49,2%) tiveram manifestações clínicas e 11 (8,4%) vieram a óbito (BATISTA et al., 2007). No surto ocorrido em Minas Gerais, a mortalidade chegou a 70 no total de 200 vacas de um rebanho (REIS et al., 2019).

## **1.6. Transmissão**

### **1.6.1. Transmissão por *Glossina* spp (Tsé-tsé)**

No continente africano, *T vivax* é transmitido ciclicamente pelas moscas *Glossina* spp. (Tsé-tsé). Estas moscas são os vetores biológicos, ocorrendo desenvolvimento do protozoário no interior dos insetos, que são considerados seus principais vetores (SILVA et al., 2002).

As moscas tsé-tsé se infectam com as formas tripomastigotas sanguíneas, que se transformam em formas epimastigotas no esôfago e na faringe do inseto. Essas formas migram para o canal alimentar do inseto vetor, onde se multiplicam. Em seguida migram novamente em direção à hipofaringe para se transformarem em tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes (SILVA et al., 2002). As tripomastigotas metacíclicas acumuladas em partes bucais e glândula salivar do artrópode são transmitidas quando este se alimenta de sangue de animais vertebrados (SOULSBY, 1982).

A mosca tsé-tsé pode transmitir o parasito de forma cíclica por toda sua vida, já a habilidade para transmissão mecânica dos tripanossomas é de curta duração (minutos), o que depende da sobrevivência dos parasitos nas peças bucais do inseto (SILVA et al., 2002). Essa transmissão contínua do parasito dificulta mecanismos de controle e profilaxia da doença, que é importante causa de prejuízos econômicos no continente africano (CHAMOND et al., 2010). No Brasil, devido à ausência desse inseto, o ciclo biológico e essa forma de transmissão não ocorrem.

### **1.6.2. Transmissão mecânica por dípteros**

Em áreas onde não há a mosca tsé-tsé, como no Brasil, *T. vivax* tem como vetores *Stomoxys* sp., tabanídeos (CARNEIRO, 2010) e *Haematobia irritans* (mosca dos chifres) (CADIOLI et al., 2012), nos quais ocorre transmissão sem crescimento ou multiplicação no interior dos insetos. A adaptação à transmissão mecânica permitiu a disseminação da infecção por *T. vivax* na América Central e do Sul (BATISTA et al., 2008).

Alguns fatores de risco possibilitam que os animais adquiram e transmitam o agente através de vetores, como o agrupamento de animais de diferentes propriedades em locais de descanso durante viagens longas, compartilhamento de agulhas (SILVA et al., 1997), alta parasitemia e disponibilidade de hospedeiros suscetíveis, sendo que o aumento da população de mutucas (*Tabanus* sp.) e moscas dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) pode predispor a ocorrência de surtos (BATISTA et al., 2008).

A importância da transmissão mecânica é variável de um lugar para outro, dependendo do número de hospedeiros e dos vetores mecânicos. Os tabanídeos podem desempenhar papel significativo na transmissão, distribuindo e mantendo a infecção em rebanhos nos períodos chuvosos. Existe correlação entre o aumento na infecção por *T. vivax* e a estação de chuvas, uma vez que no período chuvoso as moscas da família Tabanidae ocorrem em maior quantidade (DESQUESNES et al., 2004).

### **1.6.3. Transmissão transplacentária**

A transmissão transplacentária é a forma de transmissão do parasito da mãe ao feto. A transmissão pode ocorrer durante o período de gestação ou quando o feto entra em contato com o sangue da mãe infectada no momento do parto, quando há ruptura vascular. Esta via de transmissão tem importância principalmente por auxiliar na manutenção da estabilidade enzoótica de infecções por *T. vivax* na América do Sul (COUTO, 2019).

Alterações reprodutivas são frequentes e responsáveis por causar abortamentos, partos prematuros e repetição de cios (REIS et al., 2019). Meléndez et al. (1993) relataram o caso de um bezerro com esfregaço positivo para *T. vivax* cinco horas após o nascimento, além da elevação dos níveis de anticorpos testados até 80 dias após o parto. Um estudo com infecção experimental em ovelhas prenhas demonstrou PCR positiva para *T. vivax* em 100% dos fetos, além de lesões histológicas, como encefalite e miocardite, em alguns deles. Houve, ainda, necrose do epitélio coriônico da placenta de algumas ovelhas, o que demonstra que há passagem transplacentária do agente, sendo esta uma importante causa de alterações reprodutivas (SILVA et al., 2013).

Cabras infectadas experimentalmente, quando comparadas aos animais controle, apresentaram ovários reduzidos de tamanho, com superfície lisa, sem folículos ou corpo lúteo, demonstrando inatividade ovariana. Na avaliação histológica houve redução significativa no número de folículos primordiais e primários nas cabras infectadas, enquanto o número de folículos no grupo controle permaneceu normal, evidenciando desenvolvimento folicular inicial anormal (RODRIGUES et al., 2013).

Em um estudo com infecção experimental de ovinos machos foram observadas flacidez e palidez testicular. Na avaliação histopatológica houve degeneração testicular, caracterizada por diminuição de células da linhagem germinativa e diminuição da altura do epitélio seminífero (BEZERRA et al., 2008). A patogenia envolvida nas lesões reprodutivas não está bem elucidada. Algumas hipóteses são relacionadas, como a hipertermia, que pode atuar no processo degenerativo testicular, além da possibilidade do próprio parasito ser causador direto da lesão nos tecidos, já que houve detecção do seu DNA pela técnica da PCR nos órgãos reprodutivos (RODRIGUES et al., 2013).

#### **1.6.4. Transmissão por colostro**

A transmissão de *T. cruzi* em humanos através de colostro e leite materno é bem conhecida, no entanto, não existem evidências da transmissão de *T. vivax* através do colostro. Avaliou-se a possibilidade da transmissão de *T. vivax* através do colostro em cabras. Para isso foram utilizadas doze cabras, das quais seis foram infectadas e seis foram usadas como controle. Avaliou-se a presença do DNA do parasito no colostro coletado após o parto, que posteriormente foi ministrado aos filhotes recém-nascidos das cabras saudáveis, e então, os mesmos foram submetidos a exames parasitológicos e moleculares. Algumas amostras de colostro das cabras infectadas resultaram positivas para o DNA do parasito. Porém os resultados para as possibilidades da transmissão mostraram-se negativos nos filhotes amamentados (BEZERRA, 2017).

#### **1.6.5. Transmissão iatrogênica**

A transmissão iatrogênica ocorre por meio de fômites contaminados com *T. vivax*. Nos surtos de *T. vivax* ocorridos no Brasil houve aumento dos casos relacionados a esse modo de transmissão, principalmente em vacas leiteiras. A transmissão pode ocorrer por utilização de agulhas compartilhadas para administração de medicamentos, ocitocina, vacinas e também reutilização de instrumentos cirúrgicos. Nestes casos, as agulhas ou instrumentos utilizados

em intervalos suficientemente curtos, em que o sangue não coagulou e sem procedimento de desinfecção entre as utilizações (COUTO, 2019; REIS et al., 2019; BASTOS et al, 2020a).

Em rebanhos, geralmente de vacas Girolando, para facilitar a ordenha, muitas vezes é utilizada injeção de ocitocina exógena. O hormônio na corrente sanguínea estimula a ejeção do leite. Foi verificado que o produto líquido da ocitocina, originalmente transparente, se torna avermelhado após aplicações, devido a mistura constante de sangue com o produto (COUTO, 2019).

Nos surtos ocorridos em Minas Gerais, a principal via de transmissão foi através do compartilhamento de agulhas contaminadas na administração de ocitocina (REIS et al., 2019).

#### **1.6.6. Transmissão por carrapatos**

Há diversos relatos sobre a possível atuação dos carrapatos como vetores, biológicos ou mecânicos (KRIGE et al., 2019). Esta averiguação parte da observação de formas flageladas de diferentes espécies de tripanossoma em diferentes espécies de carrapato (MORZARIA et al., 1986). Formas tripomastigotas de *T. vivax* foram encontradas em ovários, peças bucais, glândulas salivares e hemolinfa dos carrapatos de bovinos (*Rhipicephalus microplus*) previamente infectados, porém não foi atestada a capacidade do artrópode de atuar como vetor do protozoário (RODRÍGUEZ-VIVAS et al., 2003).

A única evidência da possível transmissão biológica de tripanossomas pela picada de carrapato foi em 1986. Este estudo foi realizado a partir de carrapatos infectados com parasitos semelhantes a tripanossomas, possivelmente *T. theileri* com base em semelhanças morfológicas. Foram utilizados três bezerros, sendo um inoculado com uma suspensão de tripanossomas oriundos dos carrapatos infectados por via intravenosa e subcutânea. Nos outros dois bezerros foram colocados carrapatos adultos infectados nas orelhas. Em um destes bezerros infestados com os carrapatos foram observados organismos flagelados em linfonodo aumentado, porém apenas em um dia. Não houve detecção em esfregaços sanguíneos, nem em outros linfonodos (MORZARIA et al., 1986).

O potencial de transmissão de *T. evansi* foi investigado em roedores de laboratório, por via oral. Primeiro, os roedores foram alimentados com sangue infectado, resultando em 70% dos roedores com parasitemia. Para o segundo experimento, ratos não infectados foram alimentados com *Rhipicephalus sanguineus* adultos ingurgitados, que originalmente se alimentaram de sangue de ratos parasitêmicos. Apesar da ingestão de até 75 carrapatos infectados durante três dias consecutivos, nenhum tripanossoma foi observado em qualquer um dos ratos (VERGNE et al., 2011).

A transmissão transovariana é uma rota alternativa para a manutenção do parasito na natureza. Essa possibilidade tem sido proposta e averiguada a partir da observação de organismos flagelados nos ovários de carrapatos. Apesar do potencial para abrigar tripanossomas em seus tecidos reprodutivos, a infecção dos ovos não foi comprovada, sendo necessárias maiores investigações (KRIGE et al., 2019).

Há evidências da participação do carrapato no ciclo de vida do protozoário, porém sua capacidade de transmissão em condições naturais e sua possível atuação na manutenção do parasito na natureza ainda permanecem obscuras. Novos estudos precisam ser realizados para validação das hipóteses.

### **1.7. Sinais clínicos**

Em bovinos infectados são observadas apatia, anorexia, febre, anemia severa e perda de peso. Em alguns casos pode haver alterações neurológicas, como incoordenação, hipermetria, tremores musculares, fasciculações, opistótono, cegueira e estrabismo (SILVA et al., 1997; BATISTA et al., 2007; REIS et al., 2019).

Ovinos afetados apresentaram mucosas pálidas, perda de apetite, perda de peso, pelos arrepiados, edema submandibular, diarreia e morte. Em casos de acometimento do SNC pode haver apatia, tremores musculares e pressão da cabeça contra obstáculos. Também são relatados abortos e mortes neonatais (GALIZA et al., 2011).

No Rio Grande do Sul, cavalos que tinham manifestação de mucosas pálidas, febre, perda de peso e edema em região ventral do corpo incluindo prepúcio ou vulva foram diagnosticados com *T. vivax* em esfregaços sanguíneos e PCR (SILVA et al., 2011).

### **1.8. Aspectos imunológicos**

Um dado importante para os tripanossomas da seção Salivaria é a habilidade destes organismos de evadir (escapar) do sistema imune do hospedeiro vertebrado pela produção de cepas com diferentes características antigênicas, resultando em sucessivas ondas de parasitemia em intervalos de poucos dias; cada onda representa a multiplicação de uma população de um novo tipo antigênico. O decréscimo da parasitemia representa a destruição dessa determinada população por anticorpos. Sendo assim, a persistência da infecção ocorre por falhas da resposta imune às mudanças repetitivas nas características antigênicas do tripanossoma (SOULSBY, 1982).

Desta forma, proteínas de superfície foram identificadas em *T. vivax*, sendo o antígeno GM6 de *Trypanosoma vivax* (TvGM6) associado ao flagelo (PILLAY et al., 2013), e a ILDat2.1 expressa por tripanossomas da Uganda adaptados a passagens em camundongos. Essa variação antigênica é importante para a resposta imunológica contra o agente e para a cronicidade da infecção, possibilitando a transmissão do agente para outros animais suscetíveis (GARDINER et al., 1996).

## **1.9. Diagnóstico**

### **1.9.1. Esfregaço sanguíneo**

Permite a visualização de estruturas parasitárias na forma de tripomastigotas. As características morfológicas desta fase de *T. vivax* são forma de foice e achatado, núcleo grande e central, cinetoplasto grande, extremidade posterior arredondada e um flagelo livre (CARNEIRO, 2010, REIS et al., 2019).

Em um estudo experimental com caprinos foram observados tripanossomas nos esfregaços sanguíneos de todos os animais infectados no 3º dia após infecção. A parasitemia aumentou progressivamente, atingindo nível máximo entre 7º e 14º dia após infecção. Posteriormente, houve diminuição rápida para níveis baixos, alternados com períodos em que os parasitos não eram detectáveis em exame direto de esfregaços de sangue, o que evidencia a característica de intermitência desses parasitos no sangue (RODRIGUES et al., 2013).

### **1.9.2. Achados de necropsia e histopatologia**

Os achados de necropsia em bovinos incluem aumento de volume em linfonodos e baço, com polpa branca proeminente (BATISTA et al., 2007; REIS et al., 2019). Também são descritas petéquias e equimoses multifocais em pulmões, coração, baço, fígado, rins, vesícula urinária, vesícula biliar, trato gastrointestinal e nas superfícies serosas das cavidades pericárdica, torácica e abdominal (GARDINER et al., 1989), rins acobreados com pontos brancos na cortical, coração com discreta dilatação do ventrículo direito e fígado com evidenciação do padrão lobular (REIS et al., 2019). No exame histopatológico essas lesões se caracterizam por hiperplasia da polpa branca do baço, nefrite intersticial (BATISTA et al., 2007; REIS et al., 2019), congestão e hemorragia em vários órgãos (GARDINER et al., 1989; REIS et al., 2019), atrofia centrolobular de cordões de hepatócitos com fibrose periportal associada a infiltrado linfoplasmocítico, além de miocardite linfoplasmocítica (REIS et al., 2019).

Em ovinos são relatados perda da condição corporal, mucosas pálidas, sangue mais aquoso, linfonodos e baço discretamente aumentados de volume, atrofia da gordura pericárdica, líquido translúcido em cavidades torácica e abdominal e no saco pericárdico (GALIZA et al., 2011). Camundongos experimentalmente inoculados tiveram lesões semelhantes às dos ruminantes, com esplenomegalia acentuada por aumento de polpa branca. O fígado apresentava focos brancacentos discretos, variando de 0,05 a 0,2 cm (CHAMOND et al., 2010).

Em casos de acometimento do SNC em bovinos pode haver espessamento e amarelamento das meninges (BATISTA et al., 2007). Microscopicamente podem ser observadas meningite, meningoencefalite (BATISTA et al., 2007; REIS et al., 2019), meningoencefalomielite, com infiltrado de linfócitos, plasmócitos, células Mott e macrófagos, assim como áreas de malácia com vacuolização do neurópilo, células Gitter e linfócitos, além de esferoides axonais (BATISTA et al., 2007) e manguitos perivasculares linfoplasmocíticos, principalmente em vasos da meninge (REIS et al., 2019).

### 1.9.3. PCR

A PCR tem sido descrita como uma técnica bastante sensível para a detecção de *T. vivax*, sendo utilizadas algumas sequências de genes que codificam proteases de cisteína (Cathepsina L) e utilizam como primers os oligonucleotídeos Tvi2 (forward: 5' GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA 3') e DTO156 (reverse: 5' TTAGAATTCCCAGGAGTTCTTGATGATCCAGTA 3'), que amplificam 177 pares de base (CORTEZ et al., 2009, SILVA et al., 2013, CADIOLI et al., 2015, REIS et al., 2019).

### 1.10. Tratamento

Para o tratamento eficaz é necessário levar em conta vários parâmetros, como a gravidade da doença, os vetores associados, a severidade da anemia, o estado nutricional do animal e a prescrição de um fármaco apropriado (CHAMOND et al., 2010). Em Minas Gerais o tratamento de escolha foi um tripanocida injetável à base de cloreto de isometamidium (REIS et al., 2019).

Bastos et al. (2020b) avaliaram a eficácia terapêutica de diaceturato de diminazene, dipropionato de imidocarb e cloridrato de isometamidium em bovinos experimentalmente infectados com *T. vivax*. Concluíram que o tratamento à base de diminazene (7mg/kg) ou isometamidium (0,5 e 1,0mg/kg), foram 100% eficazes contra o parasito. Os bovinos que

receberam tratamento com imidocarb (4,8mg/kg) apresentaram recidivas parasitológicas 10 a 14 dias após o tratamento, demonstrando não ser eficaz no tratamento da tripanossomíase. Os mesmos animais foram desafiados novamente 50 dias após o tratamento, sendo que os tratados com isometamidium (1,0mg/kg) não apresentaram reinfecção. Porém reinfecção foi observada com o diminazene, o que ocorreu provavelmente devido ao período residual mais baixo.

### **1.11. Avaliação econômica**

As análises econômicas visam compreender a doença no sistema de produção em que ocorre e quantificar as perdas econômicas relacionadas (RUSHTON, 2009). A avaliação do impacto econômico pode ser relacionada a uma doença específica, como o realizado por Mostert et al. (2017), que avaliaram o prejuízo decorrente da cetose subclínica em rebanhos leiteiros; a viabilidade financeira da adesão a um determinado programa, como o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT), simulado através da análise de custo-benefício (LÔBO, 2008); avaliação do custo-benefício de diferentes tratamentos no rebanho (SALAH et al., 2015), entre outros.

As mortes associadas às várias espécies de *Trypanosoma* (*T. vivax*, *T. congolense* e, em menor escala, a *T. brucei brucei*) na África podem chegar a 3 milhões de mortes anuais, levando a um prejuízo econômico na pecuária de aproximadamente US\$ 1,2 bilhão (CHAMOND et al., 2010), sendo *T. vivax* considerada a espécie mais importante na tripanossomíase em bovinos (BATISTA et al., 2008). Apesar dos diversos relatos da doença no Brasil, é escassa a avaliação do impacto econômico (SEIDL et al., 1999).

## **2. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Infecção por *T. vivax* é descrita em bovinos em vários estados brasileiros, demonstrando sua expansão pelo país e causando perdas econômicas em vários sistemas de produção. O diagnóstico pode ser realizado rapidamente, na maioria dos casos, por esfregaço sanguíneo, podendo ser confirmado em tecidos e sangue, quando necessário, pela técnica da PCR. As perdas econômicas associadas à infecção por *T. vivax* em bovinos são escassas no Brasil, sendo a contribuição deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE NETO, A.Q. et al. Diagnostic, clinical and epidemiological aspects of dairy cows naturally infected by *Trypanosoma vivax* in the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, p. 1-15. 2019.
- BASTOS, T.S.A. et al. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 366-371, 2017.
- BASTOS, T.S.A. et al. Epidemiological and molecular identification of *Trypanosoma vivax* diagnosed in cattle during outbreaks in central Brazil. **Parasitology**, v. 147, n. 12, p. 1313-1319, 2020a.
- BASTOS, T.S.A. et al. Comparison of therapeutic efficacy of different drugs against *Trypanosoma vivax* on experimentally infected cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 181, p. 1-9, 2020b.
- BATISTA, J.S. et al. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semi-arid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 174–181, 2007.
- BATISTA J.S. et al. Risk factors for trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle raised in Rio Grande do Norte state. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-6, 2018.
- BATISTA, J.S. et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 63–69, 2008.
- BEZERRA, F.S.B. et al. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 575-582, 2008.
- BEZERRA, N.M. Vias alternativas de transmissão do *Trypanosoma vivax* em caprinos infectados experimentalmente [Tese]. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2017. 61p. Mossoró.
- CADIOLI, F.A. et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 118-124. 2012.
- CADIOLI, F.A. et al. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during a parasitemic periods. **Veterinary Parasitology**, v. 214, p. 174-177, 2015.
- CARNEIRO, M.E. Protozoários flagelados. In: MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. Cap. 14, p. 131-140.
- CARVALHO, A.U. et al. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 769-771, 2008.

- CHAMOND, N. et al. *Trypanosoma vivax* infections: pushing ahead with mouse models for the study of *Nagana*. I. Parasitological, hematological and pathological parameters. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n.8, p. 792, 2010.
- CORTEZ, A.P. et al. 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.
- COSTA R.V.C. et al. Parasitological and clinical-pathological findings in twelve outbreaks of acute trypanosomiasis in dairy cattle in Rio de Janeiro state, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 22, p.1-9, 2020.
- COUTO, L.F.M. Avaliação *in vitro* e *in vivo* da eficácia de desinfetantes contra *Trypanosoma vivax*. [Dissertação]. Universidade Federal de Goiás. 2019. 60p. Goiânia.
- DESQUESNES, M.; DIA, M.L. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. **Veterinary Parasitology**, v.119, n.1, p. 9-19, 2004.
- FÁVERO, J.F. et al. *Trypanosoma vivax* infection in goat in west of Santa Catarina state, Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, p. 497-499. 2016.
- GALIZA, G. J. N. et al. High mortality and lesions of the central nervous system in Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 359–363, 2011.
- GARDINER, P.R. et al. Characterization of a small variable surface glycoprotein from *Trypanosoma vivax*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, p. 1-11, 1996.
- GARDINER, P.R. et al. Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection in Ayrshire cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 31, p. 187-197, 1989.
- GOMES, H.C.S.F. et al. First detection of *Trypanosoma vivax* in cattle in the state of Bahia, Brazil, based on parasitological and molecular analyses. **Semina Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3, p. 2065-2072, 2021.
- HERRERA, H.M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125 p. 263-275, 2004.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção pecuária municipal. [S.l.]: IBGE, 2017.
- LINHARES, G.F.C. et al. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins: relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, p. 455-460, 2006.
- LÔBO, J.R. Análise custo benefício da certificação de propriedades livres de tuberculose bovina. [Dissertação] Brasília: UnB, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008. 84p.
- MELÉNDEZ, R.D. et al. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. **Journal of Parasitology**, v. 79, p. 293-294, 1993.

- MELO, S.A. et al. Bovine Trypanosomiasis an emerging disease in Maranhão State–Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 7, p. 853-856, 2011.
- MORZARIA, S.P. et al. Transmission of a Trypanosoma sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum*. **Veterinary Parasitology**, v.19, p. 13-21, 1986.
- MOSTERT, P.F. et al. Estimating the economic impact of subclinical ketosis in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model. **Animal**, p.1-10, 2017.
- PAIVA, F. et al. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, Suplemento 1, p. 349, 1997.
- PILLAY, D. et al. *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A candidate antigen for diagnosis of African animal Trypanosomosis in cattle. **PlosOne**, v. 8, n. 10, p. 1-10, 2013.
- REIS, M. O. et al. Epizootic infection by *Trypanosomavivax* in Cattle from the State of Minas Gerais, Brazil. **Korean Journal of Parasitology**, v. 57, n. 2, p.191-195, 2019.
- RIET-CORREA, F. Tripanossomíase em bovinos. In: RIET-CORREA et al. **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3. ed. Santa Maria: Palotti, 2007. p. 696-701.
- RODRIGUES, C.M.F. et al. Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. **Veterinary Parasitology**, v. 191. p. 146-153, 2013.
- RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I., Presencia del género *Trypanosoma* em la garrapata *Boophilus microplus* em el trópico mexicano. **Revista Biomedica**, v.14, n.1, p. 29-33, 2003.
- RUSHTON, J. The economics of animal health and production.: London: CABI Head Office, 2009. 364p.
- SALAH, A.A. ROBERTSON I, MOHAMED A. Estimating the economic impact of *Trypanosoma evansi* infection on production of camel herds in Somali land. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, p. 707–714, 2015.
- SALGADO, B.S. et al. What is your diagnosis? Lymphadenopathy in a cow with severe anemia. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 103-104, 2011.
- SCHMITH, R. et al. *Trypanosoma vivax* epizootic infection in cattle from Espírito Santo State, Brazil. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**., v. 8, n. 6, p. 629-632, 2020.
- SEIDL, A. et al. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 269-272, 1999.
- SHAW, J.J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 66, p. 25-32, 1972.

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. et al. 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. et al. Tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax* no Brasil e Bolívia: sintomas clínicos, diagnósticos e dados epizootiológicos. **Embrapa**, 1997. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37449/1/BP08.pdf>>.

SILVA, R.A.M.S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*– Biologia, diagnóstico e controle. **EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)**, Corumbá, Brasil, 2002. 140 p.

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

SILVA, A.S. et al. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in Southern Brazil. **Parasitology Research**, v.108, p.23-30, 2011.

SILVA, T.M.F. et al. Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. **Veterinary Research**, v. 44, p. 1-9, 2013.

SOULSBY, E.J.L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**.7 ed. London: Baillière Tindall, 1982. 809 p.

VERGNE, T. et al. Attempted transmission of *Trypanosoma evansi* to rats and mice by direct ingestion of contaminated blood and via engorged ticks. **Acta Protozoologica**, v. 50, p. 133-136, 2011.

VIEIRA O.L.E. et al. 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, n.4, p. 16-520, 2017.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

(Formatação de acordo com as normas da revista VETERINARY PARASITOLOGY)

Impacto econômico da tripanossomíase em rebanhos bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil

Matheus de Oliveira Reis<sup>1</sup>, Adriana Silva Albuquerque<sup>1</sup>, Thaís Aurora Gomes<sup>1</sup>, Débora Nunes

Procópio Miranda<sup>1</sup>, Flademir Wouters<sup>1</sup>, Angélica T. Barth Wouters<sup>1</sup>, Djeison Lutier

Raymundo<sup>1</sup>, Elaine Maria Seles Dorneles<sup>1</sup>, Mary Suzan Varaschin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil.

**\*Autor para correspondência**

M.S. Varaschin, Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, UFLA, Caixa Postal 3037; CEP 37200-000; Telefone: (35) 3829-1732; Fax (35) 3829 – 1715; Brasil.

E-mail: [msvaraschin@ufla.br](mailto:msvaraschin@ufla.br)

## Resumo

A tripanossomíase é uma doença causada por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma*, sendo *T. vivax* o agente etiológico mais importante para bovinos. O objetivo deste estudo foi descrever as perdas econômicas associadas à infecção por *Trypanosoma vivax* em fazendas de diferentes regiões de Minas Gerais, visto ser a região de maior produção leiteira do Brasil. Nos anos de 2016 a 2019 foram acompanhadas 46 fazendas com bovinos suspeitos de infecção por *T. vivax*. Nestas foi aplicado um questionário visando quantificar as perdas econômicas da propriedade. Quatorze rebanhos foram positivos para *T. vivax*, com diagnóstico realizado por meio de esfregaços sanguíneos, PCR do sangue e sequenciamento. Foram selecionadas oito propriedades para análise das perdas econômicas, das quais foram avaliados os custos referentes às mortes de vacas e bezerros, queda na produção leiteira, custos com veterinários, custos com tratamentos e perdas com abortos. Os principais sinais clínicos observados foram apatia, anorexia, queda na produção de leite, emagrecimento progressivo e alterações reprodutivas. O prejuízo econômico nestas propriedades variou de R\$ 10.610,00 a 154.130,00. Nestes valores a perda com a produção de leite está demonstrada como valor diário. Se incluído para o período de recuperação da produção, com uma média de 120 dias, este valor varia de R\$ 23.700,00 a 242.600,00. A tripanossomíase pode levar a perdas econômicas significativas na cadeia produtiva leiteira de Minas Gerais. O diagnóstico correto, com tratamento rápido e medidas de controle contribuem para a redução significativa destes custos.

**Palavras-chave:** gado de leite, perdas econômicas, doenças parasitárias, PCR, *Trypanosoma vivax*

### Abstract

Trypanosomiasis is a disease caused by a pathogenic protozoa of the genus *Trypanosoma*, and *T. vivax* is the most important etiologic agent for cattle. The aim of this study was to describe the economic losses associated with *T. vivax* infection in farms from different mesoregions of Minas Gerais, as it is the region with the largest milk production in Brazil. In the 2016-2019 period, 46 farms with cattle suspected of being infected with *T. vivax* were monitored. In these, a questionnaire was applied to quantify the economic losses of the farm. Fourteen herds were positive for *T. vivax*, diagnosed by visualization of trypomastigote forms in blood smears, PCR and DNA sequencing. Eight farms were selected for analysis of economic losses related to the death of cows and calves, drop in milk production, costs with veterinarian assistance, treatments and losses with abortions. The main clinical signs in affected cattle were apathy, anorexia, drop in milk production, weight loss and reproductive failures. The economic losses on these properties ranged from R\$ 10,610.00 to 154,130.00. In these values, the loss with milk production is shown as daily values. If the values were amplified for the production recovery period, with an average of 120 days this value vary from R\$ 23.700,00 to 242.600,00. Trypanosomiasis can lead to significant economic losses in the milk production chain in Minas Gerais. Correct diagnosis of the disease with rapid treatment and control measures contribute to a significant reduction in these costs.

**Key words:** dairy cattle, economic losses, parasitic disease, PCR, *Trypanosoma vivax*

## Introdução

A tripanossomíase é uma doença causada por protozoários do gênero *Trypanosoma*, sendo *T. vivax* o principal agente etiológico em ruminantes (Fetene et al., 2021). Em bovinos, a doença é responsável por grande redução na produção leiteira, emagrecimento, abortamentos, anemia severa e morte de animais (Silva et al., 2013; Reis et al., 2019).

A tripanossomíase tem ampla distribuição e importância econômica em países africanos, associados à ocorrência do vetor biológico, a mosca do gênero *Glossina*, conhecida popularmente por tsé-tsé (Gardiner et al., 1989; Fetene et al., 2021). No continente africano, a infecção por diversas espécies de tripanossomas ocorre em uma área superior a 10 milhões de km<sup>2</sup>, aproximadamente um terço do continente, o que pode colocar em risco mais de 50 milhões de pessoas e pelo menos 50 milhões de cabeças de gado (FAO, 2019). As mortes de bovinos associadas às várias espécies de *Trypanosoma* na África podem chegar a três milhões de mortes/ano, com um prejuízo econômico de aproximadamente US\$ 1,2 bilhões (Chamond et al., 2010). Estima-se que 35 milhões de doses de medicamentos tripanocidas são administradas, enquanto as perdas econômicas diretas e indiretas podem ultrapassar quatro bilhões de dólares por ano (FAO, 2019).

A adaptação à transmissão mecânica, principalmente por tabanídeos e *Stomoxys* sp., permitiu a ocorrência do parasitismo em locais livres do vetor biológico, como na América Central e do Sul (Batista et al., 2008), sendo a infecção natural por *T. vivax* registrada em 39 países da África e da América Latina (Fetene et al., 2021). Apesar dos diversos relatos da doença no Brasil, avaliação do impacto econômico é escassa (Seidl et al., 1999). Em Minas Gerais a tripanossomíase era uma doença restrita e pouco relatada (Carvalho et al., 2008), no entanto, a partir de 2015 houve expansão da doença em diversas regiões do estado, o que gerou morbidade e mortalidade elevadas, com importante redução na produção leiteira (Reis

et al., 2019). Considerando que o estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil, com produção de 8.746.559 litros em 2017 (IBGE, 2017), o impacto da doença na economia é considerável. Sendo assim, o objetivo deste estudo é quantificar as perdas econômicas associadas à tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais.

## **Material e métodos**

### **Seleção de propriedades**

No período de 2016 a 2019 foram visitadas 46 propriedades leiteiras com suspeita de tripanossomíase, com aplicação de um questionário relacionado às perdas econômicas aos veterinários e/ou proprietários. Dessas propriedades, 14 rebanhos foram confirmados com infecção por *T. vivax*, sendo selecionadas oito propriedades com maior número de dados e informações para a análise sobre perdas econômicas. As propriedades pertenciam aos municípios de Andradas, Bom Jesus da Penha, Bom Sucesso, Carmo da Mata, Lavras, Maria da Fé, Monsenhor Paulo e Passos, que são regiões situadas no sul, sudoeste e oeste do estado de Minas Gerais. Todas as propriedades tinham como atividade econômica principal a produção leiteira, com criação de vacas predominantemente das raças holandesa e girolando.

### **Diagnóstico da doença**

Para o diagnóstico da tripanossomíase, foi coletado sangue da veia caudal mediana, jugular ou epigástrica cranial superficial para a confecção de esfregaços sanguíneos e sangue em EDTA para a caracterização molecular.

A extração do DNA celular foi realizada pela técnica de lise por proteinase K (Wizard SV Genomic Purification System, Promega, Madison, 59 USA). As concentrações (ng/μL) e a qualidade do DNA extraído foram determinadas em espectrofotômetro NanoVue™ Plus e eletroforese em gel de agarose a 1%. Amostras de sangue de animais livres de *T. vivax* foram usadas como controle negativo, e água ultra-pura Milli-Q como controle branco. O controle

positivo foi obtido de amostras de vacas com alta carga parasitária nos esfregaços sanguíneos e comprovadas pelo sequenciamento. Foram utilizados como primers os oligonucleotídeos Tvi2 (forward: 5' GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA 3') e DTO156 (reverse: 5' TTAGAATTCCCAGGAGTTCTTGATGATCCAGTA 3'), que amplifica 177 pares de base (pb), como descrito por Cortez et al. (2009). A PCR foi realizada utilizando GoTaq® Flexi DNA Polymerase e um set de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega, Madison, USA). O volume final de cada reação foi ajustado para 20 µL com água ultrapura Milli-Q®. As condições definidas para a PCR em cada reação foram: 1 x Tampão da Taq-polymerase (GoTaq DNA Polymerase-Promega), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada dNTP, 2,5U Taq DNA Polymerase, 100p molde de cada iniciador e 100ng da amostra de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação a 94°C por 5 min; 35 ciclos a 94°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min. O produto da PCR foi separado utilizando um gel de agarose a 2% de alta resolução misturado com Gel Red™ IX em cuba de eletroforese horizontal contendo TBE (Tris-borato 0.09M e EDTA 0.002M) em voltagem de 100 V. O tamanho da banda de amplificação foi identificada com um marcador de peso molecular padrão (Ladder, Sigma® 50pb 500µl).

O sequenciamento foi realizado pelo método enzimático descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977), por meio do equipamento ABI 3730, com capilar de 50 cm.

### **Análise das perdas econômicas**

Para análise dos custos relacionados à doença foram considerados valores econômicos referentes às mortes de vacas e de bezerros, queda da produção leiteira, gastos com atendimentos veterinários, custos com tratamento da doença mais tratamento suporte, e perdas por abortamentos.

As perdas relacionadas às mortes dos animais (CM) foram calculadas pelas mortes das vacas (mv), considerando o número de vacas mortas (nv) e o preço estimado da vaca leiteira na época do diagnóstico mais a morte dos bezerros (mb), através do número de bezerros mortos (nb) e o preço estimado do bezerro na época do diagnóstico. Estes valores foram obtidos através da pesquisa em sindicato rural, empresa de desenvolvimento relacionado ao agronegócio e baseados nas informações publicadas por Nicolino2015), já que não há bases de valores para vacas leiteiras como há para o preço da arroba em gado de corte. O valor médio foi obtido com a seguinte fórmula:

$$CM = \frac{\sum_{i=f1}^{fn} [mv (nv \times pv) + mb(nb \times pb)]}{n}$$

Os custos com a redução da produção de leite/dia (CL<sub>d</sub>) foram obtidos através dos valores da produção de leite (plt), queda na produção de leite (ql) e preço do leite no momento do diagnóstico (pl). O preço do leite foi obtido pela tabela publicada em <https://cepea.esalq.usp.br/br>. A média dos custos referentes a produção leiteira foi obtida com a seguinte fórmula, sendo (n) o número total de fazendas:

$$CLd = \frac{\sum_{i=f1}^{fn} (plt \times ql \times pl)}{n}$$

Os gastos com atendimento veterinário (CV) foram obtidos pelos valores do custo do tratamento da tripanossomíase (Tt), custo com tratamento suporte (Ts) e valores pagos ao veterinário (Vvet). Esses valores foram obtidos através dos questionários respondidos pelos veterinários/proprietários. O valor médio foi obtido com a fórmula seguinte:

$$CV = \frac{\sum_{i=f1}^{fn} (Tt + Ts + Vvet)}{n}$$

Para estimar o preço da fêmea abortada, foi considerado o valor de mercado da bezerra desmamada de até 12 meses, valor *i* obtido da mesma forma como descrito para o cálculo do preço da vaca leiteira. Devido à probabilidade genética de 50% de o aborto ser fêmea e 50% de ser macho, considerou-se metade do valor nos cálculos para evitar superestimação, já que os bezerros machos de rebanhos leiteiros não possuem bom valor comercial (Nicolino 2015). Para os cálculos foi utilizado o número total de abortos (*na*) e 50% do seu valor de mercado (*bl*), sendo a média das fazendas obtidas com a seguinte fórmula:

$$CA = \frac{\sum_{i=f1}^{fn} (bl \times na)}{n}$$

## Resultados

Os sinais clínicos predominantes nos animais infectados rebanhos foram apatia, anorexia, emagrecimento (Figura 1), edema submandibular (Figura 2), mucosas pálidas, queda na produção de leite e abortamentos. Nos esfregaços sanguíneos foram visualizadas formas tripomastigotas de *T. vivax*, que eram achatados, com forma de foice, núcleo grande e central, cinetoplasto grande, extremidade posterior arredondada e um flagelo livre (Figura 3). As amostras sequenciadas apresentaram até 100% de homologia com *T. vivax*.

Os resultados dos custos individuais de cada propriedade avaliada, assim como os custos totais, estão apresentados na Tabela 1. O prejuízo econômico nestas propriedades variou de R\$ 10.610,00 a 154.130,00. Porém, nestes valores a perda com a produção de leite está demonstrada como valor diário. Considerando o período médio de recuperação da

produção de leite, o valor pode ser multiplicado por 120 dias, variando então de R\$ 23.700,00 a 242.600,00.

Os valores médios das análises realizadas foram os seguintes: custos referentes à queda na produção de leite por dia R\$ 360,58; custos com atendimento veterinário R\$ 6.187,50; custos com morte de animais R\$ 43.854,38 e custos com abortos R\$ 1.141,88.

### **Discussão e conclusão**

O diagnóstico da infecção por *T. vivax* foi baseado nos sinais clínicos associados ao achado do parasito nos esfregaços sanguíneos, positividade na PCR e sequenciamento genético de algumas amostras; enquanto a determinação das perdas econômicas foi obtida através dos dados obtidos na aplicação de questionário.

Houve diferenças importantes nas perdas econômicas avaliadas, como a mortalidade, que variou de ausente a 50 animais/propriedade, com prejuízo de até 150.000,00 reais. Essa variação ocorreu principalmente devido ao atraso no diagnóstico, já que a ocorrência da doença em Minas Gerais até 2015 era infrequente (Carvalho et al., 2008) e desconhecida por muitos veterinários. Com isso foram feitos controle e profilaxia inadequados, além de tratamentos inespecíficos para as doenças mais comuns, que têm sinais clínicos semelhantes, como a tristeza parasitária bovina. Portanto, o desconhecimento, a falta de diagnóstico e a evolução rápida da doença resultaram em grande mortalidade (Reis et al., 2019). Em contrapartida, à medida que a doença se expandia pelo estado, veterinários de campo e proprietários, sabendo da sua ocorrência e seus prejuízos, buscavam por diagnóstico laboratorial, resultando em tratamento eficaz, manejo adequado e redução da mortalidade.

Os prejuízos com a queda abrupta da produção leiteira foram calculados por dia. Porém, em contatos posteriores com responsáveis pelas fazendas, foi relatado um período de quatro a oito meses para normalização da produção, ou que não normalizou mais. A produção

leiteira sofre interferência direta da doença, já que sua redução é abrupta e significativa (Batista et al., 2008; Reis et al., 2019), porém deve ser considerado o impacto posterior em decorrência da infertilidade e do maior intervalo de partos (Batista et al., 2008), além da não reposição das vacas que morreram, principalmente animais com alto padrão genético para aptidão leiteira.

O custo total com tratamentos variou de 3.000 reais a 10.000 reais, sendo que algumas propriedades com menor número de bovinos tiveram gasto maior do que outras com maior número. A variação foi devido à quantidade total de cabeças do rebanho, quantos animais foram tratados e quantas doses de medicamento foram realizadas. Nas fazendas positivas foi recomendado o tratamento de todo o rebanho, independente do diagnóstico individual, já que os bovinos podem ter doença subclínica e por isso serem fonte de infecção do rebanho, visto que o parasito é facilmente transmitido, inclusive por moscas (Batista et al., 2008). Foram recomendadas duas doses de cloridrato de isometamidium em dose e intervalos de aplicação indicadas na bula, com elevada eficácia no tratamento da doença (Bastos et al., 2020). Porém, em algumas propriedades foi feita dose única e em outras foram medicadas somente alguns animais, com base nos sinais clínicos.

As perdas associadas aos abortos variaram de ausentes a 3.480,00 reais. Alterações reprodutivas são frequentes e responsáveis por causar abortamentos, partos prematuros e repetição de cio (Reis et al., 2019). Diversos estudos foram conduzidos para demonstrar a passagem transplacentária do agente, como PCR e histopatologia de amostras fetais e placenta (Silva et al., 2013), análise de órgãos reprodutivos das fêmeas (Rodrigues et al., 2013) e de machos infectados (Bezerra et al., 2008). Considerou-se que os prejuízos relacionados a alterações reprodutivas podem ser ainda maiores, já que, dependendo da fase gestacional e do controle reprodutivo da fazenda, o abortamento pode passar despercebido. Além disso, a

mortalidade de vacas prenhas determina a morte de seus fetos, aumentando ainda mais os prejuízos relacionados à morte de vaca prena, que tem melhor valor de mercado.

Neste estudo, um dos produtores abandonou a atividade leiteira em decorrência dos desafios da produção, refletindo um impacto importante na agropecuária e que deve ser considerado. Além dos impactos econômicos evidenciados neste artigo, outras despesas também podem ser consideradas nos custos relacionados à doença, como gastos relacionados ao controle de moscas e impacto futuro na reposição do rebanho em decorrência dos abortamentos, morte embrionária e morte de bezerras. Sendo assim, mais estudos devem ser realizados para determinação mais ampla dos impactos diretos e indiretos da tripanossomíase nos rebanhos brasileiros.

### **Conclusão**

A tripanossomíase causa perdas econômicas significativas na cadeia produtiva de leite de Minas Gerais. O diagnóstico correto com tratamento rápido e medidas de controle contribuem para a redução significativa destes custos.

**Agradecimentos** – Os autores agradecem a todos os médicos veterinários e produtores rurais que contribuíram para este estudo, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

**Declaração de conflito de interesse** – Os autores declaram que não há conflito de interesses com respeito ao artigo, autores e publicação.

## Referências

Bastos, T.S.A., Faria, A.M., Cavalcante, A.S.A., Madrid, D.M.C., Zapa, D.M.B., Nicaretta, J.E., Cruvinel, L.B. Heller, L.M., Couto, L.F.M., Soares, V.E., Cadioli, F.A., Lopes, D.Z., 2020. Comparison of therapeutic efficacy of different drugs against *Trypanosoma vivax* on experimentally infected cattle. *Prev. Vet. Med.* 181, 1-9.

Batista, J.S., Bezerra, F.S.B., Lira, R.A., Carvalho, J.R.G., Rosado Neto, A.M., Petri, A.A., Teixeira, M.M.G., 2008. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 28(1), 63–69.

Bezerra, F.S.B., García H.A., Alves H.M., Oliveira I.R.S., Silva A.E., Teixeira M.M.G., Batista, J.S., 2008. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. *Pesq. Vet. Bras.* 28(12), 575-582.

Carvalho, A.U., Abrão, D.C., Facury Filho, E.J., Paes, P.R.O., Ribeiro, M.F.B., 2008. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med.Vet. Zoot.* 60, 769–771.

Chamond, N., Cosson, A., Blom-Potar, M.C., Jouvion, G., D'Archivio, S., Medina, M., Droin-Bergère, S., Huerre, M., Goyard, S., Minoprio, P., 2010. *Trypanosoma vivax* infections: pushing ahead with mouse models for the study of *Nagana*. I. Parasitological, hematological and pathological parameters. *Plos.Negl. Trop. Dis.* 4(8), e792.

Fetene, E., Leta, S., Regassa, F., Büscher, P., 2021. Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*.14 (80), 1-20.

FAO - Food and Agriculture Organization Of The United Nations. Controlling tsetse and trypanosomosis to protect african livestock keepers, public health and farmers' livelihoods. 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/3/ca3887en/CA3887EN.pdf>

Gardiner, P.R. Assoku, R.K., Whitelaw, D.D., Murray, M.,1989. Haemorrhagic lesions resulting from *Trypanosoma vivax* infection In Ayrshire cattle. *Vet.Parasitol.* 31, 187–197.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção pecuária municipal. [S.l.]: IBGE, 2017.

Nicolino, R.R. 2015. Estimativa de custos associados à infecção por *Neospora caninum* em propriedades de exploração leiteira no Brasil.[Tese]. Universidade Federal de Minas Gerais. 98 pp.

Reis, M.O., Souza, F.R., Albuquerque, A.S., Monteiro, F., Oliveira, L.F.S., Raymundo, D.L., Wouters, F., Wouters, A.T.B., Peconick, A.P., Varaschin, M.S. 2019. Epizootic Infection by *Trypanosoma vivax* in Cattle from the State of Minas Gerais, Brazil. *Korean J. Parasitol.*, 57 (2), 191-195.

Rodrigues, C.M.F., Olinda, R.G., Silva, T.M.F., Vale, R.G., Silva, A.E., Lima, G.L., Garcia, H.A., Teixeira, M.M., Batista, J.S. 2013. Follicular degeneration in the ovaries of goats

experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. Vet. Parasitol. 191, 146–153.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 74(12), 5463-5467.

Seidl, A., Dávila A.M.R., Silva R.A.M.S. 1999. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(2), 269-272.

Silva, T.M.F., Olinda, R.G., Rodrigues, C.M.F., Câmara, A.C.L., Lopes, F.C., Coelho, A.C., Ribeiro, M.F.B., Freitas, C.I.A., Teixeira, M.M.G., Batista, J.S. 2013. Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. Vet. Res. 44, 1–9.

Soulsby, E.J.L., 1982. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7 ed. Baillière Tindall, London, pp. 809.

Tabela 1- Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais.

Propriedade	Rebanho Total	Morte vacas (mv)	Morte bezerros (mb)	Prejuízo (mv+mb)	Produção leiteira*	Queda da produção leiteira	Perdas da produção leiteira**	Custo com veterinário	Custo com tratamento***	Abortos	Custos por abortos	Perdas Totais
A	81	16	11	R\$ 52.785,00	650	450	R\$ 742,50	R\$2.500,00	R\$ 4.000,00	8	R\$ 3.480,00	R\$ 63.507,50
B	115	20	0	R\$ 60.000,00	600	300	R\$ 381,00	R\$1.000,00	R\$ 3.000,00	5	R\$ 2.175,00	R\$ 66.556,00
C	80	50	0	R\$ 150.000,00	1.800	450	R\$ 630,00	R\$ 500,00	R\$ 3.000,00	0	R\$ -	R\$ 154.130,00
D	200	18	30	R\$ 67.050,00	800	200	R\$ 232,00	R\$ 500,00	R\$ 6.000,00	5	R\$ 2.175,00	R\$ 75.957,00
E	71	0	0	-	700	250	R\$ 287,50	R\$ 500,00	R\$ 7.000,00	0	R\$ -	R\$ 7.787,50
F	30	5	0	R\$ 15.000,00	230	130	R\$ 171,60	R\$ 1.000,00	R\$ 3.000,00	2	R\$ 870,00	R\$ 20.041,60
G	124	1	0	R\$ 3.000,00	1.200	250	R\$ 330,00	R\$ -	R\$ 10.000,00	1	R\$ 435,00	R\$ 13.765,00
H	350	1	0	R\$ 3.000,00	2.500	100	R\$ 110,00	R\$ -	R\$ 7.500,00	0	R\$ -	R\$ 10.610,00

\*Antes da ocorrência da infecção;\*\* Valores diários;\*\*\* Tratamento específico visando a cura da doença e tratamento suporte

**Figura 1-** Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. Vaca com emagrecimento.



**Figura 2-** Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. Vaca com edema submandibular.



**Figura 3-** Tripanossomíase em bovinos de Minas Gerais. *Trypanosoma vivax* na forma tripomastigota em esfregaço sanguíneo. Panótico Rápido. 100x.



**Anexo 1 – Questionário referente às perdas econômicas associadas à tripanossomíase****Proprietário:****Propriedade:****Endereço:****Telefone:**

- 1) Produção diária de leite .Queda na produção leiteira dos animais;
- 2) Gastos com veterinários;
- 3) Gastos com remédios visando a melhora do quadro clínico;
- 4) Gastos com o tratamento da doença (tripanossomíase);
- 5) Perdas associadas a abortos e natimortos;
- 6) Número de morte e/ou descarte de animais;
- 7) Custo com reposição de animais;
- 8) Gastos com alimentação;
- 9) Venda de bezerras;
- 10) Outros gastos.

**Trabalho 2-** Introdução ao artigo

A tripanossomíase em bovinos apresenta sinais clínicos diversos e variados, sendo que, com o aumento do número de casos no estado, o diagnóstico diferencial de várias doenças com sinais clínicos semelhantes foi de extrema importância. Casos individuais ou surtos nas propriedades foram acompanhados e diagnosticados, como parte do trabalho de extensão realizado pelo Setor de Patologia Veterinária da UFLA e para execução deste trabalho. Foram dignosticados casos de tristeza parasitária bovina, febre catarral maligna, raiva, tuberculose, salmonelose, dentre outros. Um caso de infecção neurológica por *Sarcocystis hirsuta* foi diagnosticado em uma vaca, de uma fazenda com suspeita infecção por *Trypanosoma vivax*. Este será relatado na forma de artigo.

**Meningoencefalite necrotizante fatal por *Sarcocystis hirsuta* em bovino**

Matheus de Olivera Reis, Fernanda Rezende Souza, Thaís Aurora Gomes, Carine Rodrigues Pereira, Adriana Silva Albuquerque, Ivam Moreira de Oliveira Junior, Elaine Maria Seles Dorneles, Flademir Wouters, Angélica Terezinha Barth Wouters, Djeison Lutier Raymundo, Mary Suzan Varaschin<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brazil.

**\*Autor para correspondência**

M.S. Varaschin, Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, UFLA, Caixa Postal 3037; CEP 37200-000; Telefone: (35) 3829-1732; Fax (35) 3829 – 1715; Brasil. E-mail: msvaraschin@ufla.br

## Resumo

Descreve-se, pela primeira vez, a infecção por *Sarcocystis hirsuta* associada a meningoencefalite necrosante não supurativa fatal em um bovino. A avaliação microscópica revelou infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e células gitter em região perivascular e no neurópilo de cerebelo, tálamo e hipocampo, assim como extensas áreas de necrose em substância branca e cinzenta associadas a numerosos protozoários morfológicamente compatíveis com *Sarcocystis* sp. Foram visualizados esquizontes em células endoteliais e livres no neurópilo, contendo no seu interior merozoítos elípticos e basofílicos, que muitas vezes se dispunham em forma de rosetas, bem como merozoítos livres e no citoplasma de neurônios. O diagnóstico de infecção por *S. hirsuta* foi realizado a partir do material genético sequenciado, utilizando a técnica de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição de PCR, clivado pelas enzimas *BclI* e *RsaI*.

**Palavras-chave:** encefalite por protozoário, enzimas de restrição, ruminantes, sarcocistose.

## Introdução

Cistos de *Sarcocystis* spp. são frequentemente observados na avaliação histopatológica da musculatura cardíaca e esquelética de bovinos (Carrigan, 1986). Apesar da alta frequência da infecção, manifestações clínicas e lesões e associadas à sarcocistose são raras (Nourani et al., 2010). Em bovinos é descrita, principalmente, infecção por *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis*, espécies que têm como hospedeiros definitivos canídeos domésticos e selvagens, gatos domésticos e humanos, respectivamente. *S. cruzi* é considerado a espécie mais patogênica, capaz de causar sarcocistose clínica, com lesões significativas em bovinos (Cooper & Valentine, 2016). Doença neurológica por *Sarcocystis* foi descrita em bovinos somente na África do Sul (Van der Lugt et al., 1994), Canadá (Dubey et al., 1987), Inglaterra

(Gunning et al., 2000) e Alemanha (Takla, 1984), porém a espécie de *Sarcocystis* não foi determinada.

O ciclo biológico de *Sarcocystis* spp. envolve dois hospedeiros e a infecção ocorre quando hospedeiros intermediários (H.I.) herbívoros e onívoros, ingerem alimentos contaminados por esporocistos eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos (HD). Já os HD se infectam por meio da ingestão de formas maduras de *Sarcocystis* spp. encistadas em tecidos de um HI (Savini et al., 1994).

O polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de PCR (PCR-RFLP) com base em regiões variáveis das sequências de subunidades de RNA é considerado um teste molecular preciso para a identificação de *Sarcocystis* sp. (Heckeroth and Tenter, 1999; Yang et al., 2002, Motamedi et al., 2011).

Este artigo descreve, pela primeira vez, a infecção por *S. hirsuta* associada a meningoencefalite necrotizante não supurativa fatal em um bovino, diagnosticada por achados patológicos e ensaios moleculares.

## **Material e métodos**

Um bovino, adulto, fêmea, foi necropsiado em uma propriedade localizada no município de Candeias, Minas Gerais, região de ocorrência de *Trypanosoma vivax* e raiva em bovinos. Dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos com o proprietário. Fragmentos de órgãos e tecidos foram coletados e fixados em formalina 10% tamponada, processados rotineiramente para histopatologia, incluídos em parafina, cortados a 3 µm e corados com hematoxilina e eosina (HE). Foi também realizado o exame microscópico de esfregaços sanguíneos para pesquisa de *Trypanosoma* sp. Amostras de encéfalo, rim, fígado, baço, coração e pulmão foram congeladas e submetidas à extração de DNA com o kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit-Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. A

concentração (ng/ $\mu$ L) e a qualidade do DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose a 1% e pelo NanoVue™ Plus (GE Healthcare, EUA). Todos esses tecidos foram avaliados para a presença de DNA de *Trypanosoma vivax*, utilizando a técnica de PCR descrita por Reis et al. (2019). Como controle positivo foram utilizadas amostras de encéfalo e sangue de bovinos sabidamente positivos para *T. vivax* (Reis et al., 2019).

Amostras do encéfalo também foram submetidas a PCR para detecção de *Sarcocystis* sp. por meio da amplificação parcial do gene *18S rRNA*. Neste ensaio foram utilizados os iniciadores Sarco F- CGCAAATTACCCAATCCTGA e Sarco R- ATTTCTCATAAGGTGCAGGAG, conforme descrito por Alves et al. (2018). Como controle positivo foi utilizado material genético extraído do miocárdio de um bovino que tinha múltiplas estruturas de *Sarcocystis* sp. no exame histopatológico. Todos os reagentes da PCR sem o DNA molde foram usados rotineiramente em todos os ensaios, como controle negativo.

A PCR para o gene *18S rRNA* de *Sarcocystis* spp. foi seguida do sequenciamento pelo método enzimático descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977), utilizando o equipamento ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA), com capilar de 50 cm. A partir do material genético sequenciado foram utilizadas as enzimas de restrição *Bcl I* e *Rsa I* para diferenciação das espécies *S. cruzi* e *S. hirsuta*, utilizando a técnica de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP) (Alves et al., 2018).

Adicionalmente, fragmentos de encéfalo foram submetidos ao exame de imunohistoquímica (IHQ) para pesquisa de antígenos rábicos (Abreu et al., 2014), de *Toxoplasma gondii* e de *Neospora caninum* (Mesquita et al., 2013).

## **Resultados**

O proprietário relatou manifestações de queda na produção de leite, emagrecimento progressivo e apatia. Como a vaca foi encontrada morta, não foi possível uma avaliação clínica mais detalhada.

No exame macroscópico foram observados somente mucosas externamente visíveis pálidas e mau estado corporal. A avaliação microscópica revelou meningoencefalite necrotizante não supurativa multifocal a coalescente acentuada em cerebelo, tálamo e, principalmente, em hipocampo, caracterizada por infiltrado inflamatório composto predominantemente por linfócitos, plasmócitos e células gitter em região perivascular e no neurópilo (Figura 1). Havia extensas áreas de necrose em substância branca e cinzenta. Próximo às áreas de necrose foram observados numerosos protozoários morfológicamente compatíveis com *Sarcocystis* sp. (Figura 2), caracterizados por esquizontes arredondados com merozoítos elípticos e basofílicos no seu interior, que muitas vezes se dispunham em forma de rosetas ao redor de um corpo residual central (Figuras 3 e 4). Os esquizontes foram visualizados nas células endoteliais e livres no neurópilo. Merozoítos livres e no citoplasma de neurônio também foram observados. Não foram observadas lesões e/ou parasitos nos demais órgãos.

Apesar da morfologia do parasito ser compatível com *Sarcocystis* sp., devido ao grande número de casos de tripanossomíase na região, associado ao histórico de queda de produção de leite e emagrecimento progressivo, esfregaços sanguíneos e PCR para detecção de *Trypanosoma* sp. foram realizados, porém resultaram negativos. Os exames de IHQ para raiva, *N. caninum* e *T. gondii* também resultaram negativos.

A PCR para detecção de *Sarcocystis* sp. resultou positiva e o resultado foi confirmado pelo sequenciamento. A sequência de DNA do bovino controle foi clivado apenas pela enzima *RsaI*, mostrando um perfil compatível com DNA de *S. cruzi*, enquanto a amostra de

DNA obtida do bovino com encefalite foi clivada pelas enzimas *BclII* e *RsaI*, caracterizando infecção por *S. hirsuta*.

### **Discussão e conclusão**

*Sarcocystis* spp. geralmente não são patogênicos para os HD e HI.. Não foram observadas alterações clínicas neste caso, uma vez que o bovino foi encontrado morto, porém o emagrecimento progressivo e as mucosas pálidas podem ser decorrentes de dificuldade de alimentação devido ao quadro de meningoencefalite parasitária grave. São relatadas convulsões, ataxia, cegueira, nistagmo, opistótono e decúbito em casos de doença neurológica por *Sarcocystis* em bovinos (Dubey et al., 1987; Van der Lugt et al., 1994; Gunning et al., 2000). Também não foram observadas alterações macroscópicas nos tecidos avaliados, incluindo o encéfalo, mas é relatado que as lesões nos bovinos são predominantemente histológicas (Van der Lugt et al., 1994). Na fase aguda da doença por *S. cruzi* em bovinos podem ocorrer hemorragias nas serosas das vísceras, nos músculos cardíaco e esquelético e na esclera e, na fase crônica, miosite não supurativa e destruição das estruturas de *Sarcocystis* sp. (Dubey & Lindsay, 2006).

Os raros casos descritos de meningoencefalite sarcoporida em bovinos foram associados somente a infecções por *S. cruzi*-like (Dubey et al., 2016), não havendo até então associação com *S. hirsuta*. O diagnóstico de meningoencefalite necrotizante por *S. hirsuta* em uma vaca foi baseado nas lesões microscópicas, morfologia do parasito, associadas à positividade em PCR, sequenciamento e utilização de enzimas de restrição para determinar a espécie de *Sarcocystis* envolvida. Outras formas de diagnóstico envolvem microscopia eletrônica, características histológicas do parasito e imuno-histoquímica, consideradas um auxílio na identificação do parasito na lesão (Nourani et al., 2010; Dubey et al., 2016). A técnica utilizada foi baseada em RFLP, com amplificação do gene *18S rRNA*, que tem se

mostrado eficaz na diferenciação de espécies morfológicamente semelhantes de *Sarcocystis* spp. (Yang et al., 2002).

Os achados microscópicos principais foram meningoencefalite com necrose em substância branca e cinzenta. Outros trabalhos descrevem meningoencefalite, vasculite e gliose como as principais lesões observadas (Dubey et al., 1987; Dubey et al., 2016; Gunning et al., 2000). Em casos de infecção natural e experimental por *S. cruzi*, a necrose não foi uma lesão predominante (Dubey et al., 2016), porém sarcocistose com lesões encefálicas associadas a necrose já foram descritas (Carrigan 1986; Van der Lugt et al., 1994).

Foram consideradas no diagnóstico diferencial doenças que cursam com meningoencefalite e que são importantes para a região estudada, como a raiva bovina. No bovino necropsiado não foram visualizados corpúsculo de Negri em neurônios e a marcação IHQ (Abreu et al., 2014) foi negativa para o vírus da raiva. Outra doença considerada foi a tripanossomíase bovina, uma vez que o estado de Minas Gerais enfrentou uma epizootia por *Trypanosoma vivax* em bovinos, e os principais sinais clínicos observados foram queda na produção de leite, anemia e emagrecimento progressivo (Reis et al., 2019), semelhante às manifestações clínicas do bovino deste relato, porém os exames citológico e molecular resultaram negativos para *T. vivax*.

Humanos podem servir com definitivos para *S. hominis* e *S. suis* e como intermediário acidental para várias espécies não identificadas de *Sarcocystis* (Dubey & Lindsay, 2006), porém não há evidências da infecção por *S. hirsuta* em humanos. Apesar disso, medidas preventivas, como evitar o contato de gatos com pastagens e alimentos destinados a bovinos, devem ser adotadas na propriedade acometida, com o objetivo de evitar o aparecimento de novos casos no rebanho.

Os achados deste artigo demonstram, pela primeira vez, meningoencefalite necrosante relacionada à infecção por *S. hirsuta* em bovino. Essa infecção deve ser considerada no diagnóstico diferencial para animais com manifestações clínicas neurológicas.

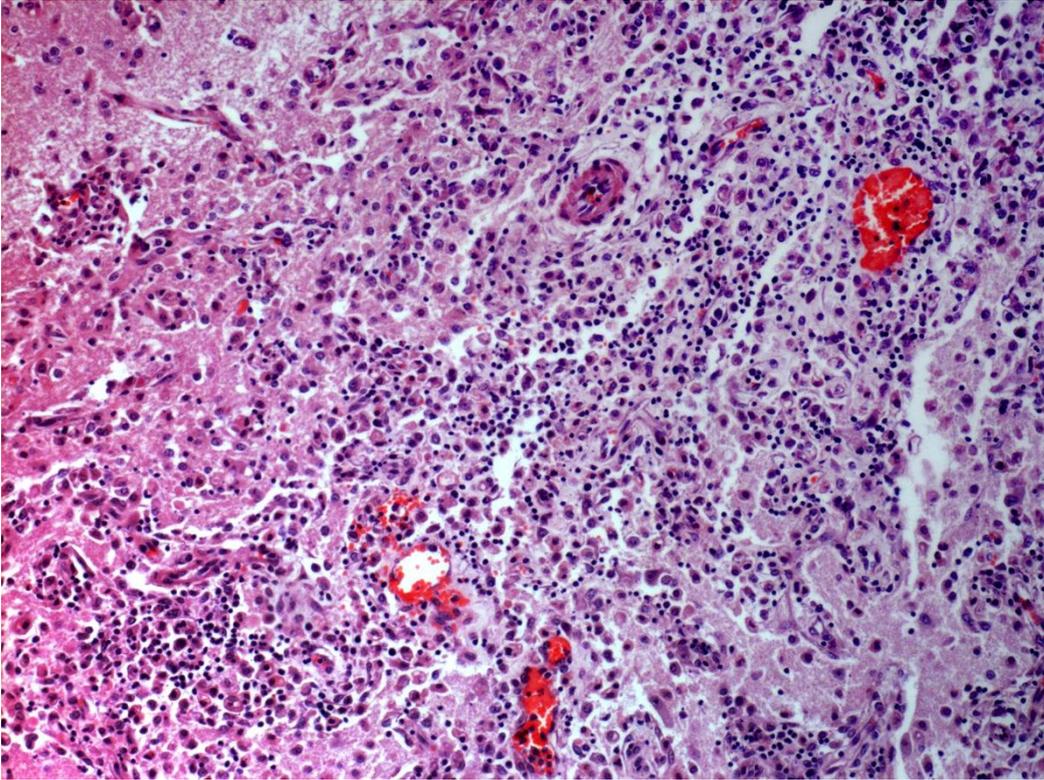
**Declaração de conflito de interesse** – Os autores declaram que não há conflito de interesses com respeito ao artigo, autores e publicação.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

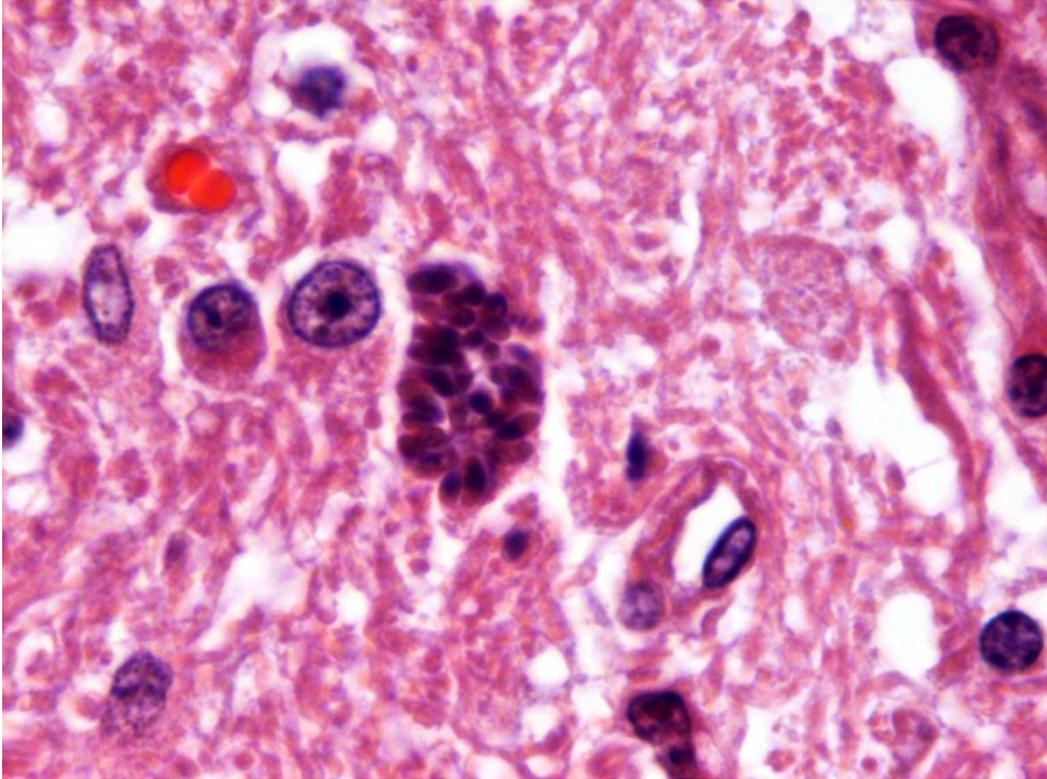
- 1- Abreu, C.C., Nakayama, P.A., Nogueira, C.I., Mesquita, L.P., Lopes, P.F.R., Wouters, F., Varaschin, M.S., Bezerra Jr., P.S., 2014. Histopathology and immunohistochemistry of tissues outside central nervous system in bovine rabies. *J. Neurovirol.* 20, 388-397.
- 2- Alves, M.E.M., Cadore, G.C., Oliveira, C.S., Portella, L.P. Sangioni, L.A., Vogel, F.S.F., 2018. Caracterização molecular de *Sarcocystis* spp. em amostras de carne. *Pesq. Vet. Bras.* 38, 425-429.
- 3- Carrigan, M. J., 1986. An outbreak of sarcocystosis in dairy cattle. *Aust. Vet. J.* 63, 22-24.
- 4- Cooper, B.J., Valentine, B.A., 2016. Muscle and Tendon. In Maxie MG. ed. Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 6th ed. St. Louis, USA. Saunders Elsevier, pp 165- 248.
- 5- Dubey, J.P., Perry, A., Kennedy, M.J., 1987. Encephalitis caused by a Sarcocystis-likeorganism in a steer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191, 231–232.
- 6- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2006. Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. *Vet Clin. Food Anim.* 22, 645–671.
- 7- Dubey, J.P., Calero-Bernal, R., Verma, S.K., Mowery, J.D., 2016. Pathology, immunohistochemistry, and ultrastructural findings associated with neurological sarcocystosis in cattle. *Vet. Parasitol.* 223, 147–152.

8. Gunning, R.F., Jones, J.R., Jeffrey, M., Higgins, R.J., Williamson, A.G., 2000. Sarcocystis encephalomyelitis in cattle. *Vet. Rec.* 146, 328.
9. Heckerroth, A.R., Tenter, A.M., 1999. Comparison of immunological and molecular methods for the diagnosis of infections with pathogenic Sarcocystis species in sheep. *Tokai. J. Exp. Clin. Med.* 23, 293–302.
10. Mesquita, L.P., Nogueira, C.I., Costa, R.C., Orlando, D.R., Bruhn, F.R., Lopes, P.F., Nakagaki, K.Y., Peconick, A.P., Seixas, J.N., Bezerra Jr., P.S., Raymundo, D.L., Varaschin, M.S., 2013. Antibody kinetics in goats and caprines naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 196 (3-4), 327-333.
11. Motamedi, G.R., Dalimi, A., Nouri, A., Aghaeipour, K., 2011. Ultrastructural and molecular characterization of Sarcocystis isolated from camel (*Camelus dromedarius*) in Iran. *Parasitol. Res.* 108, 949–954.
12. Nourani, H., Matin, S., Nouri, A., Azizi, H., 2010. Prevalence of thin-walled Sarcocystis cruzi and thick-walled Sarcocystis hirsuta or Sarcocystis hominis from cattle in Iran. *Trop. Anim. Health. Prod.* 42, 1225–1227.
13. Reis, M.O., Souza F.R., Albuquerque, A.S., Monteiro, F., Oliveira, L.F.S., Raymundo, D.L., Wouters, F., Wouters, A.T.B., Peconick, A.P., Varaschin, M.S., 2019. Epizootic Infection by *Trypanosoma vivax* in Cattle from the State of Minas Gerais, Brazil. *Korean J Parasitol.* 57, 191-195.
14. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74 (12), 5463-7.
15. Van Der Lugt, J.J., Markus, M.B., Kitching, J.P., Daly, T.J.M., 1994. Necrotic encephalitis as a manifestation of acute sarcocystosis in cattle. *Tydskr. S. Afr. Vet Ver.* 65 (3), 119-121.

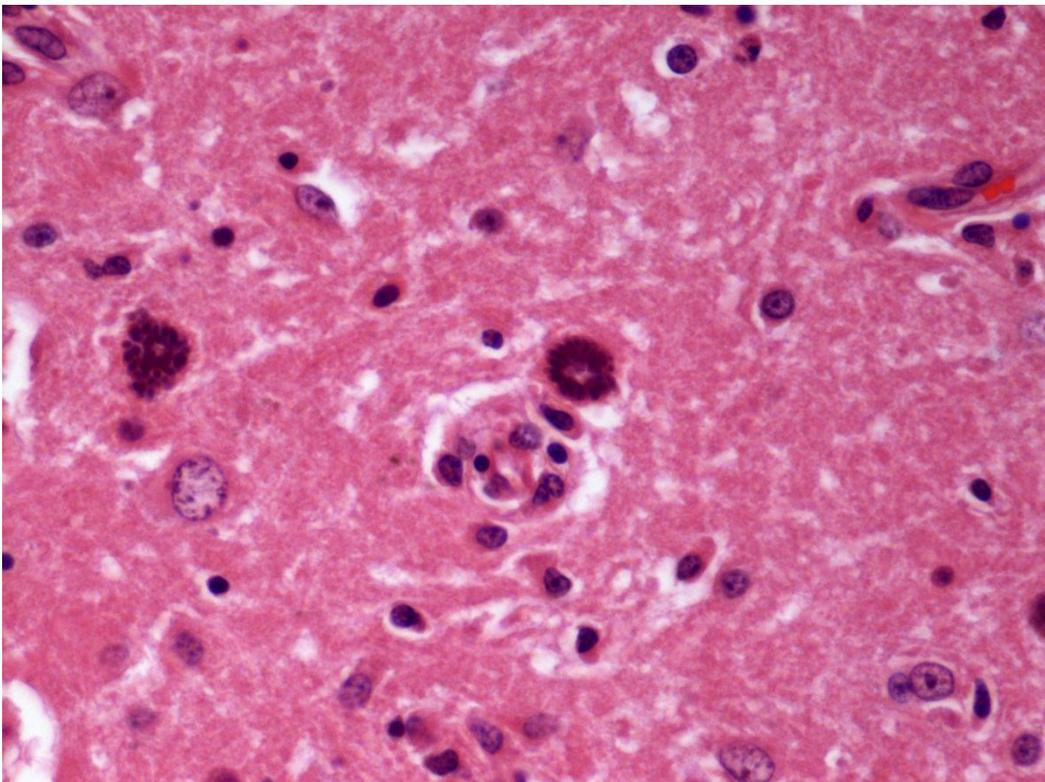
**Figura 1-** Meningoencefalite necrotizante fatal por *Sarcocystis hirsuta* em bovino. Infiltrado de linfócitos, plasmócitos e macrófagos em cérebro. HE. 20x.



**Figura 2-**Meningoencefalite necrotizante fatal por *Sarcocystis hirsuta* em bovino. Protozoário com morfologia de *Sarcocystis* sp. HE. 100x.



**Figura 3-**Meningoencefalite necrotizante por *Sarcocystis hirsuta* em bovino. Protozoários dispostos em roseta, morfologicamente compatíveis com *Sarcocystis* spp. HE. 40x.



**Figura 4-**Meningoencefalite necrotizante por *Sarcocystis hirsuta* em bovino. Protozoários em dispostos em roseta, morfologicamente compatíveis com *Sarcocystis* spp. HE. 100x.

