

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**PESQUISA MOLECULAR DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM AMOSTRAS  
DE SANGUE DE EQUINOS E BOVINOS NO BRASIL**

**TAÍS MEDEIROS SIQUEIRA CARVALHO**

**2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE  
VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PESQUISA MOLECULAR DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM AMOSTRAS  
DE SANGUE DE EQUINOS E BOVINOS NO BRASIL**

**TAÍS MEDEIROS SIQUEIRA CARVALHO**

*Sob a Orientação do Professor*

**Adivaldo Henrique da Fonseca**

*e Co-orientação de*

**Matheus Dias Cordeiro**

**Bruna de Azevedo Baêta**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Julho de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C331p CARVALHO, TAIS MEDEIROS SIQUEIRA, 1993-  
PESQUISA MOLECULAR DE TRIPANOSOMATÍDEOS EM  
AMOSTRAS DE SANGUE DE EQUINOS E BOVINOS NO BRASIL /  
TAIS MEDEIROS SIQUEIRA CARVALHO. - São Mateus, 2022.  
61 f.

Orientador: ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA.  
Coorientador: MATHEUS DIAS CORDEIRO.  
Coorientadora: BRUNA DE AZEVEDO BAÊTA.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2022.

1. hemoparasitoses. 2. tripanossomatídeos. 3.  
diagnóstico molecular e análise filogenética. 4. co  
infecção e oportunismo. 5. criação de bovinos e  
equinos. I. DA FONSECA, ADIVALDO HENRIQUE, 1953-,  
orient. II. CORDEIRO, MATHEUS DIAS, 1983-, coorient.  
III. BAÊTA, BRUNA DE AZEVEDO, 1984-, coorient. IV  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. V.  
Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ATA Nº 3194/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.046519/2022-81

Seropédica-RJ, 29 de julho de 2022.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**  
**TAIS MEDEIROS SIQUEIRA DE CARVALHO**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/07/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese/dissertação.

*(Assinado digitalmente em 05/08/2022 21:41)*

ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA

DESP (12.28.01.00.00.00.52)

Matricula: ###58#7

*(Assinado digitalmente em 04/08/2022 21:58)*

MARISTELA PECKLE PEIXOTO

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matricula: ###034#8

*(Assinado digitalmente em 26/06/2023 19:50)*

ANA PAULA MARTINEZ DE ABREU

CPF: ###.###.387-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3194, ano: 2022, tipo: ATA, data de emissão: 29/07/2022 e o código de verificação: b75006a65e

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho à família, ao amor e à minha bebê Táris,  
que está no bico da cegonha.**

## **EPÍGRAFE**

**“Não viva para que sua presença seja notada, mas para que a  
sua falta seja sentida.”**

**- Bob Marley**

## **AGRADECIMENTOS**

À família, pelo incentivo e carinho.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao órgão de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela colaboração na realização deste projeto e de tantos outros pelo país a fora.

Ao professor Adivaldo Henrique da Fonseca, Matheus Cordeiro e Bruna Baêta, pelo acolhimento e apoio incondicional, desde o período da graduação.

Aos colegas que convivi no laboratório que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste projeto.

Aos meus colegas de trabalho e profissão, e aos poucos amigos, por todas as palavras amigas!

Meu muito obrigada a todos!

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

## BIOGRAFIA

Taís Medeiros Siqueira Carvalho é caçara, natural de São Mateus, Espírito Santo, nascida em 21 de abril de 1993 proveniente de uma gestação gemelar. Filha caçula, juntamente com Laís Medeiros Siqueira Carvalho, de Ronaldo Siqueira Carvalho e Rosane Medeiros Carvalho e irmã de Carolina Medeiros Carvalho e de Maria Janaína Medeiros Carvalho. Coursou o ensino fundamental, parcialmente, em escola pública municipal e na sua maior parte, em escolas de ensino privado. No ano de 2010, graduou-se no ensino médio na rede de ensino Charles Darwin. Em 2011, ingressou no curso superior em Medicina Veterinária na Universidade Federal Fluminense (UFF), onde cursou os quatro semestres iniciais. No ano de 2013, realizou o concurso de transferência externa para Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde graduou-se em Medicina Veterinária ao final de 2016. Coursou especialização *lato sensu* em Patologia Animal no Programa de Residência Multiprofissional na área de Saúde, nos anos de 2018 a 2020, na mesma instituição. Desde 2020, é funcionária pública do Município de Resende, atuando na Clínica de Animais de Companhia no Hospital Veterinário Público do município.



## RESUMO GERAL

CARVALHO, Taís Medeiros Siqueira. **Pesquisa molecular de tripanossomatídeos em amostras de sangue de equinos e bovinos no Brasil**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Os tripanossomatídeos de importância Médico-Veterinária são protozoários unicelulares, flagelados e veiculados a uma grande variedade de hospedeiros vertebrados. Estes agentes patogênicos determinam perdas econômicas significativas, bem como, alguns deles são causadores de doenças de caráter zoonótico, impactando a saúde humana, principalmente em países em desenvolvimento. A ocorrência de tripanossomatídeos tem sido relatada nos rebanhos de equinos e bovinos das Américas, uma vez que existe uma abundante quantidade de insetos hematófagos possibilitando a adaptação e disseminação destes agentes parasitários. No presente estudo, foram realizados ensaios moleculares para detecção de agentes da família Trypanosomatidae, em amostras de sangue oriundas de equinos de diferentes localidades do Brasil e de bovinos da região centro-sul fluminense. Foram submetidas à reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) para detecção de agentes da família Trypanosomatidae, 225 amostras de sangue de equinos provenientes do estado Rio de Janeiro, 89 do estado do Mato Grosso, 343 do estado do Pará e 109 do estado do Acre, onde nenhum animal testou positivo. Já no município de Vassouras, RJ, foram coletadas amostras sanguíneas de 226 bovinos provenientes de 9 propriedades leiteiras para determinação do hematócrito, confecção de esfregaço sanguíneo para exame parasitológico e diagnóstico molecular. Ao exame de cPCR, dois animais da mesma propriedade foram positivos para gênero *Trypanosoma*. O sequenciamento genético destas amostras revelou se tratar da espécie *Trypanosoma theileri*. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de tripanossomatídeos nos plantéis equinos e bovinos.

**Palavras-chave:** animais de produção, PCR, *Trypanosoma theileri*

## ABSTRACT

CARVALHO, Taís Medeiros Siqueira. **Project “Molecular investigation of trypanosomatids in equine and bovine blood samples in Brazil”**. 2022. Dissertation (Master Science in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, PPGCV. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

Trypanosomatids of Veterinary Medical Importance are unicellular, flagellated protozoa transmitted to a wide variety of vertebrate hosts. These pathogens determine significant economic losses, as well as some of them cause zoonotic diseases, impacting human health, especially in developing countries. The occurrence of trypanosomatids has been reported in equine and cattle herds in the Americas, since there is an abundant presence of hematophagous insects, enabling the dissemination and adaptation of these parasitic agents. In the present study, molecular assays were performed to detect agents of the Trypanosomatidae family, in blood samples from horses from different locations in Brazil and from cattle from the central-south region of Rio de Janeiro. They were subjected to conventional polymerase chain reaction (cPCR) to detect agents of the Trypanosomatidae family, 225 equine blood samples from the state of Rio de Janeiro, 89 from the state of Mato Grosso, 343 from the state of Pará and 109 from the state of Acre, where no animal tested positive. In the municipality of Vassouras, RJ, blood samples were collected from 226 cattle from 9 dairy farms for hematocrit determination, preparation of blood smears for parasitological examination and molecular diagnosis. Upon cPCR examination, two animals from the same property were positive for the *Trypanosoma* genus. The genetic sequencing of these samples revealed that they were the species *Trypanosoma theileri*. The objective of this work was to identify the presence of trypanosomatids in equine and bovine herds.

**Keywords:** Brazilian herds, PCR, *Trypanosoma theileri*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Quantidade de amostras de sangue de equinos analisadas por cidade e estado.	14
<b>Tabela 2.</b> Dados e análises moleculares dos animais positivos para <i>Trypanosoma</i> sp.	27

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Imagem esquemática das formas de desenvolvimento encontradas nos tripanosomatídeos. Observe a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. Fonte: Parasitovet (Site desenvolvido pela Médica Veterinária Lis Santos Marque). 2

**Figura 2.** Dendrograma baseado nas sequências do gene 18S rDNA de *Trypanosoma theileri* do estado do Rio de Janeiro, Brasil. 28

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Doenças causadas por tripanossomatídeos de importância Médico-Veterinária.	5
<b>Quadro 2.</b> Conjuntos de primers específicos para os genes <i>A. marginale</i> msp5, <i>B. bovis</i> sbp-4 e <i>B. bigemina</i> rap-1a usado para ensaios moleculares.	26

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1 Família Trypanosomatidae	2
2.2 Ciclo Biológico	3
2.3 Hospedeiros Invertebrados e Vertebrados	3
2.4 Diagnóstico	6
2.4.1 Diagnóstico parasitológico	6
2.4.2 Diagnóstico sorológico	7
2.4.3 Diagnóstico molecular	7
2.4.4 Aspectos filogenéticos	9
 <b>CAPÍTULO I - PESQUISA MOLECULAR DE Trypanosoma SPP. EM AMOSTRAS DE SANGUE DE EQUINOS DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO, MATO GROSSO, ACRE E PARÁ</b>	 <b>10</b>
<b>RESUMO</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
2.1 Amostras	14
2.2 Análises Moleculares	14
2.2.1 Reação da cadeia polimerase (pcr)	14
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>16</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>17</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>19</b>
 <b>CAPÍTULO II - PESQUISA PARASITOLÓGICA, ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE Trypanosoma SP. EM AMOSTRAS DE SANGUE DE BOVINOS DE PROPRIEDADES DE VASSOURAS/RJ</b>	 <b>20</b>
<b>RESUMO</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>22</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
2.1 Aspectos Éticos	24
2.2 Amostragem	24
2.3 Análise Molecular	25
2.3.1 Extração de dna	25
2.3.2 Detecção molecular para trypanosoma spp.	25
2.3.3 Detecção Molecular para A. marginale, B. bovis e B. bigemina	25
2.3.4 Sequenciamento genético	26
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>27</b>

<b>4 DISCUSSÃO</b>	29
<b>5 CONCLUSÕES</b>	31
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	32
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	33
<b>ANEXOS</b>	40

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os protozoários da família Trypanosomatidae, são diversos em classificação, variabilidade genética, morfologia, ciclo biológico e por isso também na forma com que se relacionam com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados.

São microrganismos unicelulares, flagelados, cujos de importância Médica Veterinária, possuem o ciclo heteroxênico, nos quais, geralmente, são transmitidos a uma grande variedade de hospedeiros vertebrados no momento da hematofagia por hospedeiros invertebrados.

Em países em desenvolvimento, alguns destes protozoários são agentes biológicos patogênicos (com exceção do *Trypanosoma theileri*, considerado pouco patogênico ou apatogênico), causadores de enfermidades em animais domésticos de produção e determinam, assim, perdas econômicas significativas. Algumas espécies do gênero são causadores de enfermidades zoonóticas (como Doenças de Chagas e as leishmanioses), têm alto impacto na saúde humana, uma vez que, entre outros fatores inerentes a relação parasito-hospedeiro-vetor, são doenças negligenciadas apesar dos esforços governamentais para conter as infecções humanas.

Os tripanosomatídeos causadores de doenças de importância Veterinária, *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi* e *T. equiperdum* (subgênero *Trypanozoon*) podem resultar em doenças fatais de seus hospedeiros e causam, respectivamente, as doenças “Nagana”, “Surra” e “Durina” com perdas significativas na produção animal no que diz respeito aos continentes africano e asiático, com relatos no sul americano (HOARE, 1972).

Estudos de detecção molecular destes agentes podem revelar a circulação de diversas espécies do gênero *Trypanosoma* nos plantéis de animais de produção nacional e alertar sobre as formas de transmissão, bem como elucidar casos de perdas produtivas nas propriedades.

No presente estudo, foram realizados ensaios moleculares de cPCR para detecção de agentes da família Trypanosomatidae, em amostras de sangue oriundas de equinos de diferentes localidades do Brasil. Assim, objetivou-se identificar a circulação destes agentes em plantéis brasileiros de animais de produção. Já na investigação do município de Vassouras, região centro-sul do estado do Rio de Janeiro, as amostras de sangue bovino obtidas de 9 propriedades leiteiras foram submetidas à determinação de hematócrito e exame direto através do esfregaço sanguíneo e à reação de cPCR para *Trypanosoma* spp. e n-PCR e snPCR para agentes da tristeza parasitária bovina. Objetivou-se, portanto, identificar hemoprotozoários, verificando diagnósticos diferenciais (*Babesia* sp. e *Anaplasma marginale*) e a possibilidade de co-infecções em associação com o achado hematológico de anemia.



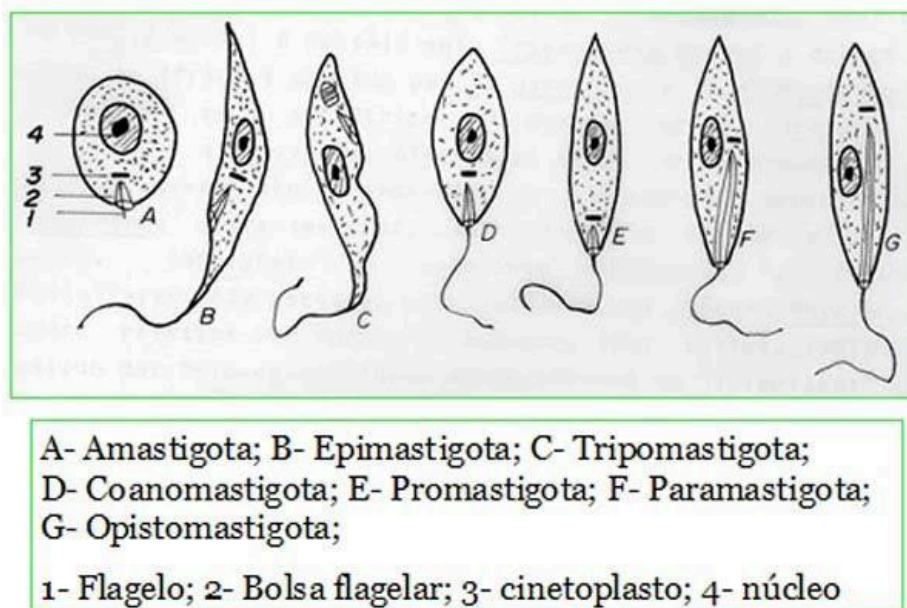
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Trypanosomatidae

Segundo Corless (1994), taxonomicamente, os tripanossomatídeos são classificados no Império Eukaryota, Reino Protista, Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastida, Ordem Trypanosomatida e Família Trypanosomatidae (HOARE, 1972; HAAG et al., 1998).

Estes micro-organismos são eucariontes, unicelulares, flagelados e possuem cinetoplasto. Têm alta capacidade de replicação, pelo mecanismo de divisão binária (cissiparidade) e geralmente são transmitidos pela hematofagia de artrópodes (vetoração biológica ou mecânica) e infectam uma grande diversidade de hospedeiros vertebrados (HOARE, 1972; HAAG et al., 1998). Por possuírem uma grande diversidade biológica e por isso também apresentam-se em diferentes formas de desenvolvimento, estas variam conforme a espécie do parasito e nos fluidos e tecidos dos hospedeiros vertebrados e invertebrados durante todo o ciclo biológico. Assim, as denominações destas formas de desenvolvimento são de acordo com o formato do corpo, local de inserção do flagelado e posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE, 1972; VICKERMAN, 1976), conforme a figura representativa abaixo (figura 1):

#### Diferentes formas de Trypanosomatidae



**Figura 1.** Imagem esquemática das formas de desenvolvimento encontradas nos tripanossomatídeos. Observe a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. Fonte: Parasitovet (Site desenvolvido pela Médica Veterinária Lis Santos Marque).

Podem ser classificados, ainda, de acordo com a forma de contaminação da pele lesionada ou mucosas pela saliva ou fezes do artrópode transmissor. Quando é a saliva que contém o hemoflagelado, este é classificado na Seção *Salivaria*, e quando são as fezes que estão contaminadas, a Seção é *Stercoraria*. Nota-se que a maioria dos hemoflagelados da seção *Salivaria* são patogênicos, e a maioria da seção *Stercoraria* são apatogênicos, com exceção do *Trypanosoma cruzi* que causa enormes prejuízos à saúde humana e provocam doenças em outros mamíferos (MATTHEWS, 2005; ROQUE; JASEN, 2014).

## 2.2 Ciclo Biológico

Apesar dos tripanossomatídeos serem em sua maioria de ciclo monoxênico, os de importância médico-veterinária são heteroxênicos, à exemplo dos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanu* e estes geralmente necessitam de um hospedeiro vertebrado e invertebrado. (HOARE; WALLACE; 1966; MERZLYAK et al., 2001, SVOBODOVÁ et al., 2007; VOTÝPKA et al., 2015); WALLACE et al., 1983; WALLACE, 1966).

De forma geral, no gênero *Trypanosoma*, quando se tem a participação de um vetor biológico, o inseto, ao fazer o repasto sanguíneo, injeta formas tripomastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado. A infecção pode ocorrer via saliva (*Salivaria*) ou fezes contaminando ferida ou mucosas íntegras (*Stercoraria*). Dentro do hospedeiro, eles se transformam em tripomastigotas ou amastigotas nos tecidos (depende da espécie do protozoário envolvido) e são levados a outros locais do organismo, em fluidos corporais (ex. sangue, linfa, líquido) onde se replicam por cissiparidade. O inseto torna-se infectado por formas tripomastigotas da corrente sanguínea quando fazem um repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado. Quando o parasito é da Secção *Salivaria*, os protozoários se transformam em tripomastigotas procíclicos no intestino médio do inseto e multiplicam-se por divisão binária. Ao deixarem este segmento, rumo a glândula salivar, transformam-se em epimastigotas. Na glândula salivar, transformação em tripomastigotas metacíclicos e continuam sua multiplicação por fissão binária. O hospedeiro invertebrado, ao se alimentar, reinicia novamente o ciclo do parasito no hospedeiro vertebrado. Nos parasitos pertencentes a Secção *Stercoraria*, as formas tripomastigotas ingeridas se transformam em epimastigotas no intestino médio do vetor, onde se multiplicam também por fissão binária. No intestino grosso, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectantes, que são excretados nas fezes e assim reinicia-se o ciclo novamente, ao se alimentar do hospedeiro vertebrado (MANUAL MSD, 2022).

Nos casos de transmissão mecânica, as formas de desenvolvimentos da corrente sanguínea são transferidas de um hospedeiro mamífero infectado a outro, por meio de insetos hematófagos ou fômites pérfuro-cortantes (MAGONA et al., 2008). Ao ocorrer o repasto sanguíneo ou a introdução de agulha contaminada, são inoculadas as formas tripomastigotas na corrente sanguínea se reproduzem por divisão binária, onde podem permanecer, ou podem invadir outros tecidos. Porém, estes parasitos são encontrados em outras formas infectivas, como na forma amastigota (HOARE, 1972). Num novo repasto sanguíneo, o aparato bucal do inseto é contaminado e diferentemente do que ocorre na transmissão cíclica/ biológica, essa transmissão mecânica é de curta duração pois depende da sobrevivência dos parasitos na probóscide (SILVA et al., 2002).

Vale ressaltar que até o momento, no Brasil, sabe-se que os dípteros hematófagos funcionam como vetores mecânicos no ciclo do parasito *Trypanosoma vivax*, ou seja, apenas as formas tripomastigotas são encontradas. Já na África, encontram-se formas amastigotas e epimastigotas na mosca do gênero *Glossina* sp. (HOARE, 1972).

## 2.3 Hospedeiros Invertebrados e Vertebrados

O gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843 (Euglenozoa: Kinetoplastea: Trypanosomatidae), infecta todas as classes de hospedeiros vertebrados, porém as espécies mais conhecidas e estudadas são os que determinam doenças humanas e animais e grandes perdas econômicas associadas (HOARE, 1972).

Trata-se de parasitos heteroxênicos, ou seja, precisam de pelo menos dois hospedeiros para

completarem seu ciclo, no qual um é hospedeiro vertebrado e o outro invertebrado. Assim, os hospedeiros invertebrados, principalmente insetos das Ordens Diptera, Heteroptera ou Siphonaptera, também têm o papel de transmissão por vetoração destes protozoários, com exceção do *T. equiperdum*, que é transmitido de forma direta, por via sexual (FISHER et al., 2013).

Algumas espécies são altamente patogênicas para seus hospedeiros vertebrados, os quais podem incluir o ser humano, como na doença de Chagas causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, causador da “Doença do sono” (HOARE, 1972).

A “doença do sono” ou “Nagana” causada por *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*, transmitido pela mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.) (LANGOUSIS; HILL, 2014; PAIVA et al., 2000), parasita o sangue, a linfa e o líquido cefaloraquidiano dos mamíferos. Tem grande importância na África subsaariana, acometendo cerca de três milhões de pessoas, determina morbidade e mortalidade altas em humanos e afeta também bovinos, causando importantes prejuízos à pecuária (LANGOUSIS; HILL, 2014; PAIVA et al., 2000).

No Oeste da África, onde ungulados selvagens são um importante reservatório de *Trypanosoma vivax*, este agente é também transmitido por moscas tsé-tsé, do gênero *Glossina* spp., e determina prejuízos na pecuária bovina africana. A doença pode ser assintomática ou aguda com derrames hemorrágicos na mucosa e serosa dos órgãos, ou ainda, na crônica da doença, cursando com anemia, emaciação e apatia. Há relatos de doença nos pequenos ruminantes domésticos com quedas na produtividade cursando com abortos, infertilidade e consequente queda na produção de leite (BATISTA et al., 2008; PAIVA, 2009; BEZERRA; BATISTA, 2008).

“Surra” é causada por *T. evansi* e tem como vetores os dípteros da família Tabanidae e morcegos hematófagos, acomete todas as espécies de animais domésticos e outros mamíferos na Ásia, África e América Latina (JAIME-DUENEZ et al., 2017). Os sinais clínicos, na fase aguda, cursam com anemia, febre intermitente, edema de membros e ventre, perda de pele, emaciação e inapetência. Na fase crônica, há incoordenação e paralisia dos membros posteriores (que faz juz ao nome da doença), além de anemia, linfadenomegalia, palidez de mucosa, por vezes, ictéricas e fraqueza (MORAES et al., 2007).

“Mal do coito” ou “Durina” é causada por *T. equiperdum* e acomete equídeos, no qual a transmissão é pela via sexual, e determina, na fase aguda, edema de genitália e exsudação mucosa. Com a evolução, placas circulares e achatadas se formam na pele que perduram por pouco tempo. Na fase crônica, o animal torna-se emaciado, apresenta paresia e febre intermitente, evoluindo ao óbito. Por este motivo, está listada pela Organização Mundial da Saúde como uma das doenças importantes entre animais da espécie equina (SUGANUMA et al., 2017). Além disso, esta enfermidade tem alta distribuição a nível mundial, apesar de que, atualmente, já se encontra erradicada em muitos países (RODRIGUES et al., 2016).

**Quadro 1.** Doenças causadas por tripanossomatídeos de importância Médico-Veterinária.

Espécie do parasita	Distribuição	Hospedeiros	Hospedeiro invertebrado (Vetor)	Enfermidade
<i>Trypanosoma brucei</i>	Oeste da África	Humanos	<i>Glossina palpalis</i>	Nagana/Doença do sono (Tripanossomíase crônica)
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	Leste da África	Humanos	<i>Glossina morsitans</i>	Nagana aguda
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	África	Gado, antílope, cavalos, camelos	<i>G. pallidipes</i>	Nagana aguda
<i>Trypanosoma congolense</i>	África	Gado, antílope, cavalos, camelos	<i>Glossina morsitans</i>	Nagana crônica
<i>Trypanosoma vivax</i>	África	Gado, antílope, cavalos, camelos	<i>Glossina morsitans</i>	Nagana aguda
<i>Trypanosoma evansi</i>	África	Camelos, cavalos, veado	Tabanídeos	Surra
<i>Trypanosoma equiperdum</i>	África	Cavalos e jumentos	Não há	Durina
<i>Trypanosoma cruzi</i>	América do Sul e Central		<i>Rhodinus prolixus</i>	Doença de Chagas

Fonte: Richard Hunt, 2017

*Trypanosoma theileri*, *T. cervi*, *T. melophagium*, *T. stefanskii* e *T. theodori* e outras espécies (membros do subgênero *Megatrypanum*) são geralmente considerados apatogênicos (HOARE, 1972). As três primeiras espécies são bem definidas com dados de sequenciamento disponíveis obtidos na Europa, Américas, Ásia e África e foram detectadas em bovídeos, cervídeos e ovinos, respectivamente. As duas últimas espécies citadas foram descritas em cervídeos e cabras, respectivamente (HOARE, 1972; KINGSTON et al., 1992; GARCIA et al., 2020). São transmitidos, aos seus hospedeiros vertebrados, pela hematofagia de tabanídeos, com exceção de *T. melophagium* e *T. theodori* que são transmitidos por mosca-piolho do gênero *Lipoptena* sp. Entretanto, a existência de outros vetores também é considerada (FISHER et al., 2013). A presença de *Trypanosoma theileri*-like, já foi detectada em vários mosquitos, flebotomídeos, e mosca tsé-tsé (CALZOLARI et al., 2018; VOTÝPCA et al., 2015; SCHOENER et al., 2018) e a espécie *T. theileri*, em alguns carrapatos (MORZARIA et al., 1986; LATIF et al., 2004; MARTINS et al., 2008; BURGDORFER et al., 1973).

Análises filogenéticas realizadas com vários marcadores moleculares em uma ampla gama de isolados de *Megatrypanum* de vários ruminantes e dípteros hematófagos demonstraram que, embora este grupo seja monofilético, ele consiste em várias linhagens unidas em dois grandes clados, TthI e TthII, cada um contendo parasitos isolados de bovídeos e cervídeos (GARCIA et al., 2020; RODRIGUES et al., 2010; (FISHER et al., 2013; SUGANUMA et al., 2020; PACHECO et al., 2018; HAMILTON et al., 2009; ROSYADI et al., 2021). Assim, essas espécies de *Trypanosoma* spp. são considerados do complexo *T. theileri*, sendo *Trypanosoma theileri* considerado o parasito espécie-tipo do subgênero *Megatrypanum* (HOARE, 1964).

Apesar do complexo ser considerado apatogênico, há vários relatos de que *T. theileri* pode ser

considerado um patógeno oportunista, onde observa-se a co-infecção com alguns vírus e piroplasmídeos determinando enfermidade, ou mesmo que isoladamente, pode ser capaz de causar sintomas leves a graves, cursando com morte de fetos e bezerros neonatos (DOHERTY et al., 1993; LEVINE et al., 1956; BRAUN et al., 2002; SUGANUMA et al., 2022; HAJIHASSANI et al., 2020; GRECO et al., 2000; SEIFI, 1995; VILLA et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2011; SOOD et al., 2011).

Estudos recentes realizados por Pacheco et al. (2018) e Hajihassani et al. (2020) demonstraram que animais com anemia, anorexia, apatia, febre, linfadenomegalia e responsivos ao tratamento com diaceturato de diminazeno, também podem estar relacionados à infecção por *T. theileri*.

## **2.4 Diagnóstico**

### **2.4.1 Diagnóstico parasitológico**

Também conhecido exame direto, onde visa observar o parasito na amostra, consiste na utilização de amostras de sangue fresco, aspirado de linfonodos, fluido céfalo-raquidiano, esfregaço de órgãos e secreções genitais os quais irão variar conforme na sintomatologia a qual é diretamente relacionada com a espécie do agente envolvido (RADOSTITIS et al., 2000; SILVA et al., 2003; DESQUENES, 2004).

A visualização do parasito, em microscópico óptico, permite determinar formas do ciclo biológico, as principais características e assim diagnosticar o gênero (RADOSTITIS et al., 2000; SILVA et al., 2003; DESQUENES, 2004). Já a diferenciação das espécies se dá através da morfometria, diferenças na forma, comprimento total, posicionamento do núcleo e do cinetoplasto (índices nuclear e cinetoplástico, que definem a posição entre estas estruturas) e no grau do desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo (HOARE, 1972; D'ÁVILA et al., 1997; CUGLOVICI et al., 2010).

Dentre as amostras, o sangue é o mais utilizado pela fácil colheita em vasos calibrosos como a jugular ou em capilares de ponta da orelha (DESQUENES, 2004; CONNOR; BOSSCHE, 2005). Assim, os exames diretos mais empregados são a técnica da gota espessa, que consiste em colocar gota de sangue entre lâmina e lamínula e visualização diretamente em microscópio óptico, com objetiva de 100x. E também o esfregaço sanguíneo em uma camada bem fina de células que são coradas pela coloração de Giemsa e também permitem leitura da lâmina com esta mesma objetiva (SILVA et al., 2003; DESQUENES, 2004); Também é muito utilizada para diagnóstico de *Trypanosoma* spp. a técnica do microhematócrito ou Método de Woo, que consiste na centrifugação da amostra de sangue para obtenção da capa leucocitária, confecção esfregaço e coloração apartir desta (HOARE, 1972; SILVA et al., 2003). Outro método direto bastante utilizado é aspirado de linfonodo, que consiste em puncioná-lo e confeccionar esfregaço deste material, onde é corado por Giemsa e submetido ao exame microscópico na objetiva de 100x.

Dentre os métodos diretos, o da capa leucocitária é o mais sensível e mais empregado com boa confiabilidade, inclusive, recomendado no diagnóstico a campo (HOARE, 1972; SILVA et al., 2003; MADRUGA, 2004; ABRÃO et al., 2009). Outro fator que influencia e aumenta a sensibilidade do exame é a apresentação clínica de anemia dos animais durante a investigação do surto (BATISTA et al., 2007). Métodos parasitológicos são muito específicos, porém apresentam baixa sensibilidade, pela presença ou não de sintomatologia e a fase da doença que influem no nível de parasitemia (CONNOR; BOSSCHE, 2005; MADRUGA et al., 2006).

Os métodos diretos são indicados para a fase aguda da doença, quando o parasito está em grande quantidade no sangue, havendo picos de parasitemia associados ao estado febril do animal. Com a evolução da doença, estes picos se tornam menos frequente, ou seja, com intervalos maiores entre eles, fazendo-se necessária a utilização de outros métodos diagnósticos (RADOSTITS et al., 2000).

#### 2.4.2 Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos podem detectar anticorpos antitripanossomas no soro ou em outros fluidos (RADOSTITS et al., 2000). São testes relativamente de rápida execução, apresentam baixo custo e têm maior sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos (MADRID, 2017). Dentre elas, o teste de ELISA indireto e o RIFI são bem empregados (GERMANO et al., 2018), onde o primeiro detecta antígenos tripanossômicos circulantes com o emprego de anticorpos monoclonais (RADOSTITS et al., 2000) e é capaz de detectar mais precocemente em relação ao RIFI (SAMPAIO, 2013). Porém, estes antígenos são similares entre si e por isso estes testes não são espécie-específicos, ou seja, não determinam a espécie de *Trypanosoma* envolvido (SILVA et al., 2002; DESQUENES, 2004). Outra limitação é estabelecer se a infecção está ativa ou se ocorreu no passado. Além disso, pode-se não detectar todos os animais afetados da propriedade, principalmente se a infecção estiver no início, pois não há soroconversão suficiente para tal. Por este motivo, métodos sorológicos são mais indicados na fase crônica e subclínica da doença (RADOSTITS et al., 2000; MADRID, 2017).

Apesar das limitações, permitem pesquisa epidemiológica para avaliação de prevalência de casos nas propriedades acometidas (DESQUENES, 2004; GALIZA et al., 2011) e são indicados como teste de triagem nas áreas não enzoóticas para tripanossomíase (DESQUENES, 2004). No estudo experimental de Schenk et al. (2001), o teste de ELISA detectou anticorpos no 6º e 8º dias após infecção de bovinos por *Trypanosoma vivax* permitindo identificação de soropositivos durante os 30 dias do experimento.

Em um estudo conduzido por Batista et al. (2007), utilizando-se de um extrato de *T. vivax* como antígeno para o teste de ELISA, detectou-se anticorpos em bovinos assintomáticos em um surto em bovinos no semi árido no estado da Paraíba. Neste caso, a titulação foi utilizada para monitorar a duração da enfermidade no rebanho e para detectar animais assintomáticos.

Em um estudo realizado por Guerra et al. (2013), onde objetivou-se determinar a prevalência *T. vivax* em bovinos de Pernambuco, utilizando-se da técnica de RIFI o resultado foi similar às encontradas em outras regiões do Brasil, bem como em países endêmicos (CONNOR; BOSSCHE, 2005). Sugeriu-se então, que o estado de Pernambuco seja uma área endêmica para a tripanossomíase causada por *T. vivax*.

Apesar das vantagens e da aplicabilidade das técnicas sorológicas, um dos maiores entraves deste tipo de diagnóstico, é quanto a especificidade ocorrendo reação cruzada entre parasitos do mesmo gênero, principalmente em áreas endêmicas onde ocorrem infecções por *T. evansi* (OSÓRIO et al., 2008).

#### 2.4.3 Diagnóstico molecular

O método da reação em cadeia de polimerase (PCR) é o método de detecção mais sensível pois detecta os tripanosomatídeos nos tecidos, principalmente na fase crônica da doença, quando a

presença dos parasitos é pequena.

Vários protocolos para realização de uma reação de PCR para o diagnóstico de hemoprotozoários foram desenvolvidos nos últimos anos em vista da significativa diferença significativa de sensibilidade entre o exame direto e o exame molecular (D'ÁVILA et al., 1997; MADRUGA et al., 2004). Protocolos desenvolvidos para técnica de Nested-PCR, aumentam ainda mais a sensibilidade do diagnóstico molecular (MADRUGA et al., 2004).

Além da alta sensibilidade, esta técnica é específica para os principais tripanosomas patogênicos de mamíferos, ou seja, amplifica um segmento de DNA específico determinando a espécie de *Trypanosoma* envolvida no quadro (DESQUENES, 2004).

Apesar destas características, a PCR convencional não determina a fase e o prognóstico da infecção (SAMPAIO, 2013), sendo a qPCR (PCR real time) mais indicada, pois permite a quantificação destes agentes nas amostras (JÚNIOR et al., 2017).

Outra técnica que pode ser empregada é a LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), consiste numa amplificação em uma única temperatura, de rápida e simples execução, utilizada em laboratórios com poucos recursos ou mesmo à campo. E por isso pode ser uma ferramenta estratégica para detectar amostras positivas para *T. vivax* (CADIOLE et al., 2015).

Geysen et al. (2003) desenvolveram *primers*, para técnica de PCR, que amplificam o gene que expressa a subunidade ribossomal 18S, capaz de amplificar todas as espécies de *Trypanosoma*. Com isso, possibilita a diferenciação de espécies através de análises enzimáticas restritas da região amplificada e aplicação de outras técnicas e ferramentas diagnósticas.

Para diagnóstico de *T. vivax* utiliza-se *primers* baseados na sequência do gene que codifica proteína de transporte da glicose (PCR/GTP). Trata-se de um antígeno conservado em todos os isolados de *T. vivax*, inclusive brasileiros estudados até o momento (MADRUGA et al., 2006; MASAKE et al., 1997).

Além de diagnosticar, a PCR e outras técnicas moleculares associadas podem caracterizar a genética de cepas e correlacionar com a interação parasita-hospedeiro (VENTURA et al., 2001). Por exemplo, os marcadores TVW1 & TVW2, ILO1264 & ILO1265 e TV80 & TV322.24, do DNA satélite usados na detecção de tripanossomatídeos da Seção Salivaria. Outros *loci*, como os minicírculos e mini-exón, também podem ser utilizados no auxílio diagnóstico (SILVA et al., 2002). O diagnóstico do parasito *T. theileri* é dificultado pela baixa parasitemia e as possíveis co-infecções com outros tripanossomas. Para isso, pode ser necessária a utilização de marcadores moleculares específicos, como o *ITS* de *rDNA*, *SL* e *CatL* (RODRIGUES et al., 2010). Além destes, sequências de genes da região V7V8 do *SSU rDNA* (DA SILVA et al., 2004) e glicossomal desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (*gGAPDH*) (PACHECO et al., 2018) são descritos como possíveis ferramentas no auxílio do diagnóstico para o agente.

No estudo de Pacheco et al. (2018), amostras de vacas leiteiras Ji-Paraná, Rondônia, foram colhidas no período de 2012 e 2013 e processadas no qual estimaram a prevalência em 4,06% nos exames de hemocultura e foram diagnosticadas 12,19% do plantel com *T. theileri*, através do exame de PCR, com marcador molecular CatL baseado no gene da Catepsina L-like. Já no estudo de Rodrigues et al. (2010), de 72 animais, 34 (47%) foram positivos pelo mesmo marcador. E 22 (30%) animais foram positivos na técnica de hemocultura.

#### 2.4.4 Aspectos filogenéticos

A técnica de PCR, como exame molecular, é uma ferramenta que permite a organização filogenética destes microorganismos, pois possibilita a comparação de sequências gênicas.

O gene 18S rDNA tem sido amplamente utilizado para caracterizar *T. vivax*, uma vez que apresenta domínios alternativos e variáveis, com amplificação de segmentos conservados (ADAMS et al., 2010). No estudo de Rodrigues et al.(2008), a subunidade menor (SSU) do gene 18S (fragmento de rDNA), determinou a existência de três clados na árvore filogenética de *T. vivax*, onde observaram sequências diferentes das cepas da Tanzânia e Moçambique das do Leste e Oeste Africano.

Cortez et al. (2006) ao estudar sequências destes genes, compararam cepas de *T. vivax* da América do Sul com cepas de diferentes regiões do continente africano quanto a patogenicidade e a proximidade filogenética e constataram que as cepas sul americanas são mais patogênicas que as cepas do Leste Africano e mais próxima filogeneticamente as da África Ocidental.

Os genes que expressam a cisteino-protease (CatL) na família Trypanosomatidae desempenham diversas funções metabólicas e regulatórias como hidrólise de ligações peptídicas, fuga do sistema imune do hospedeiro, invasão celular, mecanismo de apoptose, virulência e patogenicidade (SAJID; McKERROW, 2002).

Através da análise filogenética de sequências de *T. theileri* é possível verificar que o clado é formado por um grupo complexo de parasitos separados em duas linhagens (TthI e TthII) que abrigam 14 genótipos distintos utilizando dois marcadores moleculares diferentes (SSU e ITS), TthI (IA / IB / IC / Tailandês Ia / Thai Ib) e TthII (IIA / IIB / IIC/ TailandêsIIa) (GARCIA et al., 2011; CALZOLARI et al., 2018). Na América do Sul, o genótipo ThIA foi encontrado exclusivamente em búfalos e, no Brasil, apenas os genótipos TthIIA/ B foram encontrados.

Segundo Pacheco et al. (2018), o extenso território brasileiro bem como o pleno desenvolvimento agropecuário favorecem a transmissão de diversos hemoparasitos (YOKOYAMA et al., 2015) e permitem maior diversidade genética de *T. theileri*.

Novos marcadores moleculares, como ITS, SL e CatL, evidenciam a diversidade genética havendo assim, até o momento, 18 genótipos descritos Tth I (IA, IB, IC, ID, IE, IF, IG, IH, II, IJ, IK, IL) e Tth II (IIA, IIB, IIC, IID), com as linhagens IIE e IIF recém estudadas e descritas por Suganuma et al. (2019).



## **CAPÍTULO I**

### **PESQUISA MOLECULAR DE *Trypanosoma* SPP. EM AMOSTRAS DE SANGUE DE EQUINOS DOS ESTADOS DO RIO DE JANEIRO, MATO GROSSO, ACRE E PARÁ**

## RESUMO

CARVALHO, Taís Medeiros Siqueira. **Pesquisa molecular de *Trypanosoma* spp. em amostras de sangue de equinos dos estados do Rio de Janeiro, Mato Grosso, Acre e Pará.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo e o maior da América Latina, e as tripanossomíases, causadas pelo protozoários do gênero *Trypanosoma* podem determinar prejuízos econômicos pela queda da *performance* e taxas de mortalidade consideráveis. O objetivo do presente trabalho foi identificar tripanosomatídeos em diferentes propriedades do país. Amostras de sangue total de equinos, que fazem parte do banco de amostras do Laboratório de Doenças Parasitárias e cultivo celular e Hemoparasitos (LCCH) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), foram testadas para a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A reação teve como objetivo a identificação e amplificação de segmento gênico de aproximadamente 300 pb do 24s rDNA alfa, utilizando-se dos *primers* D75 e D76, que decodificam as sequências 5'-GCAGATCTTGGTTGGCGTAG-3' e 5'-GGTCTCTGTTGCCCCCTTTT-3' (SOUTO et al., 1999). A positividade da amostra significa a presença de um agente da família Trypanosomatidae, porém, todas provenientes das propriedades rurais dos estados do Rio de Janeiro, Mato Grosso, Acre e Pará testadas não obtiveram amplificação, resultando em negativos. Portanto, mais estudos são necessários para a detecção e vigilância das tripanossomíases equinas no país, além de incitar estudos epidemiológicos mais profundos sobre a dinâmica destes agentes no plantel nacional.

**Palavras-chave:** Tripanossomatídeos, equinos, diagnóstico molecular

## ABSTRACT

CARVALHO, Taís Medeiros Siqueira. **Project “Molecular research of *Trypanosoma* spp. in blood samples from horses from Rio de Janeiro, Mato Grosso, Acre and Pará.”**. 2022. Dissertation (Master Science in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, PPGCV. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

Brazil has the third largest herd of horses in the world and the largest in Latin America, and trypanosomiasis, caused by protozoa of the genus *Trypanosoma* sp, can determine economic losses due to the drop in performance and considerable mortality rates. The objective of the present work was to identify trypanosomatids, in different properties of the country, through molecular examination. Whole blood samples from horses, which are part of the sample bank of the Laboratory of Parasitic Diseases and Cell Culture and Hemoparasites (LCCH) of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ), were tested for the Polymerase Chain Reaction technique (PCR). The objective of the reaction was to identify and amplify a gene segment of approximately 300 bp of 24s alpha rDNA, using primers D75 and D76, which decode the sequences 5'-GCAGATCTTGTTGGCGTAG-3' and 5'-GGTTCTCTGTTGCCCCCTTTT-3' (SOUTO et al., 1999). The positivity of the sample means the presence of an agent of the Trypanosomatidae family, however, all tested from rural properties in the states of Rio de Janeiro, Mato Grosso, Acre and Pará did not obtain amplification, resulting in negative results. Therefore, more studies are needed for the detection and surveillance of equine trypanosomiasis in the country, in addition to encouraging deeper epidemiological studies on the dynamics of these agents in the national herd.

**Keywords:** Trypanosomatids, horses, molecular diagnosis

## 1 INTRODUÇÃO

Os protozoários hemoflagelados patogênicos da família Trypanosomatidae, que parasitam o sangue, a linfa e o interstício, geralmente são transmitidos através de artrópodes hematófagos. Estes agentes são causadores das tripanossomíases ou tripanosomoses e determinam doença com alta incidência, muitas vezes negligenciadas e têm alto impacto na saúde animal (com consequentes perdas econômicas importantes), e por vezes, impactam também a saúde humana quando se trata de um agente de caráter zoonótico.

As tripanossomíases, causadas pelo gênero *Trypanosoma*, caracteriza-se pela presença intermitente do agente cursando com quadro de anemia. Nos animais, há perda de peso com consequente queda na produtividade, e por vezes, cursa com grandes mortandades (CONNOR; VAN DEN BOSSCHE, 2004).

Na América do Sul, as espécies que causam tripanossomíases em animais são *T. cruzi*, *T. theileri*, *T. equiperdum*, *T. evansi* e *T. vivax* (HOARE, 1972). Dentre estas, as espécies *T. evansi* e *T. vivax* determinam perdas econômicas importantes e apresentam um potencial risco para aproximadamente 300 milhões de cabeças de gado, 1,8 milhões de búfalos, e 16 milhões de cavalos (DÁVILA; SILVA, 2000).

No Brasil, *T. evansi* afeta principalmente equinos, apesar da variação de prevalência entre as regiões (DÁVILA; SILVA, 2000; HERRERA et al., 2004), estes animais apresentam alta soroprevalência em relação a outras espécies animais devido à grande exposição ao agente (HERRERA et al., 2004). No Pantanal Matogrossense, a doença é enzoótica uma vez que esses animais são amplamente usados para o manejo de bovinos (SILVA et al., 1995a; AQUINO et al., 1999).

*Trypanosoma vivax* tem seu habitat natural a África tropical, onde existe a alta distribuição da mosca tsé-tsé. Este agente também é presente na no Oeste da Índia, América do Sul e Central e Ilhas Maurício mesmo sem a presença de seu vetor (HOARE, 1972; SILVA et al., 1999). Na América do Sul, a doença em bovinos é conhecida como “Secadeira” e pode cursar com alta morbidade e mortalidade de ruminantes. Em equinos, a doença se manifesta de forma branda, com evolução crônica, e de baixa mortalidade (LOSOS; IKEDE, 1972). A ocorrência deste parasita em equídeos na África é comprovada, sendo os equinos mais susceptíveis que os asininos. Entretanto, no Brasil, mesmo sendo endêmico para a doença em bovinos, existem raros diagnósticos de *T. vivax* em equídeos (BARBOSA, 2021).

*Trypanosoma equiperdum* está distribuído em regiões de quase todos os continentes, com exceção dos pólos, Ártico e Antártico, e Oceania. Na América do Sul, existem poucos trabalhos sobre epizootiologia e distribuição desse protozoário (DÁVILA et al., 2000). Essa espécie acomete apenas equídeos domésticos (HOARE, 1972; LUCKINS et al., 2004) sendo, a maioria deles, portadores assintomáticos, apesar de acometer todo o rebanho de maneira insidiosa. Conforme o Ministério da Agricultura (2016), o Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo e o maior da América Latina e assim, as tripanossomíases têm o potencial de determinar prejuízos econômicos importantes.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi detectar presença de tripanosomatídeos em DNA extraído de sangue total de equinos coletados de 4 estados brasileiros, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Acre e Pará.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Foram utilizadas amostras de DNA total de equinos pertencentes ao banco de amostras do Laboratório de Cultivo Células e Hemoparasitos (LCCH) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

As amostras são provenientes de propriedades privadas (Rurais e urbanas) localizadas nos estados do Rio de Janeiro, Mato Grosso, Acre e Pará. Todas as amostras foram coletadas de forma aleatória por conveniência probabilística. A tabela 1 mostra as localidades de cada estado e a quantidade de amostras testadas e o ano coletado.

**Tabela 1.** Quantidade de amostras de sangue de equinos analisadas por cidade e estado.

Estado	Municípios	Ano de coleta	Nº de Amostras
Rio de Janeiro	Resende	2020	107
	Barra do Pirai	2020	100
	Itaperuna	2020	18
Mato Grosso	SINOP	2015 - 2016	89
Pará	Cachoeira do arari, Salvaterra, Santa Cruz do Arari e Soure	2012 - 2013	343
Acre	Bujari, Porto Acre, Senador Guimard, Acrelândia, Plácido de Castro e Capixaba	2018 - 2019	109

### 2.2 Análises Moleculares

#### 2.2.1 Reação da cadeia polimerase (pcr)

O DNA das amostras de sangue dos equinos e do controle positivo foram extraídos utilizando-se o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification “Kit” (PROMEGA®), conforme recomendação do fabricante. A integridade do DNA foi comprovada usando uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os *primers* de Foward (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3') e Reverse (5'-GTCAGGTCCACCACTGACAC-3') (CÁSSIA-PIRES et al, 2017). Em seguida, o DNA foi submetido à ensaios de PCR para detecção de agentes causadores das tripanossomíases transmitidos por insetos hematófagos. Utilizou-se dos *primers* D75 (5'-GCAGATCTTGGTTGGCGTAG-3') e D76 (5'-GGTTCTCTGTTGCCCTTTT-3') como marcadores de triagem, amplificando um fragmento de aproximadamente 300 pb, do 24S rDNAα (SOUTO et al., 1999) de Tripanossomatídeos. Para o preparado da reação utilizou-se tampão 1x, MgCl<sub>2</sub> 3mM, dNTP 0,2mM, *primers* 0,4pmol, Taq polimerase 1U (Invitrogen®), 2μL de DNA extraído e água ultrapura completando um volume final de 25μL. Em cada bateria de reação ao menos um controle positivo (DNA de *Trypanosoma rhipicephalis*, *Trypanosoma amblyommi* e/ou

*Trypanosoma cruzi* em cultura) e um controle negativo foi testado. A reação foi levada ao termociclador e submetida à temperatura de ativação da Enzima de 95°C por quatro minutos, seguido por 40 ciclos de denaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 57°C por um minuto; extensão a 72°C por um minuto e extensão final a 72°C por cinco minutos.

Para a revelação dos resultados aplicou-se 10 µL dos produtos amplificados em gel de agarose a 0,8% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) para a eletroforese em uma carga de 75V. Em seguida foram corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (L-PIX Sti, Loccus).

### **3 RESULTADOS**

Não foram detectados equinos positivos, ao exame de PCR, para tripanossomatídeos nas 225 amostras advindas de animais do Rio de Janeiro, 89 amostras do estado do Mato Grosso, 343 amostras do estado do Pará e 109 amostras do estado do Acre. Além disso, vale ressaltar que nenhuma das amostras analisadas tiveram relatos de surtos ou suspeitas de casos de tripanosomatídeos durante o momento da coleta.

## 4 DISCUSSÃO

O fato de nenhuma das amostras testadas amplificarem fragmento de DNA específico para a família Trypanosomatidae, corrobora com o fato de que, no momento das coletas das amostras, em nenhum dos locais estudados havia ocorrência de surtos de doenças causadas por tripanosomatídeos ou qualquer outra enfermidade, o que diminui chance de detecção. Pois a epizootiologia das tripanosomíases é caracterizada por uma alta incidência inicial de morbidade e mortalidade seguida pela redução na incidência da infecção e da severidade da doença. O mesmo padrão é observado localmente, quando um novo foco de infecção ocorre ou quando animais suscetíveis são introduzidos em uma área enzoótica (SILVA et al., 2002).

Vale destacar que 100% das amostras testadas do Estado do Pará são pertencentes à cidades localizadas na Ilha de Marajó. No Brasil, a tripanossomíase foi relatada pela primeira vez na Ilha de Marajó, em 1827, e foi observada posteriormente no Pantanal brasileiro em 1850 e Mato Grosso em 1860 (HOARE, 1972).

O que se sabe é que no Brasil, a tripanossomose é endêmica no estado de Mato Grosso na região do Pantanal (FRANKE et al., 1994; SILVA et al., 1995) devido às condições animais, climáticas e ambientais que acabam favorecendo a multiplicação dos vetores (SILVA, 1995). Surtos ou casos esporádicos de infecção por *T. evansi* terem sido relatados nas regiões norte, sul e sudeste (NUNES et al., 2012; RODRIGUES et al., 2005). Nestas localidades estudadas, as condições climáticas são semelhantes às da Argentina e do Uruguai, principalmente em regiões de limite geográfico (MORRONE, 2006) sendo que rebanhos de equinos estão susceptíveis às tripanossomíases pois estão próximos a cursos d'água, matas ciliares onde estão expostos aos tabanídeos (RODRIGUES et al., 2005).

As tripanossomoses animais, atualmente, representam perdas importantes nos rebanhos da África, Ásia e América Latina, porém a sua distribuição geográfica ainda está em expansão (DESQUESNES et al., 2013). A literatura carece de informações sobre a vetoração mecânica de *T. evansi* de mamíferos carnívoros e roedores para herbívoros, o que pode interferir diretamente na distribuição do agente ou no organismo de hospedeiros usuais. Além disso, alguns dados relatados sobre a clínica têm apontado a fuga do parasito do sistema imune do hospedeiro, o que dificulta dificultar sua detecção nos testes diagnósticos. Ainda, podem ter ação imunossupressora acarretando falha imunológica ou vacinal. A anaplasiose e babesiose são facilmente incriminadas como causadores do quadro clínico, uma vez que são diagnósticos diferenciais, o que também pode contribuir para baixa detecção da tripanossomíase em equinos no país (DESQUESNES et al., 2013). Nas investigações de Herrera et al. (2004) no Pantanal brasileiro, foram utilizadas várias técnicas diagnósticas na detecção de *T. evansi* em espécies de mamíferos domésticos e selvagens, sendo bem expressivo a prevalência, através do exame molecular em cerca de 73% das amostras de equinos. Em outras espécies, como bubalinos, bovinos, marsupiais e pequenos roedores, morcegos e tatus, esta técnica diagnóstica foi capaz de detectar baixas parasitemias.

No ano seguinte, Herrera et al., (2005) buscou determinar o status epizootico de animais silvestre e domésticos na região do pantanal brasileiro, numa técnica de PCR padronizada para detecção de *T. evansi*. Foram submetidas 274 amostras dos animais, onde as queixadas e os porcos selvagens, foram os mais frequentemente infectados, com uma taxa de 24,4% e 30,7%, respectivamente. Ambos os estudos podem sugerir outros mecanismos de transmissão bem como a presença de reservatórios do agente.

Assim, trabalhos realizados ainda no Pantanal, detectaram *T. evansi* em capivaras, exatamente



por conter uma grande variedade de biomassa, presença de espécies selvagens e abundância dos vetores tabanídeos (STEVENS et al., 1989). E em outras regiões brasileiras onde ocorreram surtos de *T. evansi* em equinos, observaram também a presença de capivara, sugerindo que elas possam ser reservatórios do parasita (DA SILVA et al., 2010; NUNES et al., 2012; RODRIGUES, 2005; ZANETTE, 2008).

Nos estudos de Costa et al. (2019) no nordeste do país, foram testadas amostras de sangue de 569 equídeos (528 cavalos, 8 mulas e 33 burros), na técnica de PCR, utilizando *primers* TBR1 e TBR2, desenvolvidos por Masiga et al. (1992), onde nenhuma amostra foi positiva para o agente *T. evansi*.

Em um trabalho de Marques et al. (2017), projeções baseadas em mudanças climáticas indicam alta adequabilidade destes tabanídeos vetores ao ambiente, sobretudo a espécie *Lepiselaga crassipes* (Fabricius, 1805) (Diptera, Tabanidae), na região amazônica brasileira e colombiana, se estendendo às áreas da Venezuela, Peru e Equador.

## **5 CONCLUSÕES**

Surtos e casos de outros Trypanossomatídeos são escassos na literatura quando trata-se de rebanho equino nacional, demonstrando a necessidade de mais estudos para entender a realidade da distribuição e riscos para os equídeos das diferentes espécies existentes no Brasil. Além disso, o diagnóstico das tripanossomoses em equinos parece ser dificultado pela inespecificidade de sinais clínicos da doença e parasitemia baixa, sendo um desafio mesmo com a utilização de técnicas sorológicas e moleculares.

## **CAPÍTULO II**

### **PESQUISA PARASITOLÓGICA, ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENÉTICA DE *Trypanosoma* SP. EM AMOSTRAS DE SANGUE DE BOVINOS DE PROPRIEDADES DE VASSOURAS/RJ**

## RESUMO

CARVALHO, Taís Medeiros Siqueira. **Pesquisa parasitológica, análise molecular e filogenética de *Trypanosoma* sp. em amostras de sangue de bovinos de propriedades de Vassouras, RJ.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

*Trypanosoma theileri* foi identificado pela primeira vez no estado Rio de Janeiro, em 1988. Entretanto, a caracterização molecular deste parasito em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro é recente. O presente estudo teve como objetivo identificar *Trypanosoma* spp. em 226 amostras de animais provenientes de 9 propriedades leiteiras do município de Vassouras, RJ. A metodologia baseou-se na determinação do hematócrito, confecção de esfregaços sanguíneos para exame parasitológico direto, além do exame molecular. Ao exame de cPCR, dois animais de mesma propriedade (identificados como animais 36 e 37) foram positivos para gênero *Trypanosoma* e apresentaram hematócrito 27% e 36%, respectivamente. A análise consiste na identificação do gene 18s do DNA ribossomal e a utilização dos primers 18STnF2 (5'-CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA-3') e 18STnR3 (5'-TGCTCGACCATATATTGCATATAC-3') e amplificação de um segmento gênico de aproximadamente 780 pb (GEYSEN et al., 2003). O sequenciamento genético destas amostras revelou tratar-se da espécie *Trypanosoma theileri* onde apresentaram 99,8% e 100% de similaridade com *Trypanosoma theileri* isolado Bb871 da Polônia. Além disso, foram submetidas a análise molecular para detecção de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. Os resultados foram que ambos apresentaram co-infecção: o primeiro com *A. marginale* e, o segundo com *A. marginale* e *B. bigemina*, respectivamente. Portanto, estudos de detecção molecular destes agentes podem revelar a circulação de *T. theileri*, mesmo quando animais são assintomáticos, bem como evidenciar a ocorrência de co-infecções corroborando com o que há na literatura sobre oportunismo deste agente frente a outros agentes etiológicos.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma theileri*, Co-infecção, Oportunismo

## ABSTRACT

CARVALHO, Taís Medeiros Siqueira. **Project “Parasitological research, molecular analysis and phylogenetic of *Trypanosoma* sp. in bovine blood samples from properties of Vassouras, RJ.”** 2022. Dissertation (Master Science in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, PPGCV. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.2022.

*Trypanosoma theileri* was identified for the first time in the state of Rio de Janeiro, in 1988. However, the molecular characterization of this parasite in different municipalities of the state of Rio de Janeiro is recent. The present study aimed to identify *Trypanosoma* sp. in 226 samples of animals from 9 dairy farms in the municipality of Vassouras, RJ. The methodology was based on the determination of hematocrit, preparation of blood smears for direct parasitological examination, in addition to molecular examination. At cPCR examination, two animals from the same property (identified as animals 36 and 37) were positive for the *Trypanosoma* genus and presented hematocrit of 27% and 36%, respectively. The analysis consists of the identification of the 18S gene of the ribosomal DNA and the use of primers 18STnF2 (5'-CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA-3') and 18STnR3 (5'-TGCTCGACCATATATTGCATATAC3') and amplification of a gene segment of approximately 780 bp (GEYSEN et al., 2003). The genetic sequencing of these samples revealed that they were the species *Trypanosoma theileri* where they presented 99.8% and 100% similarity with *Trypanosoma theileri* isolated Bb871 from Poland. In addition, they were subjected to molecular analysis for detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. The results were that both presented co-infection: the first with *A. marginale* and, the second with *A. marginale* and *B. bigemina*, respectively. Therefore, molecular detection studies of these agents can reveal the circulation of *T. theileri*, even when animals are asymptomatic, as well as evidence the occurrence of co-infections, corroborating what there is in the literature on opportunism of this agent against other etiological agents.

**Keywords:** *Trypanosoma theileri*, Co-infection, Opportunism

# 1 INTRODUÇÃO

*Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* é um protozoário flagelado, e foi descrito pela primeira vez em 1902 por Theiler, Laveran e Bruce (HOARE, 1972), sendo o maior tripanosoma presente em sangue de mamíferos, acometendo bovinos, búfalos e cervídeos, e transmitidos por Tabanídeos (LEE et al., 2010).

As formas epimastigotas e tripomastigotas podem ser encontradas na corrente sanguínea. Na forma tripomastigota, este agente apresenta cinetoplasto junto ao núcleo, e a multiplicação deste parasito na corrente sanguínea ocorre por fissão binária sob a forma epimastigota que é dificilmente encontrada. Além disso, sua prevalência pode variar de 10 a 90% de acordo com cada país (LEE et al., 2010).

A baixa patogenicidade de *T. theileri* em ruminantes saudáveis tem sido geralmente atribuída à baixa parasitemia. Entretanto, fatores como: animais imunocomprometidos, prenhes ou infectados com o vírus da leucose bovina, pode fazer com que *T. theileri* se propague no sangue e a parasitemia elevada causar doença clínica (MATUMOTO et al., 2011; SOOD et al., 2011). Ainda assim, já foram descritos anemia regenerativa, febre e perda de peso progressiva em casos clínicos esporádicos em animais domésticos de vários países como Espanha, Irlanda, Alemanha e Itália (DESQUESNES et al., 2001; SOOD et al., 2011).

Há descrição de *T. theileri* em todos os continentes inclusive na América do Sul com estudos realizados na Argentina, Colômbia, Uruguai e Brasil, entretanto uma maior prevalência vem sendo descrita esporadicamente em áreas tropicais e neotropicais (RODRIGUES et al., 2003; RODRIGUES et al., 2006).

A infecção por este agente em bovinos pode persistir por muitos anos sem efeitos nocivos reconhecidos. A maioria das infecções é subpatente e não pode ser demonstrada em esfregaços sanguíneos, mesmo utilizando o método do microhematócrito (RODRIGUES et al., 2003). Sendo assim, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma alternativa de diagnóstico direto que tem sensibilidade superior ao exame parasitológico (ZARLENGA; HIGGINS, 2001). A análise da sequência de DNA amplificado pela PCR permite a identificação genética, possibilitando a organização de novos tripanosomas dentro da árvore filogenética para que possam ser comparados a outras sequências, ajudando na taxonomia destes parasitos (ADAMS et al., 2010). O presente estudo teve por objetivo realizar o diagnóstico parasitológico e molecular de *Trypanosoma* spp., bem como identificar outros possíveis hematozoários através do exame de PCR e realizar análise filogenética do *Trypanosoma* sp. encontrado em amostras de sangue de bovinos do município de Vassouras, estado do Rio de Janeiro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Vassouras sob protocolo nº 044/2016 (anexo).

### 2.2 Amostragem

Para o estudo, 226 bovinos foram amostrados, distribuídos em nove propriedades leiteiras localizadas no município de Vassouras, estado do Rio de Janeiro, Brasil, foram selecionadas aleatoriamente.

Para avaliar o rebanho, o cálculo do tamanho mínimo da amostra foi calculado de acordo com a prevalência esperada (MEDRONHO, 2009), obtido através da fórmula de amostragem simples, onde se considerou uma prevalência esperada de 50%, conforme a seguir:

$$n = \frac{[z(\alpha/2)]^2 \pi (1-\pi)}{\varepsilon^2}$$

Onde:

n = Número amostral

$z(\alpha/2)$  = Valor-z de nível  $\alpha$  (para intervalo de confiança de 95%: 1,96)

$\pi$  = Prevalência esperada (0,50)

$\varepsilon$  = Erro esperado (0,07)

Desta forma, obteve-se um valor amostral mínimo de 196 animais, uma vez que não se tem estudos prévios no município de Vassouras, estado do Rio de Janeiro.

Os rebanhos do presente estudo eram constituídos por várias raças leiteiras (Gir, Girolando, Jersey e Mestiço) e com idades variando entre 60 dias a 13 anos. No período de novembro de 2017 a janeiro de 2019 ocorreram as visitas às propriedades.

Após a devida contenção física dos animais, o sangue total foi coletado da veia coccígea ou mamária com agulha 25 x 8mm em sistema Vacutainer® com tubos estéreis de 4 mL contendo o anticoagulante EDTA (ácido etileno diaminotetracético) à 10%. As amostras foram mantidas sob refrigeração em isopor hermeticamente fechado até chegar ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Vassouras. A partir do sangue em EDTA, uma alíquota foi utilizada para determinar o volume globular (microhematócrito), através de centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos e confecção de esfregaço sanguíneo, corados com Diff-Quick, e observados em microscopia na objetiva de imersão (1000X) para detecção direta de hemoparasitos. Outra alíquota de sangue total foi acondicionada em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, identificadas por numeração sequencial e mantidas a -80°C até o momento da extração do DNA total.

## 2.3 Análise Molecular

### 2.3.1 Extração de dna

A extração de DNA do sangue total foi realizada com kit de extração Promega, seguindo as recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi quantificado e armazenado em alíquotas de 100 uL em *freezer* a 20°C negativos para posterior análises moleculares.

### 2.3.2 Detecção molecular para *trypanosoma* spp.

As amostras de DNA de sangue bovino foram submetidas à amplificação do fragmento 18S do DNA ribossomal de *Trypanosoma* sp por PCR convencional com o objetivo de realizar uma triagem das amostras. As reações com alvo no 18S rDNA foram realizadas utilizando os iniciadores 18STnF2 (5'-CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA-3') e o iniciador reverso 18STnR3 (5'-TGCTCGACCATATATTGCATATAC-3'), que amplificam aproximadamente 780 pb (GEYSEN et al., 2003), com adaptações na concentração de dNTP, MgCl<sub>2</sub> e Taq, conforme descrito abaixo. O volume final da reação foi de 25 µL contendo: 13,5 µL de água ultrapura, 1X de tampão da enzima, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 0,8 µM de cada iniciador, 1,5U de Taq DNA polimerase e 5 µL de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: 94 °C por 4 min seguido por 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 58 ° por 1 min 30 s e 72 °C por 2 min, e extensão final a 72 °C por 4 min.

O controle positivo foi obtido de vacas com alta carga parasitária em esfregaços de sangue e confirmado por sequenciamento de DNA. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% a 100 V por 40 min e corados com brometo de etídio.

### 2.3.3 Detecção Molecular para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*

Nas amostras positivas para *Trypanosoma* sp., foi realizada pesquisa molecular de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* para verificar a existência de co-infecções nesses animais.

O diagnóstico molecular para *A. marginale* foi realizado usando a técnica de PCR semi-nested para o gene *msp5* padronizado por Torioni de Echaide et al., (1998). De acordo com o método de Terkawi et al., (2011), a nested PCR foi empregada para amplificar os fragmentos dos genes *sbp-4* e *rap-1a* de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Os *primers* usados para os agentes TPB, bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados, são apresentados no Quadro 2.



**Quadro 2.** Conjuntos de primers específicos para os genes *A. marginale* msp5, *B. bovis* sbp-4 e *B. bigemina* rap-1a usado para ensaios moleculares.

Genes	Ensaio	Iniciadores de oligonucleotídeos	Tamanho produto
<i>msp5</i>	PCR	5- GCATAGCCTCCGCGTCTTTC-3	457 bp
		5 –TCCTCGCCTTGGCCCTCAGA-3	
	snPCR	5 -TACACGTGCCCTACCGAGTTA-3	344 bp
		5 –TCCTCGCCTTGGCCCTCAGA-3	
<i>sbp-4</i>	PCR	5-AGTTGTTGGAGGAGGCTAAT-3	907 bp
		5 -TCCTTCTCGGCGTCCTTTTC-3	
	nPCR	5 -GAAATCCCTGTTCCAGAG-3	503 bp
		5 -TCGTTGATAACACTGCAA-3	
<i>rap-1a</i>	PCR	5-GAGTCTGCCAAATCCTTAC-3	879 bp
		5-TCCTCTACAGCTGCTTCG-3	
	nPCR	5-AGCTTGCTTTCACTCGCC-3	412 bp
		5-TTGGTGCTTTGACCGACGACAT-3	

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; snPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Semi-nested; nPCR: Reação em Cadeia da Polimerase aninhada; bp: pares de bases.

As condições de temperatura referentes as duas reações de nested PCR para *Anaplasma marginale* foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 5 minutos.

Foram incluídos para cada reação um controle positivo e dois controles negativos (água ultrapura, HyPure™ Molecular Biology). Os controles positivos foram obtidos de sangue de bovinos naturalmente infectados do município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. Os produtos de amplificação foram separados por gel de agarose a 1,5% a 100 V por 40 min, e corados com brometo de etídio.

### 2.3.4 Sequenciamento genético

Foi realizado o sequenciamento dos *amplicons* do gene 18S de *Trypanosoma* sp. O material para sequenciamento foi purificado a partir de 5µL do produto de PCR das amostras positivas, sendo tratados com Exo-Sap-IT (GE Healthcare®), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em ambas as direções em um analisador genético automatizado (ABI 3730 DNA Analyser, Thermo Fisher Scientific®) na Rede de Plataformas Tecnológicas – PDTIS/FIOCRUZ Plataforma de Sequenciamento de DNA – RPT01A. As sequências obtidas foram alinhadas através do programa DNA Baser® e submetidas a pesquisa de homologia com outras sequências depositadas no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLASTn.

### 3 RESULTADOS

No diagnóstico direto para *Trypanosoma* sp. não foi possível observar nenhuma forma tripomastigota em esfregaços sanguíneos. Entretanto, na técnica molecular com alvo no marcador molecular 18S *rDNA*, observou-se que 0,88% (2/226) das amostras foram positivas para *Trypanosoma* sp.

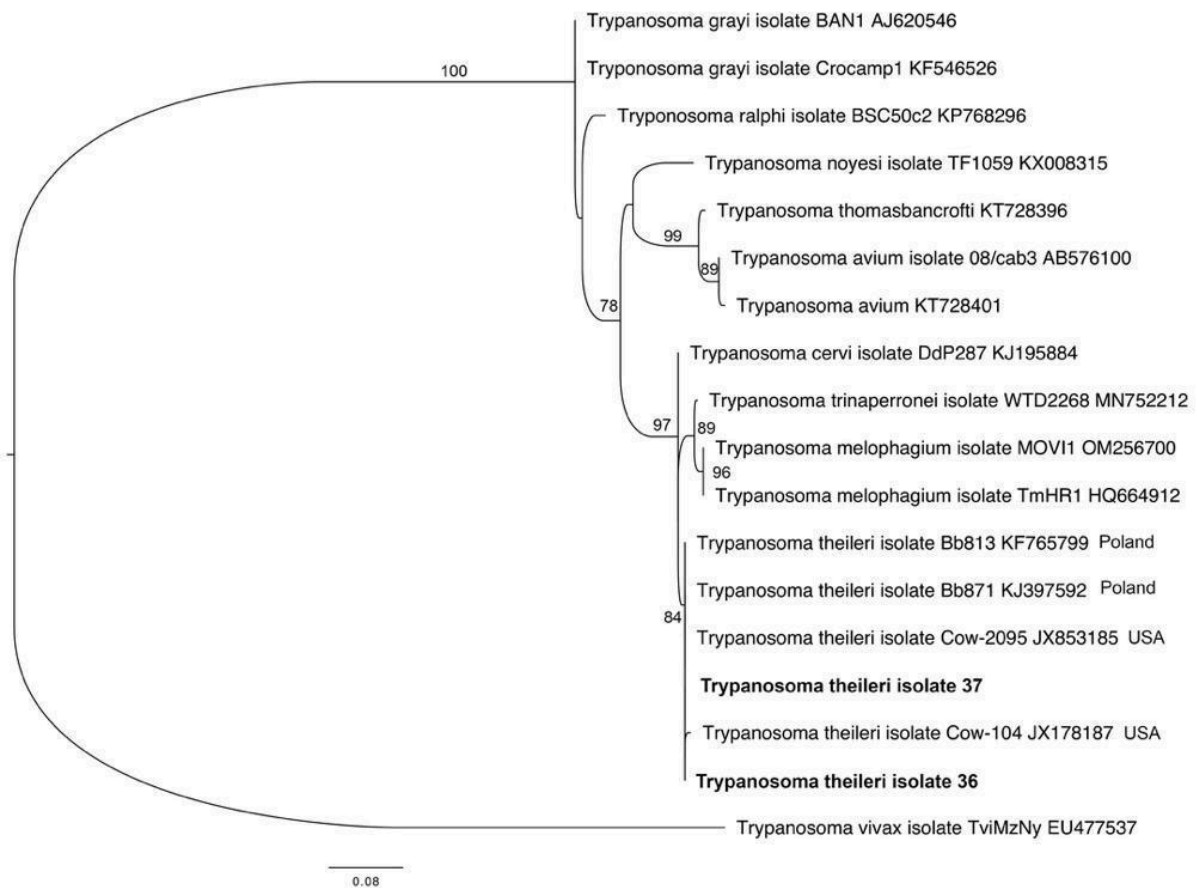
Nos animais positivos, pertencentes da mesma propriedade, o hematócrito foi de 27% e 36%, ou seja, não estavam anêmicos, conforme demonstrado na tabela 4. Alguns indivíduos do presente estudo apresentaram diferentes graus de anemia, segundo a análise de hematócrito, e foram negativos para os hematozoários testados (tabela em anexo I).

Foram feitas também análises moleculares para *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. Observou-se que ambos animais positivos para *Trypanosoma* sp. tinham coinfeção com *A. marginale* e um deles ainda havia com *B. bigemina*. (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados e análises moleculares dos animais positivos para *Trypanosoma* sp.

Identificação animal	Idade	Sexo	Raça	Ht(%)	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.
36	6 anos	F	Mestiço	36	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
37	4 anos	F	Mestiço	27	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

No sequenciamento do gene 18S, as amostras 36 e 37 apresentaram 99,8% e 100% de similaridade com *Trypanosoma theileri* isolado Bb871 da Polônia, respectivamente. Na análise filogenética de *T. theileri* com base no marcador 18S *rDNA*, observamos que os 2 isolados deste estudo estão agrupados juntamente com isolados de diferentes países no mundo disponíveis na base de dados GenBank (USA e Polônia), representados na Figura 2.



**Figura 2.** Dendrograma baseado nas sequências do gene 18S rDNA de *Trypanosoma theileri* do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

## 4 DISCUSSÃO

*Trypanosoma theileri* foi identificado pela primeira vez no estado Rio de Janeiro em estudos desenvolvidos por Gonçalves et al., (1998). Entretanto, a caracterização molecular deste parasito em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro foi recentemente, reforçando assim, a presença deste hemoparasito no rebanho bovino (ABREU, 2020).

No estudo desenvolvido por Abreu (2020), amostras foram coletadas em 15 municípios do estado do Rio de Janeiro com suspeita clínica de surto por Tripanossomose bovina, no entanto, o município de Vassouras, RJ não era pertencente. Sendo assim, em decorrência da proximidade dos municípios da região e levando em consideração a possibilidade de trânsito de animais, este estudo foi importante para avaliar a prevalência de *Trypanosoma* no rebanho de bovinos do município de Vassouras, RJ, uma vez que uma propriedade do município tinha apresentado surto para tripanossomose bovina (COSTA et al., 2020).

No presente estudo, a técnica de esfregaço sanguíneo teve baixa sensibilidade para *Trypanosoma theileri*, corroborando com Griebel et al. (1989), onde relatam que *T. theileri* raramente é detectado no exame microscópico dos esfregaços corados de sangue periférico. Mossad et al. (2019) e De Gier et al. (2020), relatam que a biologia molecular apresenta alta sensibilidade e especificidade em casos de baixa parasitemia como ocorre por *T. theileri*, o que vai de acordo com o presente estudo, onde esta técnica se mostrou importante no diagnóstico da tripanossomose bovina.

A prevalência de *T. theileri* no presente estudo foi inferior ao relatado por Abreu (2020), que encontrou 3,6% para este hemoparasito. No entanto, ambos estudos não corroboram com Lee et al., (2010) que esperam uma prevalência variando de 10 a 90% para o agente em questão. A baixa prevalência pode estar relacionada a ausência de vetores biológicos – apesar de haver relatos de detecção deste agente em carrapatos (MORZARIA et al., 1986; LATIF et al., 2004; MARTINS et al., 2008; BURGDORFER et al., 1973) – e à baixa endemicidade do agente no estado do Rio de Janeiro (ABREU, 2020). No México, a prevalência para este parasito foi de 26,6% (FLORES, 2021); No Sri Lanka de 7,6% (YOKOYAMA et al., 2014); Pacheco et al. (2014) analisando sangue de bovinos da região amazônica ocidental do Brasil, encontraram um percentual de 42,9% entre os rebanhos.

Os dois animais positivos para *T. theileri* não apresentavam sinais clínicos e não estavam anêmicos, o que vai de encontro com Greco et al. (2000) que descrevem que este agente está comumente associado a leve ou nenhum sinal clínico, acreditando ser de baixa patogenicidade. Entretanto a doença já foi relatada em um bezerro, uma vaca com histórico de aborto e diarreia e em uma vaca leiteira com anemia regenerativa grave (DOHERTY et al., 1993; WARD et al., 1984 e LEVINE et al., 1953). Ainda assim, no presente estudo, um animal estava positivo para *Anaplasma marginale* e o outro positivo para *Anaplasma marginale* e *Babesia bigemina*, onde a imunossupressão é uma das possíveis explicações para a ocorrência de mais de uma doença, conforme relatado por Paiva et al. (2000).

Alguns indivíduos do presente estudo apresentaram diferentes graus de anemia, segundo a análise de hematócrito, e foram negativos para os hematozoários testados, uma vez que esta alteração hematológica não é específica, podendo estar relacionada à doença primária ou secundária, à ingestão de substâncias tóxicas, medicamentosas ou ainda provocadas por outros agentes biológicos (DAY, 2000).

A análise filogenética baseada no marcador molecular *18S rDNA* de amostras de *T. theileri* do

município de Vassouras, RJ (Figura 1) mostraram que todas as sequências estavam enquadradas no Clado A, indo de acordo com estudo de Abreu (2020), onde as sequências utilizando o marcador molecular *18S rDNA* estavam no Clado A. Isto possivelmente se deve ao *18S rDNA* ser altamente conservado, com regiões hipervariáveis e com pouca diversidade genética, mas o suficiente para caracterizar geneticamente os organismos (ADAMS et al., 2010; FIKRU et al., 2016).

## 5 CONCLUSÕES

Os bovinos positivos no exame molecular para *Trypanosoma theileri*, apesar de não apresentarem anemia no exame de microhematócrito, foram positivos para um ou mais hematozoários, indicando o caráter oportunista daquele agente. Outros animais testados, apesar da anemia, não foram positivos para nenhum dos agentes supracitados, explicitando assim que existem outros fatores que cursam com este quadro.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de escassos relatos relacionados às doenças causadas por *Trypanosoma* no plantel de equinos brasileiros, existem trabalhos que apontam a potencialidade de dispersão de tripanossomíases por características inerentes ao parasito e sua relação com hospedeiros intermediários, definitivos e o meio ambiente.

Estudos projetivos, com embasamento científico revelam o impacto das mudanças climáticas na expansão e distribuição de vetores destes protozoários.

A detecção molecular de *T. theileri*, mesmo quando animais são portadores assintomáticos, podem evidenciar a circulação deste parasito no rebanho, bem como identificar co-infecções deste protozoário com outros agentes infecciosos, reforçando seu comportamento oportunista antes já descrito por outros pesquisadores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, Ana Paula Martinez de. Caracterização molecular e avaliação bioquímica de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* no estado do Rio de Janeiro baseado nos genes 18S rDNA e Cathepsina L-like. 2020. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.
- ADAMS, E. R.; HAMILTON, P.B.; GIBSON, W.C. African trypanosomes: celebrating diversity. **Trends Parasitol.**, v. 26, n. 7, p.324-8. 2010.
- AQUINO, L.P.C.T. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 255-260, 1999.
- BARBOSA, S.O. Ausência de anticorpos em equídeos expostos a rebanhos bovinos infectados por *Trypanosoma vivax*. 2021. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 2021, 37p.
- BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M.M.G.; MADRUGA, C.R.; SIMÕES, S.V.D.; MAIA, F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet. Parasitol.**, 143:174-181. 2007.
- BOWNMAN, D. D. **Georgis – Parasitologia Veterinária**. 9º Edição. Rio de Janeiro. Elsevier, 2010, 8p.
- BRUM, I.; DA SILVA, A.S.; OLIVEIRA, C.B.; BASTIANI, F.T.; ROSA, L.D.; MONTEIRO, S.G. *Trypanosoma theileri* in cattle herd of Rio Grande do Sul State, Brazil. **Comp Clin Pathol**. 2012;21:197-199.
- CALZOLARI, M.; RUGNA, G.; CLEMENTI, E.; CARRA, E.; PINNA, M.; BERGAMINI, F. et al. Isolation of a trypanosome related to *Trypanosoma theileri* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) from *Phlebotomus perfliewi* (Diptera: Psychodidae). **Biomed Res Int**. 2018;2018:2597074.
- CONNOR, R.J.; VAN DEN BOOSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Eds.). **Infectious diseases of livestock**. 2nd ed. South Africa: Oxford University Press, 2004. v. 1. cap. 12, p. 251-296.
- CONNOR, R.J.; BOSSCHE, V.D. African animal trypanosomoses. pag. 251-296. In: COSTA, R. V., ABREU, A. P. M., THOMÉ, S. M., MASSARD, C. L., SANTOS, H. A., UBIALI, D. G., & BRITO, M. F. (2020). 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**, 22, 100466.
- CORTEZ, A.P., VENTURA, R.M., RODRIGUES, A.C., BATISTA, J.S., PAIVA, F., ANES, F., MACHADO, R.Z., GIBSON, W.C., TEIXEIRA, M.M. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitol.**, 133: 159-169.2006.
- COSTA, S.C.L.; FREITAS, J.S.; SILVA, A. N.; LACERDA, L.C; CRUZ, R.D.S.; CARVALHO, F.S.; PEREIRA, M.J.S.; MUNHOZ, A.D. Frequency and factors associated with *Theileria equi*,



*Babesia caballi* and *Trypanosoma evansi* in equids from Bahia (Northeast Brazil) / Frequência e fatores associados a *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Trypanosoma evansi* em equídeos da Bahia (Nordeste do Brasil) **Rev. bras. parasitol. vet** ; 28(1): 47-58, Jan.-Mar. 2019.

DA SILVA, A.S. Tripanossomose em equinos na região sul do Brasil [Trypanosomosis in equines in southern Brazil]. **Acta Sci Vet** v.38, p.113–120, 2010.

DA SILVA, F.M.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R.; AÑEZ, N.; SHAW, J.J.; STEVENS, J.R.; TEIXEIRA, M.M. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**. v. 129, n. 5, p.549-561, 2004.

DÁVILA, A.M.R. et al. The soroprevalence of equine trypanosomiasis in the Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 199-202, 1999.

DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A.M.S. Animal trypanosomiasis in South America. Current Status, Partnership, and Information Technology. **Annual New York Academy of Science**, v. 916, p. 199-212, 2000.

DAY, M.J. 2000. Immune-mediated hemolytic anemia, p.799-806. In: Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain N.C. (ed.) **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1344p.

DE GIER, J., CECCHI, G., PAONE, M., DEDE, P.E., ZHAO, W. The continental Atlas of tsetse and African animal trypanosomosis in Nigeria. **Acta Tropica**, 105328. 2020. doi: 10.1016 / j.actatropica.2020.105328.

DESQUESNES M, MCLAUGHLIN G, ZOUNGRANA A, et al. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. **Int J Parasitol** 2001; 31(5-6): 610-614

DESQUESNES, M.; HOLZMULLER, P.; LAI, D.H.; DARGANTES, A.; LUN, Z.R.; JITTAPLAPONG, S. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **Biomed Res Int**. 2013;2013:194176. doi: 10.1155/2013/194176. Epub 2013 Aug 19. PMID: 24024184; PMCID: PMC3760267.

DOHERTY, M.L., H. WINDLE, H.P. VOORHEIS, et al. 1993. Clinical disease associated with *Trypanosoma theileri* infection in a calf in Ireland. **Vet. Rec.** 132: 653–656.

FLORES, E, J. C. Identificación molecular de *Trypanosoma theileri* en bovinos de la parroquia de Limoncocha, Ecuador. 2021. Dissertação de Mestrado - Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador, 2021.

FRANKE, C.R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). **Acta Trop** v. 58, n.2, p. 159-169, 1994.

FISHER, A.C.; G. SCHUSTER, G; COBB, W. J. et al. Molecular characterization of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) spp. infecting cattle (*Bos taurus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and elk (*Cervus elaphus canadensis*) in the United States,” **Veterinary Parasitology**, vol. 197, no. 1-2, pp. 29–42, 2013.

- FIKRU, R., MATETOVICI, I., ROGÉ, S., MERGA, B., GODDEERIS, B.M., BÜSCHER, P., VAN REET, N. Ribosomal DNA analysis of tsetse and non-tsetse transmitted Ethiopian *Trypanosoma vivax* strains in view of improved molecular diagnosis. **Vet Parasitol.** v. 15, n.220, p.15-22, 2016.
- GARCIA, H.A.; BLANCO, P.A.; RODRIGUES, A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; TAKATA, C.S.A.; CAMPANER, M. et al. Pan-American *Trypanosoma (Megatrypanum) trinaperronei* n. sp. in the white-tailed deer *Odocoileus virginianus* Zimmermann and its deer ked *Lipoptena mazamae* Rondani, 1878: morphological, developmental and phylogeographical characterisation. **Parasit Vectors.** 2020;13:308.
- GARCIA, H.A., RODRIGUES, A.C., MARTINKOVIC, F., MINERVINO, A.H., CAMPANER, M., NUNES, V.L., PAIVA, F., HAMILTON, P.B., TEIXEIRA, M.M. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma (Megatrypanum)* genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. **Int. J. Parasitol.**, 41(13-14): 1385-96. Nov, 2011.
- GEYSEN, D., DELESPAUX, V., GEERTS, S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. **Vet. Parasitol.**, 110, 171–180. 2003.
- GONÇALVES, T.C., DE OLIVEIRA, E., DIAS, L.S., ALMEIDA, M.D., NOGUEIRA, W.O., PIRES, F.D. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 93(6):711-7. Nov-Dec, 1998.
- GUERRA, N. R.; MONTEIRO M.F.M.; SANDES H.M.M.; CRUZ N.L.N.; RAMOS C.A.N.; SANTANA V.L.A.; SOUZA M.M.A.; ALVES L.C. Detecção de anticorpos IgG anti *Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de Imunofluorescência indireta. **Pesq. Vet. Bras.** 33 (12): 1423-1426. 2013.
- GRECO, A., G.R. LORIA, S. DARA, et al. 2000. First isolation of *Trypanosoma theileri* in Sicilian cattle. **Vet. Res. Comm.** 24: 471–475
- GRECO, A.; LORIA, G.R.; DARA, S.; LUCKINS, T.; SPARAGANO, O. First isolation of *Trypanosoma theileri* in Sicilian cattle. **Vet Res Commun.** 2000;24:471–5 GERMANO, P. H. V. et al. Tripanossomose bovina: revisão. **PubVet Medicina Veterinária e Zootecnia**, Maringá, v. 12, n. 8, p. 1-6, 2018.
- GRIEBEL, P. J., GAJADHAR, A. A., BABIUK, L. A. AND ALLEN, J. R. 1989. *Trypanosoma theileri* associated with T-lymphocytes isolated from a latently infected cow. **J. Protozool.** 36: 415–421
- HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 37-49, 1998.
- HAJIHASSANI, A.; MAROUFI, S.; ESMAEILNEJAD, B.; KHORRAM, H.; TAVASSOLI, M.; DALIR-NAGHADEH, B.; SAMIEI, A. Hemolytic anemia associated with *Trypanosoma theileri* in a cow from Kurdistan province, West of Iran. **Vet Res Forum.** 2020;11(2):191-193. DOI: 10.30466/vrf.2019.103834.2465
- HAMILTON, P.B.; ADAMS, E.R.; NJIOKOU, F.; GIBSON, W.C.; CUNY, G.; HERDER, S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial

mammals. **Infect Genet Evol.** 2009;9:81–6.

HOARE, C.A. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes X. Revision of the systematics. **J Protozool.** 1964;11:200–207.

HOARE, C.A. The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph. Oxford, UK: **Blackwell Scientific Publications**; 1972.

HOARE, C.A.; WALLACE, F.G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*. 1966;212:1385-6. HERRERA, H.M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 263-275, 2004.

HUNT, Richard. PARASITOLOGIA - CAPÍTULO TRÊS. PARASITOLOGIA MOLECULAR: TRIPANOSSOMAS CÉLULAS EUCARIÓTICAS COM UM JEITO DIFERENTE DE FAZER AS COISAS. 2017. Disponível em: <<https://www.microbiologybook.org/>> e acesso em 15 de julho de 2022.

KINGSTON, N.; BOBE, B.; PERZANOWSKI, K.; WITA, I.; MAKI, L. Description of *Trypanosoma (Megatrypanum) stefanskii* sp. N. from roe deer (*Capreolus capreolus*) in Poland. **J Helminthol Soc Wash.** 1992;59:89–95.

LATIF, A.A.; BAKHEIT, M.A.; MOHAMED, A.E.; ZWEYGARTH, E. High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*. Onderstepoort **J Vet Res.** 2004;71:251–6.

LEE, Y.F., CHENG, C.C., LIN, N.N., LIU, S.A., TUNG, K.C., CHIU, Y.T. Isolation of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* from dairy cattle in Taiwan. **J. Vet. Med.Sci.**, 72(4):.417-24. Apr. 2010.

LEVINE, N.D.; WATRACH, A.M.; KANTOR, S.; HARDENBROOK, H.J. A case of bovine trypanosomiasis due to *Trypanosoma theileri* in Illinois. **J Parasitol.** 1956;42:553.

LEVINE, N.D. Protozoan parasites of Domestic Animals and of Man. 2nd ed. **Minneapolis: Burgess Publishing Company**, 1973. 406p.

LOSOS, G.J.; IKEDE, B.D. Review of pathology of diseases of domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **Veterinary Pathology**, v. 9 (Suppl.), p. 1-71, 1972.

LUCKINS, A.G. et al. Dourine. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. (Eds.). Infectious diseases of livestock. 2nd ed. **South Africa: Oxford University Press**, 2004. v.1. cap. 13, p. 297-304.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO F.R.; LIMA JUNIOR M.S.C.; MELO E.S.P. Comparação de métodos de extração do DNA e avaliação de reações da polimerase em cadeia (PCR) para o diagnóstico de *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. **Circular técnica** 34. Embrapa. Campo Grande, MS. 2006.

MADRID, D. M. C. Avaliação da ultraestrutura e ação de desinfetantes em *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905). 2017. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia 2017.

MANUAL MSD, Ciclo de vida do *Trypanosoma* 2022. Disponível em: <<https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/multimedia/image/ciclo-de-vida-do-trypanosoma->>. 21 de maio de 2022.

MANUAL MSD, Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei gambiense* 2022. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/ciclo-de-vida-do-trypanosoma-brucei-gambiense->>. Acesso em: 21 de maio de 2022. COLPO, C.B. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 717-719, 2005.

MARQUES, R.; MELLO, D.M.C.A.; VICENZI, N.; KROLOW, T.K.; KRUGER, R.F. O aquecimento global irá alterar a distribuição geográfica de *Lepiselaga crassipes* (Diptera: Tabanidae), vetor de tripanossomíases em equinos, na região neotropical? **Oecologia Australis** 2017. 21(1):27-41. DOI: 10.4257/oeco.2017.2101.03.

MARTINS, J.R.; LEITE, R.C.; DOYLE, R.L. Tripanosomatídeos like *Trypanosoma theileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Rev Bras Parasitol Vet.** 2008;17:113–4.

MASAKE, R. A.; MAJIWA, P. A.; MOLOO, S. K.; MAKAU, J. M.; NJUGUNA, J. T.; MAINA, M.; KABATA, J.; OLE-MOIYOI, O. K.; NANTULYA, V. M. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, New York, 85: 193-205. 1997.

MATSUMOTO, Y.; SATO, A.; HOZUMI, M.; OHNISHI, H.; KABEYA, M.; SUGAWARA, M. et al. A case of a Japanese black cow developing trypanosomosis together with enzootic bovine leukosis. **J Jpn Vet Med Assoc.** 2011;64:941–5.

MATTHEWS, K.R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.* 2005;118:283-90.doi:10.1242/jcs.01649.

MATUMOTO, Y.; SATO, A.; HOZUMI, M et al (2011) A case of a Japanese black cow developing trypanosomosis together with enzootic bovine leukosis. **J Jpn Vet Med Assoc** 64:941–945.

MERZLYAK, E.; YURCHENKO, V.; KOLESNIKOV, A.; ALEXANDROV, K.; PODLIPAEV, S.; MASLOV, D. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. **J Eukaryot Microbiol.** 2001;48:161-9.

Ministério da Agricultura do Brasil. 2016. Equídeos. Retirado 01 de Maio, 2016 de <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equídeos>

MORRONE, J. J. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeographic and cladistics analyses of the entomofauna. **Annual Review of Entomology**, 51(1), 467-494. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130447.

MORZARIA, S.P.; LATIF, A.A.; JONGEJAN, F.; WALKER, A.R. Transmission of a *Trypanosoma* sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Vet Parasitol.** 1986;19:13–21.

MOSSAD, E., HAKEEM, M., AHMED, M. E., EI, E., & SATTY, R. (2019). A seroprevalence of *Trypanosoma evansi* infection in dairy cattle in Khartoum State, Sudan, using the card agglutination test for *Trypanosoma evansi*-CATT/*T. evansi*.

NUNES, V.L.B.; DA SILVA, R.P.; TAKEDA, G.K.F.; ESPINDOLA, M.A.; CAVALHEIROS, M.E.M. Ocorrência de tripanossomos em bovinos na região de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Nota Prévia. Rev Fac Med Vet Zootec.* 1983;20(2):183. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.23183659.v20i2p183>

NUNES, J.T.S.; SILVA, A.S.; DORNELES, F.S.D.; TONIN, A.A.; LAZZAROTTO, C.; MILETTI, L.C. et al. Occurrence of *Trypanosoma evansi* in Horses in the State of Minas Gerais, Brazil. **J Equine Vet Sci** 2012; 32(4): 205-207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2011.08.023>.

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

OSÓRIO A.L.A.R.; MADRUGA C.R.; DESQUENES M.; SOARES C.O.; RIBEIRO L.R.R.; DA COSTA S.C.G. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, Pathogenesis, and introduction in the New World - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 103 (1): 1-13. 2008.

PACHECO, T.D.A., MARCILI, A., COSTA, A.P.D., WITTER, R., MELO, A.L.T., BOAS, R.V., CHITARRA, C.S., DUTRA, V., NAKAZATO, L., PACHECO, R.C. Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in cattle in Brasil's western Amazon region. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 27(4): 579-583. Oct-Dec, 2018.

PAIVA, F., LEMOS, R. D., NAKAZATO, L., MORI, A. E., BRUM, K. B., & BERNARDO, K. C. (2000). *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: I.-Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Rev Bras Parasitol Vet**, 9(2), 135-141.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3. ed. São Paulo: Fernovi Editora, v. 1, 2007.

RODRIGUES, A.C., CAMPANERA, M., TAKATA, C.S.A., DELL' PORTO, A., MILDNER, 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 sequence. **Veterinary Parasitology**, 116:185–207. 2003.

RODRIGUES, A.; FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SCHILD, A.L.; SOARES, M.P.; MILANO, J. et al. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesq Vet Bras** 2005; 25(4): 239-249. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2005000400010>.

RODRIGUES, A.C., PAIVA, F., CAMPANER, M., STEVENS, J.R., NOYES, H.A., TEIXEIRA, M.M.G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, 132: 215–224, 2006.

RODRIGUES, A.C., NEVES, L., GARCIA, H.A., VIOLA, L.B., MARCILI, A., DASILVA, F.M., SIGAUQUE, I., BATISTA, J.S., PAIVA, F., TEIXEIRA, M.M. Phylogenetic analysis 69 of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Moçambique. **Parasitology**, 135(11): 1317-28. Sep 2008.

RODRIGUES, A.C.; GARCIA, H.Á.; ORTIZ, P.A. et al. Cysteine proteases of *Trypanosoma theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. **Parasitology International**, v. 59, n. 3, p. 318-325, 2010.

- ROQUE, A.L.R.; JASEN, A.M. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: Galvão C, organizador. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014. p. 75-87.
- ROSYADI, I; SETSUDA, A.; ELIAKUNDA, M.; TAKANO, A.; MAEDA, K.; SAITO-ITO, A, et al. Genetic diversity of cervid *Trypanosoma theileri* in Honshu sika deer (*Cervus nippon*) in Japan. **Parasitology**. 2021;148:1636–47.
- SAJID, M., MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol. Biochem. **Parasitol.**, 120(1):1-21. Mar. 2002. Review.
- SAMPAIO, P. H. Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados pelo *Trypanosoma vivax*. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.
- SEIFI, H.A. Clinical trypanosomosis due to *Trypanosoma theileri* in a cow in Iran. **Trop Anim Health Prod**. 1995;27:93–4.
- SILVA, R. A. M. S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.
- SILVA, R.A.; AROSEMENA, N.A.; HERRERA, H.M.; SAHIB, C.A.; FERREIRA, M.S. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 60, p. 167-171, 1995a
- SILVA, R.A.M.S.; HERRERA, H.M.; DOMINGOS, L.B.S.; XIMENES, F.A.; DÁVILA, A.M.R. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and horses: hematological and clinical aspects. **Cienc Rural**. v. 25, n. 2, p. 233-238, 1995b
- SILVA, R.A.M.S. et al. Hematology of natural bovine trypanosomiasis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p. 87-93, 1999.
- SOOD NK, SINGLA LD, SINGH RS, et al. Association of *Trypanosoma theileri* with peritonitis in a pregnant cross-bred cow: A case report. **Vet Med** 2011; 56(2): 82-84.
- SOUZA, W.; VIDAL, J. **Taxonomia Morfológica**. Portal da Doenças de Chagas, 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/parasita/taxonomia/>>. Acesso em: 20 de maio de 2022.
- SUGANUMA, K.; KONDOH, D.; SIVAKUMAR, T.; MIZUSHIMA, D.; ELATA, A.T.M.; THEKISOE, O.M.M. et al. Molecular characterization of a new *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle. **Parasitol Res**. 2019;118:1927–1935. Jun. 2019.
- SUGANUMA, K.; KAYANO, M.; KIDA, K.; GROHN, Y.T.; MIURA, R.; OHARI, Y. et al. Genetic and seasonal variations of *Trypanosoma theileri* and the association of *Trypanosoma theileri* infection with dairy cattle productivity in Northern Japan. **Parasitol Int**. 2022;86:102476.
- SCHENK, M.A.M., MENDONÇA, C.L., MADRUGA, C.R., KOHAYAGAWA, A., ARAÚJO, F. R. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesq. Vet. Bras**. 21 (4): 157-161, 2001.
- STEVENS, J.R. Isoenzyme characterization of *Trypanosoma evansi* isolated from capybaras and dogs in Brazil. **Acta Trop** 1989;46:213–222.

- SCHOENER, E.; UEBLEIS, S.S.; CUK, C.; NAWRATIL, M.; OBWALLER, A.G.; ZECHMEISTER, T. et al. Trypanosomatid parasites in Austrian mosquitoes. **PLoS ONE**. 2018;13:e0196052.
- SVOBODOVÁ, M.; ZÍDKOVÁ, L.; CEPICKA, I.; OBORNÍK, M.; LUKEŠ, J.; VOTÝPKA, J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **Int J Syst Evol Microbiol**. 2007;57(2):423-32.
- TERKAWI, M.A.; HUYEN, N.X.; SHINUO, C.; INPANKAEW, T.; MAKLON, K.; ABOULAILA, M. et al. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. **Vet Parasitol** 2011; 178(3-4): 201-207.
- TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; MCELWAIN, T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **J Clin Microbiol** 1998; 36(3): 777-782.
- VENTURA, R. M. et al. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the Spliced-Leader Gene of a Brazilian Stock and Species-Specific Detection by PCR Amplification of an Intergenic Spacer Sequence. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 99, n. 1, p. 37-48, 2001.
- VICKERMAN, K. P. The diversity of the Kinetoplastid flagellates. In: Lumsden, W. H.R., Evans, D. A. Biology of the Kinetoplastida. **New York Academic Press**, p. 1-34, 1976.
- VILLA, A.; GUTIERREZ, C.; GRACIA, E.; MORENO, B.; CHACON, G.; SANZ, P.V. et al. Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish cattle. **Ann N Y Acad Sci**. 2008;1149:352-4.
- VOTÝPKA, J.; RÁDROVÁ, J.; SKALICKÝ, T.; JIRKŮ, M.; JIRSOVÁ, D.; MIHALCA, A.D. et al. A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*. **Int J Parasitol**. 2015;45:741-8.
- WALLACE, F.G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Exp Parasitol**. 1966;18:124-93.
- WALLACE, F.G.; CAMARGO, E.P.; MCGHEE, R.B.; ROITMAN, I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. **J Protozool**. 1983;30:308-13.
- WARD, W.H., M.W. HILL, I.D MAZLIN, et al. 1984. Anaemia associated with a high parasitaemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow. **Aust. Vet. J.** 61: 324.
- YOKOYAMA, N., SIVAKUMAR, T., FUKUSHI, S., TATTIYAPONG, M., TUVSHINTULGA, B., KOTHALAWALA, H., SILVA, S. S., IGARASHI, I., & INOUE, N. (2015). Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. **Veterinary parasitology**, 207(3-4), 335-341. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.006>
- ZANETTE, RA. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em equinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil [Occurrence of *Trypanosoma evansi* in equines in Cruz Alta, RS, Brazil]. **Cienc Rural** 2008;38:1468-1471. Portuguese.
- ZARLENGA, D. S., HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary parasitology**, 101: 215-230. 2001.

## ANEXOS

Dados como idade, sexo, raça, hematócrito e PCR dos animais utilizados no estudo de pesquisa de *Trypanosoma* sp em bovinos do município de Vassouras.

Identificação	Nome do animal	Idade	Sexo	Raça	Ht (%)	PCR <i>Trypanosoma</i> sp
1	Colatina	6 anos	F	Girolando	28%	Negativo
2	Bezerro Colatina	3 meses	M	Giro/Nelore	27%	Negativo
3	Andorinha	4 anos	F	Girolando	30%	Negativo
4	Bezerro Andorinha	9 meses	M	Giro/Bramman	28%	Negativo
5	Chumbada	5 anos	F	Girolando	36%	Negativo
6	Bezerro Chumbada	2 meses	M	Giro/Nelore	25%	Negativo
7	Morena	6 anos	F	Giro/Nelore	30%	Negativo
8	Bezerro Morena	2 meses	M	Giro/Nelore	38%	Negativo
9	Roxinha	4 anos	F	Girolando	30%	Negativo
10	bezerro Roxinha	10 meses	F	Girolando	30%	Negativo
11	Fortaleza	7 anos	F	GIR	28%	Negativo
12	Bezerro Fortaleza	8 meses	M	GIR/Nelore	32%	Negativo
13	Boneca	3 anos	F	GIR	29%	Negativo
14	Bezerro Boneca	1 mês	M	GIR/Nelore	29%	Negativo
15	Mascarada	3 anos	F	Giro/Holandês	29%	Negativo
16	Bezerro Mascarada	7 dias	M	1/2 sangue/Nelore	29%	Negativo
17	Chalana	4 anos	F	Girolando	26%	Negativo
18	Bezerro estrelinha	45 dias	M	Giro/Nelore	31%	Negativo
19	Bezerro Mascarada	45 dias	M	Giro/Nelore	34%	Negativo
20	Um animal	6 anos	F	Mestiço	28%	Negativo
21	5	6 anos	F	Mestiço	28%	Negativo
22	4	6 anos	F	Mestiço	28%	Negativo
23	3	6 anos	F	Mestiço	35%	Negativo
24	2	6 anos	F	Mestiço	27%	Negativo
25	1	6 anos	F	Mestiço	37%	Negativo
26	Garrote 07	2 anos	M	Mestiço	36%	Negativo
27	Garrote 08	2 anos	M	Mestiço	19%	Negativo
28	Garrote 09	2 anos	M	Mestiço	35%	Negativo
29	Touro Brahman	3 anos	M	Mestiço	43%	Negativo
30	Mascarada	3 anos	F	Mestiço	29%	Negativo
31	Cigana	4 anos	F	Mestiço	27%	Negativo
32	Mascarada	3 anos	F	Mestiço	23%	Negativo
33	Jumbada	6 anos	F	Mestiço	43%	Negativo
34	Vovo	10 anos	F	Mestiço	27%	Negativo
35	Laranja	5 anos	F	Mestiço	26%	Negativo
36	Orelha	6 anos	F	Mestiço	36%	Positivo
37	Lindoia 1	4 anos	F	Mestiço	27%	Positivo
38	Lindoia 2	3 anos	F	Mestiço	24%	Negativo
39	Castanha	6 anos	F	Mestiço	25%	Negativo
40	Princesa	4 anos	F	Mestiço	24%	Negativo
41	Tranquila	3 anos	F	Mestiço	28%	Negativo
42	Xumbada 2	5 anos	F	Mestiço	33%	Negativo
43	Fumaça	7 anos	F	Mestiço	32%	Negativo
44	Orelha	5 anos	F	Mestiço	29%	Negativo
45	Ladrona	5 anos	F	Mestiço	32%	Negativo



46	Cachoeira	2 anos	F	Mestiço	25%	Negativo
47	Castanha	2 anos	F	Mestiço	28%	Negativo
48	Estrelinha	3 anos	F	Mestiço	23%	Negativo
49	Betania	4 anos	F	Mestiço	28%	Negativo
50	Taina	5 anos	F	Mestiço	25%	Negativo
51	Bezerro Pinta Roxa	2 meses	F	Mestiço	49%	Negativo
52	Bezerro Baia	3 meses	F	Mestiço	40%	Negativo
53	Bezerro	2 meses	F	Mestiço	36%	Negativo
54	Bezerro	2 meses	F	Mestiço	38%	Negativo
55	Brasileira	4 anos	F	Mestiço	32%	Negativo
56	Bezerro Brasileira	4 meses	F	Mestiço	30%	Negativo
57	Formosa	4 anos	F	Mestiço	25%	Negativo
58	Bezerro Formosa	5 meses	F	Mestiço	28%	Negativo
59	Pinta Roxa	6 anos	F	Mestiço	29%	Negativo
60	Mexerica	5 anos	F	Mestiço	26%	Negativo
61	Baiana	6 anos	F	Mestiço	32%	Negativo
62	Bezerro Baiana	3 meses	F	Mestiço	35%	Negativo
63	Tangerina	4 anos	F	Mestiço	35%	Negativo
64	Bezerro Tangerina	3 meses	F	Mestiço	29%	Negativo
66	Bezerro Sarita	3 meses	M	Mestiço	25%	Negativo
67	Beija Flor	3 anos	F	Mestiço	27%	Negativo
68	Bezerro Beija Flor	3 meses	F	Mestiço	34%	Negativo
69	Marreca	3 anos	F	Mestiço	27%	Negativo
70	Bezerro Marreca	3 meses	M	Mestiço	37%	Negativo
71	Paloma	5 anos	F	Mestiço	25%	Negativo
72	Bezerro Paloma	3 meses	F	Mestiço	25%	Negativo
73	Fumaça	5 anos	F	Mestiço	30%	Negativo
74	Bezerro Fumaça	3 meses	F	Mestiço	28%	Negativo
75	Castanha	6 anos	F	Mestiço	32%	Negativo
76	Bezerro Castanha	5 meses	F	Mestiço	24%	Negativo
77	Jarrinha	5 anos	F	Mestiço	29%	Negativo
78	Bezerro Jarrinha	4 meses	F	Mestiço	26%	Negativo
79	Cabana	5 anos	F	Mestiço	25%	Negativo
80	Mascarada	4 anos	F	Mestiço	41%	Negativo
81	Floresta	3 anos	F	Mestiço	31%	Negativo
82	Bezerro Floresta	2 meses	M	Mestiço	32%	Negativo
83	Bezerro Cigana	4 meses	F	Mestiço	27%	Negativo
84	AR	2 anos	F	Mestiço	30%	Negativo
85	505	2, 5 anos	F	Mestiço	24%	Negativo
86	Guzerá	1, 5 anos	F	Mestiço	26%	Negativo
87	B1	8 meses	M	Mestiço	19%	Negativo
88	416	1, 8 anos	F	Mestiço	33%	Negativo
89	chifruda	2 anos	F	Mestiço	29%	Negativo
90	Nenem	7 dias	M	Mestiço	39%	Negativo
91	B2 estrela	8 meses	M	Mestiço	34%	Negativo
92	V. chumbada	3 anos	F	Mestiço	25%	Negativo

93	Preta s/ brinco	3 anos	F	Mestiço	30%	Negativo
94	491	2 anos	F	Mestiço	23%	Negativo
95	Preta c/ brinco	3 anos	F	Mestiço	26%	Negativo
96	682	1 mês	F	Jersey	33%	Negativo
97	1582	2 meses	F	Jersey	34%	Negativo
98	681	1 mês	F	Jersey	31%	Negativo
99	1588	1 mês	F	Jersey	35%	Negativo
100	651	3 meses	F	Jersey	29%	Negativo
101	1584	4 meses	F	Jersey	30%	Negativo
102	1586	1 mês	F	Jersey	33%	Negativo
103	1582	1 mês	F	Jersey	33%	Negativo
104	659	1 mês	F	Jersey	32%	Negativo
105	672	2 meses	F	Jersey	25%	Negativo
106	674	2 meses	F	Jersey	24%	Negativo
107	676	2 meses	F	Jersey	23%	Negativo
108	679	2 meses	F	Jersey	29%	Negativo
109	671	2 meses	F	Jersey	26%	Negativo
110	658	2 meses	F	Jersey	14%	Negativo
111	670	2 meses	F	Jersey	20%	Negativo
112	678	1 mês	F	Jersey	25%	Negativo
113	1576	3 meses	F	Jersey	28%	Negativo
114	657	3 meses	F	Jersey	25%	Negativo
115	1572	3 meses	F	Jersey	17%	Negativo
116	1575	3 meses	F	Jersey	26%	Negativo
117	1577	3 meses	F	Jersey	25%	Negativo
118	655	4 meses	F	Jersey	22%	Negativo
119	1579	4 meses	F	Jersey	32%	Negativo
120	638	4 meses	F	Jersey	30%	Negativo
121	61	5 anos	F	Jersey	32%	Negativo
122	401	4 anos	F	Jersey	24%	Negativo
123	416	3 anos	F	Jersey	22%	Negativo
124	527	5 anos	F	Jersey	25%	Negativo
125	343	5 anos	F	Jersey	23%	Negativo
126	1007	6 anos	F	Girolando	29%	Negativo
127	1609	2,5 anos	F	Girolando	34%	Negativo
128	63	2 anos	F	Girolando	32%	Negativo
129	1611	2 anos	F	Girolando	33%	Negativo
130	906	2 anos	F	Girolando	25%	Negativo
131	1413	3 anos	F	Girolando	30%	Negativo
132	1408	3 anos	F	Girolando	35%	Negativo
133	1006	7 anos	F	Girolando	35%	Negativo
134	1109	6 anos	F	Girolando	36%	Negativo
135	804	5 anos	F	Girolando	28%	Negativo
136	239	5 anos	F	Girolando	33%	Negativo
137	1513	5 anos	F	Girolando	31%	Negativo
138	248	6 anos	F	Girolando	34%	Negativo

139	236	6 anos	F	Girolando	30%	Negativo
140	250	2 anos	F	Girolando	29%	Negativo
141	237	7 anos	F	Girolando	33%	Negativo
142	705	12 anos	F	Girolando	28%	Negativo
143	603	2 anos	F	Girolando	32%	Negativo
144	1407	5 anos	F	Girolando	41%	Negativo
145	243	5 anos	F	Girolando	29%	Negativo
146	1505	3 anos	F	Girolando	25%	Negativo
147	1314	5 anos	F	Girolando	38%	Negativo
148	1410	2 anos	F	Girolando	32%	Negativo
149	240	2 anos	F	Girolando	38%	Negativo
150	241	2 anos	F	Girolando	30%	Negativo
151	1612	3 anos	F	Girolando	27%	Negativo
152	1406	4 anos	F	Girolando	35%	Negativo
153	1110	2 anos	F	Girolando	22%	Negativo
154	803	9 anos	F	Girolando	35%	Negativo
155	243	12 anos	F	Girolando	36%	Negativo
156	1404	6 anos	F	Girolando	34%	Negativo
157	1103	7 anos	F	Girolando	35%	Negativo
158	1415	5 anos	F	Girolando	34%	Negativo
159	1306	4 anos	F	Girolando	32%	Negativo
160	1412	3 anos	F	Girolando	31%	Negativo
161	1403	12 anos	F	Girolando	30%	Negativo
162	604	12 anos	F	Girolando	35%	Negativo
163	246	12 anos	F	Girolando	22%	Negativo
164	238	10 anos	F	Girolando	28%	Negativo
165	1512	8 anos	F	Girolando	33%	Negativo
166	807	10 anos	F	Girolando	32%	Negativo
167	905	13 anos	F	Girolando	28%	Negativo
168	1501	3 anos	F	Girolando	37%	Negativo
169	805	9 anos	F	Girolando	39%	Negativo
170	1401	10 anos	F	Girolando	35%	Negativo
171	1405	11 anos	F	Girolando	40%	Negativo
172	245	13 anos	F	Girolando	33%	Negativo
173	80	8 meses	F	Girolando	31%	Negativo
174	82	8 meses	F	Girolando	36%	Negativo
175	84	8 meses	F	Girolando	36%	Negativo
176	83	6 meses	F	Girolando	37%	Negativo
177	87	6 meses	F	Girolando	32%	Negativo
178	88	6 meses	F	Girolando	18%	Negativo
179	85	7 meses	F	Girolando	30%	Negativo
180	89	7 meses	F	Girolando	26%	Negativo
181	91	7 meses	F	Girolando	21%	Negativo
182	90	7 meses	F	Girolando	21%	Negativo
183	86	7 meses	F	Girolando	22%	Negativo
184	93	7 meses	F	Girolando	23%	Negativo

185	92	7 meses	F	Girolando	25%	Negativo
186	Chumbinho	5 meses	M	Mestiço	29%	Negativo
187	Estrelinha	4 meses	F	Mestiço	35%	Negativo
188	Vóvó	4 meses	F	Mestiço	29%	Negativo
189	Maurinha	5 meses	F	Mestiço	35%	Negativo
190	Orelhinha	4 meses	F	Mestiço	40%	Negativo
191	Cachoeira	5 meses	F	Mestiço	27%	Negativo
192	Laranja	6 meses	F	Mestiço	32%	Negativo
193	Princesa	5 meses	F	Mestiço	35%	Negativo
195	Chumbada	5 meses	F	Mestiço	33%	Negativo
196	Lindóia II	5 meses	F	Mestiço	25%	Negativo
197	Bethania	5 meses	F	Mestiço	33%	Negativo
198	Thainá	5 meses	F	Mestiço	33%	Negativo
199	Tranquila	5 meses	F	Mestiço	30%	Negativo
200	Malhada	5 meses	F	Mestiço	25%	Negativo
201	Malhado I	5 meses	M	Mestiço	30%	Negativo
202	Castainha	5 meses	F	Mestiço	40%	Negativo
203	Malhado II	5 meses	M	Mestiço	28%	Negativo
204	Cigana	5 meses	F	Mestiço	27%	Negativo
205	Fumaça	5 meses	F	Mestiço	32%	Negativo
206	Doente	5 meses	M	Mestiço	25%	Negativo
207	Sem nome/ 14.2	5 meses	F	Mestiço	20%	Negativo
208	Moura	8 anos	F	GH	33%	Negativo
209	Tourinho	4 anos	M	Gir	32%	Negativo
210	Garrote Pintado	3 anos	M	GH	24%	Negativo
211	Vóvó	15 anos	F	Jersey	19%	Negativo
212	Chifrudo	5 anos	M	Guzerá	21%	Negativo
213	Pretinho	4 anos	M	Nelorado	32%	Negativo
214	Pintado	4 anos	M	Nelorado	27%	Negativo
215	Figueira	2 anos	F	Nelorado	26%	Negativo
216	Arisca	1,2 anos	F	GH	35%	Negativo
217	Elaine	8 anos	F	GH	22%	Negativo
218	Amarela	5 anos	F	GH	32%	Negativo
219	Vanuza	8 anos	F	GH	24%	Negativo
220	Kelly	1 ano	F	Gir	38%	Negativo
221	Beth	2 anos	F	Gir	30%	Negativo
222	Malhado	3 anos	M	Gir	33%	Negativo
223	Cachorra	9 anos	F	Gir	36%	Negativo
224	Bezerro Cachorra	6 meses	M	GH	28%	Negativo
225	Bezerro Pintado	6 meses	M	GH	29%	Negativo
226	Banana	6 meses	F	Nelorado	31%	Negativo
227	Jersey	3 anos	F	Jersey	30%	Negativo
228	Churrasco	6 anos	M	GH	40%	Negativo

Comprovante CEUA protocolo 044/2016.



Universidade Severino Sombra  
Comissão de Ética no Uso de Animais

USS/CEUA Nº 044/2016

Docentes  
GLAUBA A. BAGTA / ERICA C. R. ROIER / RENATA F. FERREIRA / ADIVANDO HENRIQUE FONSECA et al  
Título do Projeto/TCC/Aula Prática  
Detecção de Babesia bovis, Babesia bigemina e Anaplasma marginale em bovinos de leite do município de Vassouras, Rio de Janeiro-RJ

PARECER

A metodologia está de acordo com as normas de bem estar animal.

Situação Deferido,

Data 30/11/2016

Assinatura:

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEUA

DE ACORDO.

Assinatura do Coordenador da CEUA

Data

M. A. F. S. et al.

22/06/2017

Prof. Dr. Marcelo Flores Capelli  
Presidente da Comissão de Ética  
no Uso de Animais - CEUA  
Mat. 64262