UNIVERSIDADE DE UBERABA
MARITSSA CORRÊA CAETANO AFONSO

PREVALÊNCIA DE *BABESIA BOVIS, BABESIA BIGEMINA, ANAPLASMA MARGINALE* E *TRYPANOSOMA VIVAX* EM BEZERROS DA REGIÃO DE UBERABA-MG.

UBERABA – MG
2019

MARITSSA CORRÊA CAETANO AFONSO

PREVALÊNCIA DE *BABESIA BOVIS, BABESIA BIGEMINA, ANAPLASMA MARGINALE* E *TRYPANOSOMA VIVAX* EM BEZERROS DA REGIÃO DE UBERABA-MG.

Dissertação apresentada à Universidade de Uberaba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção animal nos Trópicos, do Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Orientador: Prof. Dr. Eustáquio R. Bittar.

UBERABA – MG

2019

Catalogação elaborada pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

A66p

Afonso, Maritssa Corrêa Caetano.
Prevalência de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *anaplasma marginale* e *trypanosoma vivax* em bezerros da região de Uberaba-MG / Maritssa Corrêa Caetano Afonso. – Uberaba, 2018.
46 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação.
Orientador: Prof. Dr. Eustáquio R. Bittar.

1. Bovino – Criação. 2. Bovino – Doenças. 3. Tripanossomose em animais. I. Bittar, Eustáquio R. II. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 636.2

MARITSSA CORRÊA CAETANO AFONSO

PREVALÊNCIA DE *BABESIA BOVIS, BABESIA BIGEMINA, ANAPLASMA MARGINALE* E *TRYPANOSOMA VIVAX* EM BEZERROS DA REGIÃO DE UBERABA-MG.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 18/12/2018

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar - Orientador
Universidade de Uberaba

Prof. Dr. Ian Martin
Universidade de Uberaba

Profª. Drª. Alessandra Aparecida Medeiros Ronchi
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

“No semblante de um animal, que não fala, há um discurso que somente um espírito sábio realmente entende! ” (Mahatma Gandhi).

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos - UNIUBE, em especial aos professores por todo o ensinamento transmitido neste período, e aos funcionários, pelos serviços prestados e grande ajuda em diversos momentos.

Á Deus por todas as vitórias e por me dar a certeza de nunca estar só.

Agradeço também a toda a minha família pelo apoio, amor, incentivo e pelas palavras sempre gentis, que sempre me apoiou e que de alguma forma contribuiu para minha realização profissional, sem vocês, nada disso seria possível.

Agradeço ao Prof. Dr. Eustáquio Resende Bittar pela orientação e pela conduta exemplar de líder, especialmente em relação aos que obstruem.

Á Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar pela orientação na minha caminhada. Agradeço pela confiança e por sempre acreditar na minha capacidade pessoal.

Aos amigos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho, também aos meus colegas mestrandos e mestres: Ana Paula Navarro, Isabella Hercos, Paula Bassi, Clebiane, Gabriel Nogueira e a todos os colaboradores do Hospital Veterinário de Uberaba, por toda ajuda durante o mestrado.

Aos médicos veterinários pela coleta das amostras: Marcio, Guilherme Mussi, Poliana, Fernando, Fernando leitão, Otacílio Jr., Thiago Mendes, Maria Laura e Malu.

Agradeço à Universidade de Uberaba, onde também sou formada, e ao Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, pela significativa oportunidade de crescimento.

Enfim, a todos que colaboraram com a minha caminhada até aqui, pelo convívio, pelos ensinamentos, pela ajuda, pelas palavras, e por acreditarem. Do fundo do coração, meu muito obrigado.

RESUMO

Na bovinocultura de leite, várias enfermidades podem afetar a criação de bezerros, como diarreia, pneumonia e a Tristeza Parasitária Bovina (TPB). A TPB causa alta morbidade e mortalidade nos bezerros, sendo causada pelos protozoários *Babesia bovis, Babesia bigemina* e pela *Rickettsia Anaplasma marginale*. Acomete animais entre 2 a 9 meses de idade e causa apatia, debilidade, febre, anemia, perda de peso, entre outros sintomas. Todavia, tem-se observado que os bezerros tratados com aceturato de diaminazeno associado à tetraciclina, tratamento de eleição para a TPB, não estão melhorando. Como a tripanossomíase tem aumentado na região do Triângulo Mineiro, e promove sinais clínicos semelhantes ao da TPB e por saber que o *Trypanosoma vivax* é resistente ao referido medicamento, surge a suspeita do acometimento dos animais por *T. vivax*. Assim o presente trabalho objetivou realizar um levantamento parasitológico e sorológico em bezerros entre 2 a 9 meses com e sem sinais clínicos de hemoparasitoses, na região Uberaba-MG, buscando conhecer a prevalência de *B. bovis, B. bigemina, A. marginale e T. vivax.* Para isso, 186 bezerros foram divididos em dois grupos; G1 (n=93) composto por animais sem sinais clínicos e G2 (n=93) com sinais clínicos. Na pesquisa parasitológica (esfregaço ponta de orelha e papa leucocitária), os bezerros (G1 e G2) não apresentaram merozoítos de *B. bovis* e *B. bigemina* ou mórulas de *A. marginale,* ou tripomastigota de *T. vivax*. Na análise sorológica (ELISA e RIFI) notou-se que a prevalência de anticorpos anti-IgG para os agentes etiológicos de TPB no G1 e G2 foram de 75,27% e 73,12% e *T. vivax* no G1 e G2 foram de 21,50% e 33,33% respectivamente. A prevalência de anticorpos nas coinfecções foram superiores em relação as doenças isoladas no G2 ($p<0,005$). Na tripanossomíase houve uma diferença significativa ($p<0,005$), entre fêmeas e machos do G1 e G2. Nas coinfecções, houve também uma diferença significativa ($p<0,005$), na faixa etárias e na raça sendo superior entre a faixa etária de 2 a 3 meses e na raça holandesa. Neste contexto, pode-se concluir que bezerros holandeses possuem anticorpos anti-*Babesia bovis,* anti-*Babesia bigemina,* anti-*Anaplasma marginale* e anti-*Trypanosoma vivax* e que o diagnóstico diferencial da TPB e tripanossomíase é importante para a correta preconização do tratamento uma vez que bezerros de 2 a 9 meses de idade são acometidos por ambos agentes etiológicos.

PALAVRAS CHAVE: Diagnóstico; Tripanossomíase bovina; Tristeza Parasitária Bovina.

ABSTRACT

In bovine dairy farming, many diseases can affect calf rearing, such as diarrhea, pneumonia and the bovine parasite sadness (TPB). The TPB causes high morbidity and mortality in the calves, and is caused by the protozoan *Babesia bovis, Babesia bigmina* e pela *Rickettsia Anaplasma*. The disease affects the animals between the ages of 2 and 9 months old and cause apathy, debility, fever, anemia, weight loss, among other symptoms. However, it has been seen in calf treated with diminazene aceturate associated with tetracycline, election treatment for the TBP, are not getting better. As the tripanosomiasis has risen in the region of Triângulo Mineiro and promotes clinical signs similar to the ones in TPB and since we know that *Trypanosoma vivax* is resistant to the referred medicine, merges the suspicion of the impairment of the animals by *T. vivax*. Therefore, this present study aims to perform a pathological and serological survey upon the calves between the ages of 2 and 9 months old with and without clinical signs of TPB, in the Uberaba-MG region expecting to find out the prevalence of *B. bovis, b. bigemina, A, marginale* e *T. vivax*. For that, 186 calves were divided into two groups: G1 (n=93) composed by animals without any clinical signs and G2 (n=93) with the clinical signs. In the parasitological (ears scraping and leukocyte papa) the calves (G1 and G2) did not presente merozoites of *B. bovis, B. bigemina* morula of A. marginale, or trypomastigotes of *T. vivax.* In the serological analysis (RIFI and ELISA) was noticed that the prevalence of antibodies anti IgG to the etiologic agents of TPB in the G1 and G2 were 72,27% and 73,12%, and *T. vivax* in the G1 and G2 were 21,50% and 33,33% respectively. The prevalence of atibodies in the coinfections were higher in the relations of deseases isolated in the G2 (p<0,005). In the Tripanosomiasis there was a significant difference (p<0,005), between the male and female of the G1 and G2. In the coinfections, there was a significant difference (p<0,005), in the age range and in the breed, being higher in the age range between 2 and 3 months old and in the doutch breed. In this contexto, it can be concluded that doutch calves have aitibodies anti-*Babesia bovis,* anti-*Babesia bigmina,* anti-*Anaplasma marginale* and anti-*Trypanosoma vivax* and that a differential diagnostic of TBP and tripanosomiasis, is important for the correct treatment advocacy, once the calves between 2 and 9 months old are affected by both etiological agents.

KEYWORDS: Diagnosis; Bovine tripanosomiasis; Bovine parasite sadness (TPB);

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frequência de sinais clínicos apresentados pelos animais pertencentes ao grupo G2 com sinais clínicos na avaliação realizada 24

Figura 2: Perfil sorológico dos animais pertencentes aos G1 sem sinais clínicos e G2 com sinais clínicos frente aos agentes etiológicos do complexo Tristeza Parasitária Bovina.....29

Figura 3: Perfil de anticorpos IgG anti-*T. vivax* dos animais experimentais do G1 sem sinais clínicos e G2 com sinais clínicos (A) e dos títulos sorológicos obtidos na IFI (B) 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição por faixa etária, sexo e raça dos animais experimentais do G1 sem sinais clínicos e G2 com sinais clínicos 28

Tabela 2: Perfil sorológico dos animais pertencentes aos grupos experimentais frente aos agentes etiológicos do complexo Tristeza Parasitária Bovina 30

Tabela 3: Perfil sorológico dos animais experimentais pertencentes aos grupos G1 sem sinais clínicos e ao G2 com sinais clínicos frente aos agentes etiológicos do complexo Tristeza Parasitária Bovina e tripanossomíase 32

Tabela 4: Perfil epidemiológico dos animais experimentais pertencentes aos grupos G1 sem sinais clínicos e G2 com sinais clínicos frente aos agentes etiológicos estudados 33

LISTA DE ABREVIATURAS

A. marginale - *Anaplasma marginale*

B. bovis - *Babesia bovis*

B. bigemina - *Babesia bigemina*

BCT - *Buffy Coat Technique* (Técnica de *Buffy Coat)*

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

MHCT - Técnicas do microhematócrito

RIFI - Reação de Imunofluorescência indireta

T. vivax – *Trypanosoma vivax*

TPB – Tristeza Parasitaria Bovina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

2. REVISÃO LITERÁRIA 15

2.1 TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA 15

2.1.1. Etiologia 15

2.1.2. Epidemiologia 16

2.1.3. Sinais clínicos 16

2.1.4. Diagnóstico 17

2.2 *Trypanosoma vivax* 18

2.2.1. Etiologia 18

2.2.2. Epidemiologia 19

2.2.3. Sinais clínicos 19

2.2.4. Diagnóstico 20

3. OBJETIVOS 22

3.1. OBJETIVO GERAL 22

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22

4. MATERIAIS E MÉTODOS 23

4.1 COMITÊ DE ÉTICA 23

4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS 23

4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS 23

4.4 AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DOS ANIMAIS 24

4.4.1 Pesquisa parasitológica de *Babesia bovis, B bigemina e/ Anaplasma marginale* 24

4.4.2 Pesquisa parasitológica de *Trypanosoma vivax* 25

4.5 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DOS ANIMAIS 25

4.5.1 Sorologia *Babesia bovis, Babesia bigemina e Anaplasma marginele* 25

4.5.2 Sorologia *Trypanosoma vivax* 26

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA 27

6. RESULTADOS 28

6.1 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA 28

6.6.1 Distribuição por faixa etária, raça e sexo e raça 28
6.2 AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA E SOROLÓGICA..... 29
6.2.1 Sorologia *Babesia bovis, Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*..... 29
6.2.2 Sorologia *Trypanosoma vivax*..... 31
7. DISCUSSÃO 34
8. CONCLUSÃO..... 37
REFERÊNCIAS 38

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite é uma das áreas que mais se ressaltam no agronegócio brasileiro. Atividade leiteira é tradicional no país e presente em quase todo território nacional. É de grande importância na geração de renda segundo Carvalho (2012), porém algumas doenças impedem o crescimento da bovinocultura, em áreas tropicais e subtropicais, entre as quais se destacam a Tristeza Parasitária Bovina (TPB) e a tripanossomíase.

A Tristeza Parasitária Bovina é um conjunto de doenças que inclui duas enfermidades: babesiose causada pelos protozoários *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* e a *anaplasmose* causada pela *Rickettsia Anaplasma Marginale* (ALMEIDA et al., 2006; GUEDES JÚNIOR et al., 2008). São transmitidos por carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus,* e geram grandes perdas econômicas como mortes no rebanho, diminuição na produção de leite, perda de peso, além de gastos com controle e prevenção (GONÇALVES, 2000; GRISI et al., 2002; BARROS et al., 2005; DA SILVA et al., 2018). Estes hemoparasitos infectam os eritrócitos dos bovinos causando anemia, perda de peso, baixo desempenho produtivo, queda da imunidade e morte (FURLONG, 2001).

Outra enfermidade importante na bovinocultura é a tripanossomíase causada pelo *Trypanosoma* (Dutonella) vivax (Ziemann, 1905), um protozoário flagelado de grande relevância e causador da doença em espécies de ungulados silvestres e domésticos, principalmente bovinos na África e América Latina (OSÓRIO et al., 2008). Na América Latina, a transmissão ocorre por vetores como dípteros sugadores de sangue das famílias Tabanidae *(Tabanus* spp.), Stomoxidinae *(Stomoxys* spp.) e Hippoboscidae (*Hippobosca* spp.), além da propagação da doença por fômites como agulhas (HOARE, 1972; SERRA-FREIRE e REZENDE, 1988; GARDINER, 1989; SILVA et al., 2002; PAIVA, 2009). Nas infecções agudas apresentam alterações hematológicas severas como leucopenia e anemia, além de sinais clínicos como lacrimejamento, perda de escore corporal, fraqueza progressiva, conjuntivite, febre, letargia, queda na produção de leite e carne e alterações na reprodução como abortos, repetições de cio, nascimentos de crias fracas, anestro temporário ou permanente, e eventualmente morte (GUERREIRO, 2005; OSÓRIO et al., 2008; BEZERRA e BATISTA., 2008; CARVALHO et al., 2008; SILVA et al., 2009).

O diagnóstico da TPB pode ser feito por técnicas diretas, identificando o parasito em esfregaço sanguíneo, bem como da tripanossomíase que baseia - se em exames diretos empregando as técnicas de microhematócrito (MHCT) (WOO, 1970), *Buffy Coat Technique* (BCT) (MURRAY, 1977) para observação da presença das formas tripomastigotas de *T. vivax*

em esfregaços sanguíneos. Os métodos diretos são rápidos e baratos, mas não apresentam alta sensibilidade, sendo usados apenas para diagnóstico com doença clínica, levando a um resultado negativo quando aplicado em animais com infecção subclínica ou crônica (TERKAWI et al., 2011).

Sendo assim, os testes sorológicos, ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), têm mostrado alta capacidade de detectar anticorpos em animais cronicamente infectados, sendo regularmente usado em estudos de levantamentos epidemiológicos (ARAÚJO et al., 1998; MADRUGA et al., 2006, AQUINO et al., 2010).

O diagnóstico por meio de técnicas moleculares (PCR) para a detecção de agentes causadores da TPB (SOUZA et al., 2018) e *T. vivax* (VENTURA et al., 2001; DÁVILA et al., 2004; ODENIRAN et al., 2019) também podem ser utilizados.

A droga considerada eficaz no tratamento de infecção por TPB é o aceturato de diminazeno (PUPIN et al., 2018) e para *T. vivax* é o cloreto de isometamídio (GONZATTI et al., 2014). Entretanto observa-se o desenvolvimento de resistência, ameaçando assim o controle das hemoparasitoses bovina (STEVENSON et al., 2000; DESQUESNES E DIAS, 2004; SOW et al., 2012). Para o controle da doença, o monitoramento de animais doentes, controle da distribuição e intensidade da doença, assim como o controle de vetores são fundamentais (DESQUESNES E DIAS, 2004; MEKURIA E GADISSA et al., 2011; SOW et al., 2012; MBEWE et al., 2015).

Como a ocorrência de tripanossomíase tem aumentado na região do Triângulo Mineiro e promove sinais clínicos semelhantes ao da TPB, além do fato do *T. vivax* ser resistente ao aceturato de diminazeno, surge a suspeita do acometimento dos animais por *T. vivax* e a necessidade de avaliar corretamente os agentes causadores dos sinais clínicos.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou realizar um levantamento sorológico e parasitológico em bezerros de 2 a 9 meses com e sem sinais clínicos de TPB na região de Uberaba Minas Gerais, buscando conhecer o número de animais saudáveis e doentes, e consequentemente, a prevalência de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* e *Trypanosoma vivax.*

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA

A babesiose e a anaplasmose formam o complexo da TPB, são hemoparasitoses transmitidas pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* (DALGLIESH; STEWART, 1983; GUEDES JÚNIOR et al., 2008), sendo que a anaplasmose pode ainda ser transmitida mecanicamente por dípteros hematófagos (GUGLIELMONE, 1995).

Nos bovinos os sinais clínicos da TPB são causados *pela Babesia* spp. e *A. marginale.* Para a transmissão da TPB é fundamental a presença do vetor (carrapato) e fatores como clima, manejo dos animais, idade, condições fisiológicas do hospedeiro e da raça são fundamentais para a resposta dos animais (SOUZA et al., 2000ab; PUPIN et al., 2018; DA SILVA et al., 2018).

2.1.1. Etiologia

A babesiose é uma doença causada por um protozoário do filo Protozoa, subfilo Apicomplexa, da classe Sporozoasida, ordem Piroplasmida, gênero Babesia (GUGLIELMONE, 1995; SEQUEIRA; AMARANTE, 2001; BROWMAN, 2006). Há oito espécies que podem contaminar os bovinos em todo o mundo (UILENBERG, 2006), porém a *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* são as espécies que causam doença grave em gado e são economicamente importantes no Brasil (ARAÚJO et al., 1997; OSAKI et al., 2002; FARIAS, 2007).

A anaplasmose bovina é uma enfermidade causada pela *Rickettsia Anaplasma marginale* que pertence à ordem Rickettsiales (SOUZA et al., 2001; VIDOTTO; MARANA, 2001; ARAÚJO et al., 2003).

Esses agentes são transmitidos pelo carrapato *R. microplus*, vetor mais encontrado nos países das Américas Central e Sul, África, Ásia, Austrália e Sul da Europa (GUGLIELMONE, 1995; LIMA et al., 1999; BOCK et al., 2004; DA SILVA et al., 2018).

2.1.2. Epidemiologia

É uma enfermidade de distribuição mundial, onde a presença do carrapato *R. microplus* infectante é fundamental para sua transmissão, sendo mais importante nas regiões tropicais e subtropicais (CANTÚ-MARTÍNEZ et al., 2008).

Nos primeiros meses de vida os bezerros são infectados, porém são protegidos pelos anticorpos maternos do colostro, desenvolvendo sua imunidade ativa sem apresentar sinais clínicos da doença, assumindo características de estabilidade enzoótica em condições de clima tropical e subtropical (KESSLER et al., 1983; MADRUGA et al., 1984). Entretanto, a babesiose ocorre em animais entre 31 e 45 dias de idade, que são mais suscetíveis à infecção, devido a diminuição dos níveis de anticorpos colostrais a partir dos 20 dias de idade e alta carga de carrapatos (FARIAS, 2007).

O Brasil é um país enzoótico para TPB devido à frequência da transmissão dos agentes, porém existem algumas regiões como o sertão e sul brasileiro, em que as condições climáticas não favorecem o desenvolvimento do *R. microplus* (GONZALES, 1995; LIMA et al., 1999; SANTOS et al., 2001; DA SILVA et al., 2018). Quando ocorre uma transmissão esporádica como no sul do País, a doença gera prejuízo econômico devido a mortalidade e morbidade em áreas de instabilidade enzoótica (KESSLER et al., 1983).

Foi realizado um levantamento com 5.298 amostras de bovinos na região do Mato Grosso do Sul, com diagnósticos definitivos ou presuntivos de babesiose, sendo de maior prevalência em gado zebu, embora o gado taurino seja mais predisposto (PUPIN et al., 2018).

2.1.3. Sinais clínicos

A infecção varia com a integração entre o agente, vetor e o hospedeiro (SILVA et al., 2007), a contaminação por *B. bovis* tem um período de incubação de três a sete dias para a doença aguda. O aparecimento de citocinas e liberação de produtos farmacologicamente ativos contribui para a evolução da doença levando a vasodilatação, hipotensão, aumento da permeabilidade capilar, edema, colapso vascular, distúrbios de coagulação, lesão endotelial e estase circulatória (BOCK et al., 2004).

Pode causar febre (41 a 41,5ºC), anorexia, apatia, ataxia, palidez de mucosas, taquipneia, hemoglobinúria, icterícia, anemia, tremores musculares e ranger de dentes (SANTOS et al., 1998; SOARES et al., 2000; SINGH et al., 2009; SOUZA et al., 2018). Os sinais clínicos de infecções subagudas são mais difíceis de detectar (BOCK et al., 2004).

A anemia está associada à destruição hemolítica, com diminuição nos valores eritrocitários e da hemoglobina, podendo resultar em icterícia e hemoglobinúria. Quando os parasitos sofrem multiplicação assexuada ocorre uma redução do número de eritrócitos circulantes devido a lise (ALMEIDA et al., 2006).

A *B. bigemina* parasita as hemácias da circulação periférica, e *B. bovis* é encontrada em capilares de órgãos centrais como cérebro, cerebelo, meninges, e nas vísceras como rins, baço, fígado, coração e pulmão (MASSARD; FREIRE, 1985).

A. marginale é uma *Rickettsia* intraeritrocítica que infecta de 10 a 90% dos eritrócitos dos bovinos (KIESER et al., 1990). Há um aumento de número de eritrócitos parasitados após a infecção (KOCAN et al., 2010) e as células do sistema reticuloendotelial fagocitam os eritrócitos levando a anemia e icterícia, sem apresentar hemoglobinemia ou hemoglobinúria (KOCAN et al., 2010).

Os sinais clínicos observados nos animais doentes são: anemia hemolítica, icterícia, dispneia, taquicardia, febre, fadiga, lacrimejamento, sialorreia, diarreia, micção frequente e anorexia, levando a morte do animal (VIDOTTO; MARANA, 2001; ARAÚJO et al., 2003).

2.1.4. Diagnóstico

O diagnóstico da babesiose e anaplasmose bovina pode ser feito relacionando os sinais clínicos com a presença dos parasitos no interior das hemácias em esfregaços sanguíneos (LIMA et al., 1999; VIDOTTO; MARANA, 2001; OKASI et al., 2002; CARELLI et al., 2007; PUPIN et al., 2018). Para melhor execução do exame, deve-se preparar a lâmina a partir de sangue coletado dos capilares periféricos, como da região marginal da orelha ou ponta da cauda no caso de *B. bovis*, pois a circulação sanguínea geral possui 20 vezes menos parasitos do que no sangue periférico (BOCK et al., 2004); para *B. bigemina* pode-se utilizar até mesmo o sangue coagulado por haver uma quantidade maior desse protozoário no sangue circulante (VIDOTTO, 2001; BOCK et al., 2004 MARANA, 2009).

Quando o animal apresentar uma baixa parasitemia, nos casos das infecções subagudas, é difícil encontrar o parasito (MARTINS et al., 1996; VIDOTTO; MARANA, 2009). Com isso várias técnicas sorológicas, com variação de graus de sensibilidade e especificidade, foram criadas para detecção de anticorpos contra *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* (MARANA et al., 2009; JULIANO et al., 2007). Muitos são os testes sorológicos utilizados para a detecção da babesiose e anaplasmose bovina, entre eles pode-se destacar o teste da conglutinação rápida (TCR), aglutinação pelo látex, hemaglutinação, fixação de complemento (FC) (MARANA et

al., 2009), teste do cartão (TC), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (SOUZA et al., 2001; MARANA et al., 2009), ensaio imunoenzimático de adsorção indireto (iELISA); ELISA por competição (cELISA) (MARANA et al., 2009), além de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (OKASI et al., 2002; BOCK et al., 2004; CARELLI et al., 2007; DA SILVA et al., 2018). Os exames sorológicos são importantes nos estudos epidemiológicos de uma determinada região (SOUZA et al., 2000ab; BOCK et al., 2004) e são utilizados na avaliação de medidas de controle como premunição, vacinação e controle de carrapatos (OSAKI et al., 2002; BOCK et al., 2004).

2.2. *Trypanosoma vivax*

O *Trypanosoma vivax* ocorre na Ásia, África, América do Sul, América central em algumas ilhas do Caribe. No Brasil, é transmitido mecanicamente por moscas hematófagas (CARVALHO, 2008). É um hemoparasito de ruminantes que foi introduzido na América Latina com o gado importado da África, provavelmente no final do século XIX (SILVA et al., 2004).

A tripanossomíase é de grande interesse para o Brasil, devido ao seu impacto negativo sobre a pecuária. Gera grandes perdas econômicas devido à morte de cerca de três milhões de bovinos anualmente, tanto nos países africanos quanto nos países da América do Sul. Em animais subclínicos o impacto econômico também é significativo devido à diminuição da produção de carne, leite e derivados, resultando em perda de aproximadamente cinco milhões de dólares/ano (OSÓRIO et al., 2008).

2.2.1. Etiologia

O *T. vivax* é um parasito monomórfico, na América do Sul, devido ausência do ciclo no vetor da mosca *tsé-tsé*, assim o *T. vivax* é encontrado apenas na forma tripomastigota (GUERREIRO, 2005).

As tripomastigotas metacíclicas podem ser encontradas no hospedeiro intermediário, já as formas tripomastigotas e amastigotas são encontradas no hospedeiro definitivo (SILVA et al., 2002). A extremidade pela qual o parasito avança durante a locomoção é descrita como anterior, enquanto que a posterior varia na forma, sendo geralmente mais larga, afilando mais abruptamente ou terminando em uma forma rombuda ou ainda apresentando a ponta arredondada (SILVA et al., 2002).

2.2.2. Epidemiologia

No Brasil, o *T. vivax* já foi diagnosticado nos estados do Pará (MADRUGA et al. 2006), Amapá (SERRA-FREIRE, 1988), Mato Grosso (OSÓRIO et al., 2008), Tocantins (LINHARES et al., 2006), Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008), Paraíba (BATISTA et al., 2007), Maranhão (GUERRA et al., 2008) e Pernambuco (PIMENTEL et al., 2012).

Trabalhos publicados relatam a disseminação da doença por todo o Brasil com a presença do parasita em bovinos leiteiros mestiços, Nelore e ovinos na região Nordeste (GUERRA et al., 2008; GUEDES JUNIOR et al. 2008; BATISTA et al., 2008; GALIZA et al., 2011; PIMENTEL, et al., 2012), bovinos da região Centro Oeste (SILVA et al., 1997), bovinos da raça Brahman na região Norte (LINHARES et al., 2006) e região Sudeste em bovinos da raça Holandesa e Girolando no Estados de São Paulo (CADIOLI et al., 2012) e em vacas em Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008).

A prevalência da doença na microrregião de Uberaba ainda se encontra abaixo dos estudos, já apresentados nos demais estados do país, mas se tratando de uma região predominantemente de bovino leiteiro, onde o trânsito de animais é frequente devido a grandes exposições e a falta de um manejo mais adequado, pode-se levar a um aumento dos casos de *T. vivax* na região, o que poderia resultar em prejuízo sócio econômico, como sugerido por Paiva et al., 2000. A maior prevalência foi encontrada no município de Uberaba (24,4%), seguido pelo município de Veríssimo (17%), Campo Florido (9%) e Conquista (8,8%). Essas prevalências foram inferiores aos achados de Cuglovici et al. (2010) em fevereiro de 2009 no município de Igarapé no mesmo estado.

2.2.3. Sinais clínicos

Tripanossomíase bovina é caracterizada pela presença de formas tripomastigotas no sangue, e levam os animais evoluir da fase aguda para a crônica tendo uma alta morbidade e baixa letalidade, dependente da cepa que está infectando o animal (OSÓRIO et al., 2008).

Animais infectados podem apresentar-se assintomáticos, ou exibir sinais clínicos como anemia, perda de peso, febre, anemia, fraqueza, sinais neurológicos, abortos, queda na produção de leite e carne e morte (SCHENCK et al., 2001; DELAFOSSE et al., 2006; BATISTA et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; FRANGE, 2013; GANYO et al., 2018).

Embora *T. vivax* desenvolva todas as etapas do seu ciclo biológico no sangue circulante, o parasita apresenta capacidade de migrar nos tecidos do hospedeiro vertebrado (GARDINER, 1989). Trabalhos relatam a participação do parasita na patogênese de lesões inflamatórias, degenerativas de órgãos como coração (MASAKE, 1980; KIMETO et al., 1990), sistema nervoso central, testículo e epidídimo (BATISTA et al., 2007; BATISTA et al., 2008).

O *T. vivax* também pode causar danos reprodutivos em bovinos, provocando nos machos a perda de libido, retardamento da puberdade e baixa qualidade seminal, e nas fêmeas podem ocorrer ciclos estrais anômalos, anestro (períodos de inatividade ovariana), morte fetal, dificuldade no parto e abortos (SILVA et al., 2004; BATISTA et al., 2008).

As alterações hematológicas encontradas nas infecções com *T. vivax* estão relacionadas a diminuição na contagem de hemácias, hematócrito e dos teores de hemoglobina, indicando uma anemia (SILVA et al., 1999; ESPINOSA et al., 2000; SILVA et al., 2002; BATISTA et al., 2007; GANYO et al., 2018). A anemia provocada por *T. vivax* é considerada multifatorial, sendo atribuída à hemólise intra e extravascular, diminuição ou inibição da eritropoiese e a leucopenia com linfocitose foi a principal característica do leucograma dos animais do rebanho. (HOLMES, 1997).

2.2.4. Diagnóstico

Para o diagnóstico da tripanossomíase deve-se considerar dados epidemiológicos e manifestações clínicas sugestivas e a sensibilidade e especificidade da técnica utilizada para diferentes fases da doença. Podendo ser realizado técnicas parasitológicas com a observação direta de formas tripomastigotas em esfregaços sanguíneos (fase aguda da doença) e testes sorológicos (fase crônica).

Na fase aguda, quando os tripanossomas são abundantes, a identificação morfológica do parasito pode ser possível por métodos diretos, tais como a técnica BCT (MURRAY et al., 1977) e MHCT ou teste de Woo (Woo, 1970), porém para animais com baixa parasitemia há uma grande dificuldade no diagnóstico pela baixa sensibilidade do teste.

Na fase crônica da doença, as técnicas de observação direta demonstram baixa sensibilidade, passando o diagnóstico laboratorial a basear-se em métodos imunológicos. Os testes sorológicos são especialmente indicados em inquéritos epidemiológicos quando há infecção subclínica nos rebanhos (EISLER et al., 1998).

As reações de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático (ELISA) são os métodos sorológicos mais comumente utilizados para o diagnóstico de tripanossomíase e

apresentam sensibilidade variável e na maioria das vezes, não apresentam especificidade suficiente para diferenciar as espécies de tripanossomas (DESQUESNES e TRESSE, 1996; EISLER et al., 1998; MASAKE et al., 1980), fato que, segundo JONES e DÁVILA (2001) diminui o valor dessas provas na América do sul, devido a resultados falsos-positivos provocados por reações cruzadas do *T. vivax* com *T. evansi* e *T. theileri*.

Métodos moleculares que revelam a presença do *T. vivax*, mesmo quando presentes no organismo em quantidades extremamente reduzidas, como a PCR, vêm adquirindo especial importância no estabelecimento do diagnóstico definitivo da infecção, por permitir a identificação precoce e específica do parasito (MASAKE et al., 2002; ODENIRAN et al., 2019) além da possibilidade de caracterização genética de cepas e sua correlação com peculiaridades da relação parasita hospedeiro (MASAKE et al., 2002; VENTURA et al., 2001).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo soroepidemiológico e parasitológico em bezerros entre 2 a 9 meses de idade, com e sem sinais clínicos de TPB e tripanossomíase na região do Triângulo Mineiro.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conhecer a prevalência de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* em bezerros de 2 a 9 meses de idade.
- Conhecer a prevalência de *Trypanosoma vivax* em bezerros de 2 a 9 meses de idade.
- Determinar a prevalência das coinfecções (*Trypanosoma vivax* e Tristeza Parasitaria Bovina) em bezerros de 2 a 9 meses de idade.
- Correlacionar os aspectos parasitológicos e sorológicos aos dados epidemiológicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COMITÊ DE ÉTICA

Foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA-UNIUBE) o formulário unificado para o uso de animais em experimentação e/ou ensino, intitulado Prevalência de *Babesia bovis, Babesia bigemia, Anaplasma marginale* e *Trypanosoma vivax* em bezerros da região de Uberaba – MG (Processo Nº: 025/2017).

4.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, situado no Hospital Veterinário de Uberaba (HVU) e, no laboratório de Biologia Molecular do Colégio Técnico (COLTEC) da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Foram selecionados 186 bezerros entre 2 a 9 meses e divididos em dois grupos (G1 e G2) de acordo com a observação ou não de sinais clínicos. O G1 (n=93) foi composto por animais sem sinais clínicos para TPB ou tripanossomíase e o G2 (n= 93) por animais com sinais clínicos como anemia (100% - 93/93), febre (51,61% - 48/93), emagrecimento (15,05% - 14/93), e pneumonia 7,53% (7/93) (Fig. 1).

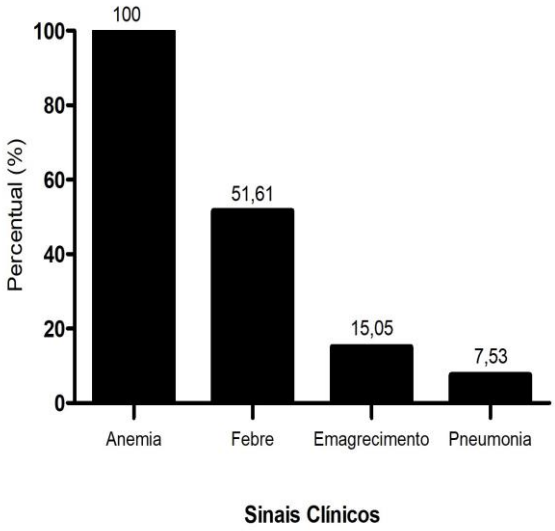

Figura 1: Frequência de sinais clínicos apresentados pelos animais pertencentes ao grupo G2 com sinais clínicos na avaliação realizada.
Fonte: Autora (2018).

As amostras de sangue utilizada para sorologia foram coletas por venopunção da jugular, utilizando agulhas 25 x 0,8mm (BD®) em tubos vacutainer (Vacuette®) contendo ácido etilenodiaminotetracético di-sódico (EDTA) a 10% e em tubos sem anticoagulante. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário de Uberaba-MG em caixa de isopor refrigerada. Os dados epidemiológicos em relação a raça, idade e sexo foram obtidos no momento da coleta.

4.4. AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DOS ANIMAIS

4.4.1. Pesquisa parasitológica de *Babesia bovis, B. bigemina e Anaplasma marginale*

Para a detecção dos agentes etiológicos da TPB foi realizado o esfregaço sanguíneo de ponta de orelha dos animais na propriedade. A técnica consistiu no preenchimento do tubo capilar de vidro coletado da ponta de orelha e feito o esfregaço sanguíneo na propriedade após a coleta. Posteriormente, no laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, confeccionou-se o esfregaço sanguíneo e coloração com Panótico Rápido (Laborclin®). Merozoítos de *B. bovis, B. bigemina* ou mórulas de *A. marginle* foram pesquisados em aumento 1000x por microscopia óptica (NIKON® Eclipse E200). Considerou-se positivas as amostras que apresentaram as formas evolutivas dos agentes etiológicos.

4.4.2. Pesquisa parasitológica de *Trypanosoma vivax*

A pesquisa de *T. vivax* foi realizada pelo BCT segundo Murray, (1977). A técnica consistiu no preenchimento de tubo capilar de vidro para cada amostra de sangue com anticoagulante coleta da jugular, centrifugação a 10000g (Celm®MH) por dez minutos e realização do esfregaço a partir da amostra obtida após a quebra o tubo capilar na fração entre a camada líquida (plasma) e a camada leucocitária. O esfregaço foi corado com Panótico Rápido (Laborclin®) e as formas de tripomastigotas foram pesquisadas em aumento 1000x por microscopia óptica (NIKON® Eclipse E200). Consideraram-se positivas as amostras que apresentaram a forma evolutiva do agente etiológico.

4.5. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DOS ANIMAIS

4.5.1. Sorologia *Babesia bovis, Babesia bigemina e Anaplasma marginale*

A detecção de anticorpos IgG anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* foi realizada por ensaio imunoenzimático indireto – ELISA (Imunotest®) conforme metodologia descrita pelo fabricante (Imunodot Diagnósticos®).

Os soros controles negativos e positivos, bem como dos animais experimentais foram diluídos (1:400) em PBS *Tween* 20 e 100μL/para cada poço foram distribuídos nas placas sensibilizadas. Após incubação por uma hora à 37ºC em câmara úmida e lavagem da placa com PBS *Tween* 20 por três vezes, adicionou-se 100μL/ para cada poço do conjugado anti-IgG bovino. A placa foi novamente incubada por uma hora e lavada como descrito previamente. A reação foi revelada utilizando-se 100μL/ para cada poço do substrato p-nitrofenil-fosfato (PNPP) por 30 a 45 minutos e interrompida adicionando-se 50μL/ para cada poço da solução de bloqueio. A leitura foi realizada no leitor de ELISA Versamax (Molecular Devices®, Sunnyvale, EUA) a 450 nm.

O ponto de corte (*cut-off*) foi obtido a partir da média da densidade óptica (DO) do controle negativo, multiplicada pelo fator 2,5. Amostras com DO superiores ou inferiores ao *cut-off* foram consideradas positivas ou negativas, respectivamente. Os pontos de corte para *B. bovis, B. bigemina* e *A. marginale* foram respectivamente de: 0,115; 0,170 e 0,140.

4.5.2. Sorologia *Trypanosoma vivax*

O teste de imunofluorescência indireta (IFI), utilizado para detectar anticorpos anti-*T.vivax,* foi realizado conforme metodologia descrita por Frange (2013). No momento da reação, as lâminas contendo o antígeno de *T. vivax* foram retiradas do freezer e secas à 37°C por cinco minutos. Os soros foram diluídos (1:80 até 1:1280) e distribuídos nas lâminas contendo o antígeno e incubados por 30 minutos à 37ºC. Em seguida foram realizadas três imersões durante cinco minutos cada uma delas em PBS pH 7,2 (Fosfato de sódio monobásico (NaH2PO4) 0,256%, Fosfato de sódio dibásico (Na2HPO4) 1,178%, NaCl 8,76%, Água destilada qsp 100mL) e posteriormente secagem à temperatura ambiente. Adicionou-se o conjugado anti-IgG de bovino marcado com Isotiocianato de Fluoresceína (Sigma®) na diluição recomendada pelo fabricante (1:200) em azul de Evans (1:50 em PBS *Tween 2*0) e incubação por mais 30 minutos em estufa a 37ºC. Realizaram-se novamente três imersões de cinco minutos em PBS e secagem em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com glicerina tamponada e lamínulas. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse E200®), em aumento de 400X. Foram consideradas positivas as reações com fluorescência com títulos ≥ 1:80 (GARCÍA et al., 2006). Soros de bovinos infectados experimentalmente e não infectados com *T. vivax* foram utilizados como controles positivos e negativos respectivamente na diluição 1:80.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A presença de sinais clínicos nos grupos indicados em relação aos dados epidemiológicos e/ou agentes etiológicos foram tabulados e submetidos à análise estatística pelo teste do Qui-quadrado, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A força de associação foi obtida por meio do cálculo do Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%). Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva, calculando-se a média e o desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Statistica 8.0 (STATSOFT, TULSA, 2008).

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

6.1.1. Distribuição por faixa etária, raça e sexo

Os animais do G1 com idade entre 6 a 7 meses foram os mais prevalentes, já no G2 foram entre 4 a 5 meses apresentando respectivamente 33,33% (31/93) e 34,4% (32/93).

Em relação ao sexo e raça pode-se notar que a maioria dos animais do G1 eram fêmeas 63,44% (59/93) e do G2 era macho 55,92% (52/93) e da raça Holandesa: 95,70% (89/93) do G1 e 89,25% (83/93) do G2. A distribuição dos animais do G1 sem sinais clínicos e ao G2 com sinais clínicos por faixa etária, sexo e raça estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição por faixa etária, sexo e raça dos animais experimentais do G1 sem sinais clínicos e G2 com sinais clínicos.

Faixa Etária	**Grupo 1 (n=93)**		**Grupo 2 (n=93)**	
(Meses)	**Nº**	**%**	**N**	**%**
2 – 3	19	20,43	12	12,90
4 – 5	28	30,10	32	34,40
6 – 7	31	33,33	26	27,95
8 – 9	15	16,14	23	24,75
Sexo				
Fêmea	59	63,44	41	44,08
Macho	34	36,56	52	55,92
Raça				
Holandesa	89	95,70	83	89,25
Girolando	4	4,30	3	3,22
Guzerá			6	6,45
Nelore			1	1,08

Fonte: Autora (2018).

6.2. AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA E SOROLÓGICA

Os animais pertencentes aos grupos G1 e G2, 100% não apresentaram merozoítos de *B. bovis, B. bigemina,* mórulas de *A. marginale*, ou formas tripomastigotas de *T. vivax.*

6.2.1. Sorologia *Babesia bovis, Babesia bigemina, Anaplasma marginale*

Na avaliação sorológica, 75,27% (70/93) e 73,12 (68/93) dos animais do G1 e G2, respectivamente, apresentaram anticorpos frente a um ou mais agentes etiológicos da TPB (*B. bovis, B. bigemia* e *A. marginale*) (Fig. 2).

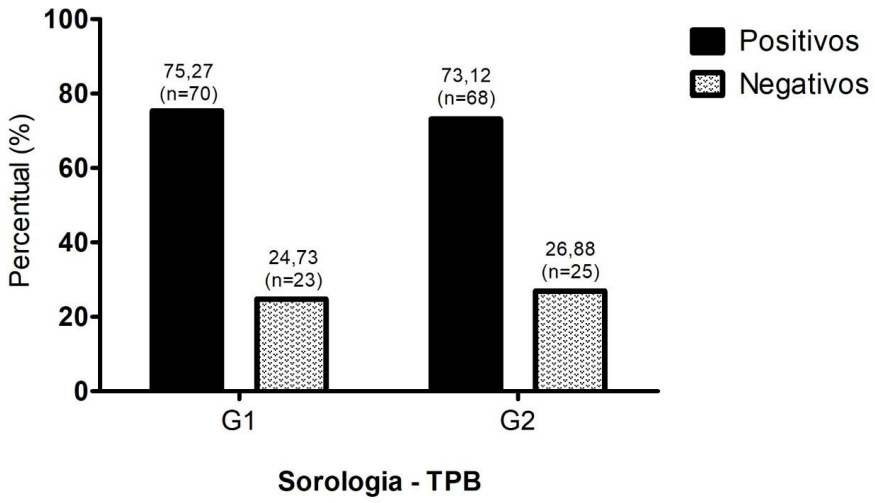

Figura 2: Perfil sorológico dos animais pertencentes aos G1 sem sinais clínicos e G2 com sinais clínicos frente aos agentes etiológicos do complexo Tristeza Parasitária Bovina
Fonte: Autora (2018).

O percentual de positividade frente a um ou mais agentes etiológicos está apresentado na Tabela 2. Notou-se que 65,0% (26/40) dos animais pertencentes ao G1 apresentavam anticorpos para os três agentes etiológicos, e 66,7% (6/9) dos animais do G2 para *B. bovis e B. bigemina.*

Tabela 2: Perfil sorológico dos animais pertencentes aos grupos experimentais frente aos agentes etiológicos do complexo Tristeza Parasitária Bovina.

Agentes etiológicos - Tristeza parasitária bovina	**N (%)**	**Animais**		**OR (IC95%)[1]**	**Valor-p[2]**
	(G1 + G2)	G1(n=93)	G2(n=93)		
Negativos	48 (25,8%)	23 (47,9%)	25 (52,1%)	2,02 (0,85-4,78)	0,110
Anaplasma marginale	6 (3,2%)	3 (50,0%)	3 (50,0%)	1,86 (0,33-10,45)	0,482
Babesia bovis	21 (11,3%)	10 (47,6%)	11 (52,4%)	2,04 (0,70-5,98)	0,193
Babesia bigemina	8 (4,3%)	3 (37,5%)	5 (62,5%)	3,09 (0,64-14,91)	0,159
Anaplasma marginale + *Babesia bovis*	41 (22,0%)	19 (46,3%)	22 (53,7%)	2,15 (0,88-5,26)	0,093
Anaplasma marginale + *Babesia bigemina*	13 (7,0%)	6 (46,2%)	7 (53,8%)	2,17 (0,61-7,71)	0,233
Babesia bovis + *Babesia bigemina*	9 (4,8%)	3 (33,3%)	6 (66,7%)	3,71 (0,80-17,16)	0,093
Anaplasma marginale + *Babesia bovis* + *Babesia bigemina*	40 (21,5%)	26 (65,0%)	14 (35,0%)	1,00	1,000

[1]O *Odds ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%) se refere à chance dos animais com o agente etiológico indicado apresentarem sinais clínicos em relação aos animais coinfectados por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina.*

[2]O valor-p se refere ao resultado do teste do qui-quadrad, comparando-se a presença de sinais clínicos nos grupos indicados em relação aos animais coinfectados com os três parasitos.

6.2.2. Sorologia *T. vivax*

Após a realização da IFI, 21,50% (20/93) dos animais do G1 e 33,33% (31/93) do G2 apresentaram anticorpos anti *T. vivax* (Fig. 3A). Os títulos sorológicos de ambos os grupos estão apresentados na Figura 3B e variaram de 80 a 1280.

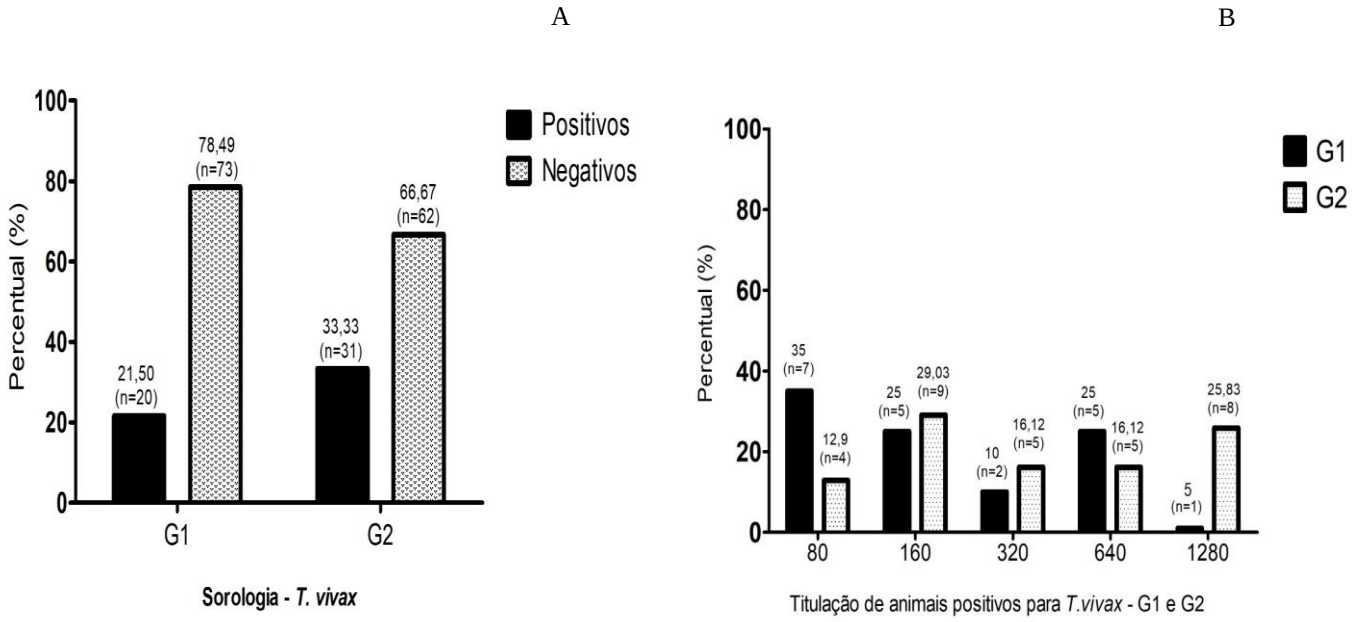

Figura 3: Perfil de anticorpos IgG anti-*T. vivax* dos animais experimentais do G1 sem sinais clínicos e G2 com sinais clínicos (A) e dos títulos sorológicos obtidos na IFI (B).
Fonte: Autora (2018).

Analisando o perfil sorológico dos animais experimentais pertencentes aos G1 e G2 frente aos agentes etiológicos do complexo TPB (*B. bovis, B. bigemina e A. marginale*) e/ou Tripanossomíase (Tabela 3), 70,6% (24/34) dos animais do G2 apresentaram anticorpos frente aos agentes etiológicos estudados na coinfecção (TPB e *T. vivax*) ($p<0,05$). E no G1 a prevalência de anticorpos frente aos agentes etiológicos isolados (anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* e anti-*T. vivax*) foi superior à da coinfecção ($p<0,005$).

Tabela 3: Perfil sorológico dos animais experimentais pertencentes aos grupos G1 sem sinais clínicos e ao G2 com sinais clínicos frente aos agentes etiológicos do complexo TPB e tripanossomíase.

Parasitoses	**N (%)**	**Sinais clínicos**		**OR (IC95%)**	**Valor-p**
	(G1 + G2)	**G1(n=93)**	**G2(n=93)**		
Negativos	31 (16,7%)	13 (41,9%)	18 (58,1%)	0,58 (0,21-1,61)	0,294
TPB	104 (55,9%)	60 (57,7%)	44 (42,3%)	0,31 (0,13-0,70)	0,005
Trypanosoma vivax	17 (9,1%)	10 (58,8%)	7 (41,2%)	0,29 (0,09-0,98)	0,047
TPB + *Trypanosoma vivax*	34 (18,3%)	10 (29,4%)	24 (70,6%)	1,00	1,000

[1]O *Odds ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%) se refere à chance dos animais com a parasitose indicada apresentarem sinais clínicos em relação aos animais coinfectados (TPB + *Trypanosoma vivax*).
[2]O valor-p se refere ao resultado do teste do qui-quadrado, comparando-se a presença de sinais clínicos nos grupos indicados em relação aos animais coinfectados (TPB + *Trypanosoma vivax*).

Analisando os parâmetros (sexo, faixa etária e raça) dos animais do G1 e G2 frente aos agentes etiológicos do complexo TPB (*B. bovis, B. bigemina* e *A. marginale),* tripanossomíase e coinfecção (Tabelas 4) notou-se que os bezerros machos, de 2 a 3 meses de idade e da raça Holandesa do G2 apresentavam mais anticorpos anti *T. vivax* e a coinfecção ($p<0,005$) que os bezerros do G1 (Tab. 4).

Tabela 4: Perfil epidemiológico dos animais experimentais pertencentes aos grupos G1 sem sinais clínicos e G2 com sinais clínicos frente aos agentes etiológicos estudados.

Parâmetros investigados		**Positividade para TPB** N (%)	**OR (IC95%)[1]**	**Valor-p[2]**	**Positividade para *T. vivax*** N (%)	**OR (IC95%)[1]**	**Valor-p[2]**	**Coinfecção TPB + *T. vivax*** N (%)	**OR (IC95%)[1]**	**Valor-p[2]**
	Machos									
	G1	27/34 (79,4%)	1,00	0,950	**4/34 (11,8%)**	**1,00**	**0,041**	**2/34 (5,9%)**	**1,00**	**0,009**
	G2	41/52 (78,9%)	0,97 (0,33-2,80)		**16/52 (30,8%)**	**3,33 (1,01-11,05)**		**15/52 (28,9%)**	**6,49 (1,38-30,54)**	
Sexo	**Fêmeas**									
	G1	43/59 (72,9%)	1,00	0,451	16/59 (27,1%)	1,00	0,314	8/59 (13,6%)	1,00	0,272
	G2	27/41 (65,9%)	0,72 (0,30-1,70)		15/41 (36,6%)	1,55 (0,66-3,65)		9/41 (21,9%)	1,79 (0,63-5,12)	
	2-3 meses									
	G1	12/19 (63,2%)	1,00	0,842	5/19 (26,3%)	1,00	0,075	**1/19 (5,3%)**	**1,00**	**0,012**
	G2	8/12 (66,7%)	1,17 (0,26-5,33)		7/12 (58,3%)	3,92 (0,84-18,22)		**5/12 (41,7%)**	**12,86 (1,27-130,54)**	
	4-5 meses									
	G1	22/28 (78,6%)	1,00	0,751	10/28 (35,7%)	1,00	0,654	5/28 (17,9%)	1,00	0,544
Faixa etária	**G2**	27/33 (81,8%)	1,23 (0,35-4,34)		10/33 (30,3%)	0,78 (0,27-2,29)		8/33 (24,2%)	1,47 (0,42-5,15)	
	6-7 meses									
	G1	23/32 (71,9%)	1,00	0,826	5/32 (15,6%)	1,00	0,291	4/32 (12,5%)	1,00	0,289
	G2	18/26 (69,2%)	0,88 (0,28-2,74)		7/26 (26,9%)	1,99 (0,55-7,22)		6/26 (23,1%)	2,10 (0,52-8,42)	
	8-9 meses									
	G1	13/14 (92,9%)	1,00	0,083	0/14 (0,0%)	1,00	0,079	0/14 (0,0%)	1,00	0,146
	G2	15/22 (68,2%)	0,16 (0,02-1,52)		7/22 (31,8%)	13,07 (0,68-252,20)		5/22 (22,7%)	8,24 (0,41-164,09)	
	Holandesa									
	G1	68/89 (76,4%)	1,00	0,760	20/89 (22,5%)	1,00	0,234	**10/89 (11,2%)**	**1,00**	**0,024**
Raça	**G2**	61/82 (74,4%)	0,90 (0,45-1,80)		25/82 (30,5%)	1,51 (0,76-3,00)		**20/82 (24,4%)**	**2,55 (1,11-5,84)**	
	Girolanda									
	G1	2/4 (50,0%)	1,00	0,465	0/4 (0,0%)	1,00	0,144	0/4 (0,0%)	1,00	0,414
	G2	3/4 (75,0%)	3,00 (0,15-59,89)		3/4 (75,0%)	24,00 (0,59-980,71)		2/4 (50,0%)	8,00 (0,23-273,93)	

Fonte: Autora (2018).

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram agrupados animais sem sinais clínicos da TPB e/ou tripanossomíase G1 e animais com sinais clínicos G2. Os animais G2 apresentaram sinais clínicos de anemia, febre, emagrecimento e pneumonia, que são sinais clínicos observados na TPB e/ou tripanossomíase. Segundo Grisi et al., (2002) os animais acometidos com TPB e tripanossomíase apresentam os mesmos sinais clínicos encontrado no estudo.

Durante avaliação parasitológica, nenhum dos animais pertencentes aos G1 e G2 apresentou merozoíto de *B. Bovis, B. bigemina*, mórulas de *A. marginale,* ou formas tripomastigotas. Quando há uma baixa parasitemia nas infecções subagudas, ou fase crônica da doença, não há visualização do agente no esfregaço sanguíneo, reduzindo a sensibilidade do método (MURRAY et al., 1977; DESQUESNES; TRESSE, 1996; MARTINS et al., 1996; VIDOTTO; MARANA, 2001), justificando a não visualização do parasita na pesquisa parasitológica dos animais do G2.

Notou-se no estudo que 65,0% (26/40) dos animais do G1 apresentavam uma maior prevalência de anticorpos na coinfecção para os três agentes etiológicos (anti-*B. bovis,* anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale),* em relação a 35,0% (14/40) do G2, não apresentando uma diferença significativa ($p<0,005$). Segundo Felsheim et al., (2010) os animais doentes depois de serem tratados podem se tornarem portadores crônicos da doença apresentando anticorpos, porém sem manifestações de sinais clínicos. No presente trabalho observou-se que a ocorrência dos sinais clínicos não está necessariamente relacionada com a presença do agente, porem o agente é capaz de causar sinais clínicos.

A prevalência de anticorpos G1 dos animais sem sinais clínicos é maior quando se avalia as doenças de forma isolada (TPB ou tripanossomíase) em relação à coinfecção (TPB e tripanossomíase), sendo 57,7% (60/104) na TPB e 58,8% (10/17) na tripanossomíase e na coinfecção 29,4% (10/34), apresentando uma diferença significativa ($p<0,005$). Os animais do G1 não apresentaram sinais clínicos, segundo D'ieteren et al., (1998), a maioria dos bovinos infectados evolui para a fase crônica, tornando-se clinicamente assintomáticos. A presença de anticorpo não significa uma infecção ativa, entretanto esses animais já tiveram contato com *T. vivax* ou TPB, uma vez que os anticorpos permanecem persistentes no animal (MATTIOLI et al., 2001; DELAFOSSE et al., 2006).

A prevalência de anticorpos no G2 na coinfecção é de 70,60% (24/34) sendo maior em relação as doenças quando ocorrem de forma isolada com diferença significativa ($p<0,05$), apresentado manifestações de sinais clínicos como anemia, febre, emagrecimento e pneumonia.

Segundo Cuglovici et al., (2010) os diferentes sinais clínicos da doença estão associados com as relações parasito-hospedeiro, interferindo diretamente na resposta imune dos animais. A anemia foi a principal alteração clínica encontrada neste estudo concordando com diversos trabalhos relacionados à infecção por *T. vivax* e TPB (ADAMU et al., 2007; SILVA et al., 1999; SCHENK et al., 2001; PAIVA et al., 2000; BATISTA et al., 2007, CUGLOVICI et al., 2010; CHAMOND et al., 2010; CADIOLI et al., 2012).

Em relação ao sexo notou-se que bezerros machos G2 apresentavam uma maior prevalência de anticorpos quando se tratava de tripanossomíase e de coinfecção com uma diferença significativa ($p<0,005$), comparando G1, porém Botteon et al., (2007) afirma que não há uma diferença quanto à susceptibilidade em relação ao sexo na TPB e tripanossomíase. Acredita-se que os machos são os mais acometidos por não receberem os mesmos cuidados que as fêmeas, por se tratarem de animais com menor valor econômico na bovinocultura de leite.

No G1 e G2 todas as faixas etárias apresentaram anticorpos para anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale* e anti-*T. vivax*, havendo uma diferença significativa ($p<0,005$), na faixa etária entre 2 a 3 meses nas coinfecções dos animais do G2. Embora os animais possam ser infectados em qualquer idade (PUPIN et al., 2018), os animais mais jovens apresentam uma maior resistência devido os níveis de anticorpos colostrais, porém algumas condições epidemiológicas como: o número de vetores no ambiente, estado nutricional e doenças concomitantes podem levar a uma alta taxa de mortalidade (GONÇALVES, 2000; FARIAS, 2007). Segundo Riet-Correa et al., (2007), já foram encontrados animais jovens com tripanossomíase, que podem estar associados à transmissão por moscas hematófagas.

Muito se discute em relação à susceptibilidade da TPB e tripanossomíase entre as raças, o presente trabalho mostrou uma diversidade, como animais da raça Holandês, Girolando, Nelore e Guzerá. Nos animais G2 da raça holandesa na coinfecção houve uma diferença significativa ($p<0,005$). A raça Holandesa de origem europeia é mais sensível às hemoparasitoses, quando comparada as raças zebuínas que são naturalmente mais resistentes (NOGUEIRA; MASSARD; BARREIRA, 1991). Pupin et al. (2018) mostrou que o gado zebu é considerado altamente tolerante e podem desenvolver doenças graves e morrer devido a *Babesia spp. Babesia bovis* acometendo animais de todas as idades.

A TPB e tripanossomíase estão presentes em toda a região de Minas Gerais, que possui um rebanho bovino com 23 milhões de cabeças (IBGE, 2011). Segundo Frange (2013), já houve um surto de tripanossomíase na região de Minas Gerais. A TPB e tripanossomíase geram uma similaridade entre os sinais clínicos, dificultando o diagnóstico correto para ambas as enfermidades (BATISTA et al., 2008).

O diagnóstico deve ser preciso para a correta preconização do tratamento. O tratamento de infecções por *T. vivax* no Brasil é limitado, sendo o aceturato de dimiazeno, que também é utilizado no tratamento de babesiose, a única droga com ação tripanomicida liberada pelo Ministério da Agricultura para uso no território brasileiro (BATISTA et al, 2008; CARVALHO et al., 2008; OSÓSRIO et al,2008). De acordo com alguns trabalhos, a tripanossomíase tratada com aceturato de diminazeno demonstra uma resistência, sendo eficaz apenas na redução da carga parasitária, e não na eliminação do parasita, sendo observada a recorrência de tripomastigotas após dois dias de tratamento (BATISTA et al., 2007, 2008; CADIOLI et al., 2012).

Segundo Ono et al., (2017), animais apresentaram alterações clínicas e hematológicas sugestivas de tripanossomíase, porém em pesquisa parasitológica foram detectados também um ou mais agentes da TPB. Quando se suspeita de tripanossomíase pode ser considerado um diagnóstico diferencial a TPB devido à semelhança de sinais clínicos, que podem ser encontrados em um mesmo animal.

Devido à alta prevalência de tripanossomíase e TPB dentro do rebanho leiteiro em Minas Gerais torna-se necessário o uso de medidas profiláticas e tratamento correto para que a doença não se espalhe para regiões consideradas livres de parasitas, dentro ou fora do estado.

8. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos pode-se concluir que:

- Bezerros holandeses são mais acometidos por B*abesia bovis, Babesia bigemina, Anaplasma marginale* e *Trypanosoma vivax*.
- Testes sorológicos para diagnóstico das hemoparasitoses são de grande valia em estudos epidemiológicos das infecções e coinfecções.
- O diagnóstico diferencial da TPB e tripanossomíase são importantes para a correta preconização do tratamento uma vez que bezerros são acometidos por ambos agentes etiológicos.

REFERÊNCIAS

ADAMU, S.; FATIHU, M. Y.; USEH, N. M.; MAMMAN, M.; SEKONI, V. O.; ESIEVO K. A. N. Sequential testicular and epididymal damage in zebu bulls experimentally infected with Trypanosoma vivax. **Veterinary Parasitology**, v.143, p. 29–34. 2007.

ALMEIDA, M. B.; TORTELLI, F. P. Y.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J. L. M.; SOARES, M. P.; FARIAS, N. A. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978 a 2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 26, n. 4, p. 237-242, 2006.

AQUINO, L. P. C. T.; MACHADO, R. Z.; LEMOS, K. R.; MARQUES, L. C.; GARCIA, M.; V.; BORGES, G. P. Antigenic characterization of Trypanosoma evansi using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 112-118. 2010.

ARAÚJO, E. R.; MADRUGA, C. R.; ALMEIDA, M. A. O.; LEAL, C. R. B.; MIGUITA, M. Levantamento sorológico de Babesia bovis e Babesia bigemina no Estado da Bahia pela Imunofluorescência Indireta e Teste de Conglutinação Rápida. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 111-115, 1997.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; LEAL, C. R. B.; BASTOS, P. A. S.; MARQUES, A. P. C. Frequência de anticorpos anti Anaplasma marginale em rebanhos leiteiros da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 1998; 50(3):243-6.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H. Progressos na imunização contra Anaplasma marginale. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 139-148, 2003.

BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. G.; MADRUGA, C. R.; SIMÕES, S. D. V.; MAIA, T. F. Trypanosomiasis by Trypanosoma vivax in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. Veterinary Parasitology. v.143, p.174-181. 2007.

BATISTA, J. S.; BEZERRA, F. S. B.; LIRA, R. A.; CARVALHO, J. R. G.; ROSADO NETO, A. M.; PETRI, A. A.; TEIXEIRA, M.G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por Trypanosoma vivax na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.1, p. 63-69, jan. 2008.

BARROS, A. T. M. **Aspectos do controle da mosca-dos chifres e manejo de resistência.** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2005. 23p. (Embrapa Pantanal. Documentos, 77).

BEZERRA, F. S. B; BATISTA, J. S. **Efeitos da infecção por Trypanosoma vivax sobre a reprodução: uma revisão.** Acta Veterinaria Brasilica, v.2, n.3, p.61-66, 2008.

BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, sup. 51, p. S247-S269, 2004. BÖSE.

BROWMAN, D. D. Artrópodes. In: _____. **Parasitologia Veterinária de Georgis. Barueri**, SP: Manole, 2006. cap. 1, p. 1-81.

CADIOLI, F. A.; DE ATHAYDE BARNABÉ, P.; MACHADO, R. Z.;TEIXEIRA, M. C. A.; ANDRÉ, M. R.; SAMPAIO, P. H.; FIDELIS JUNIOR, O. L.; TEIXEIRA, M. M. G.; MARQUES, L. C.. First report of Trypanosoma vivax outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil**. Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, p. 118-124, 2012.

SILVA, R. A. ; CORREA, F. N. ; BOTTEON, R. C. C. M. ; BOTTEON P.T.L. . Infecção natural por hemoparasitos em bezerros submetidos à quimio-profilaxia aos 30 dias de idade. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria,** v. 16, p. 163-165, 2007.

CANTÚ-MARTÍNEZ, M. A.; SALINAS-MELÉNDEZ, J. A.; ZARATE-RAMOS, J. J.; ÁVALOS-RAMÍREZ, R.; MARTÍNEZ-MUNOZ, A.; SEGURA-CORREA, J. C. Prevalence of antibodies against Babesia bigemina and B. bovis in white-tailed deer (Odocoileus virginianus texanus) in farms of northeastern Mexico. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 2, p. 121-123, 2008.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of Anaplasma marginale DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 1-2, p. 107114, 2007.

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

CARVALHO, G. R. A indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro. **Circular Técnica**. Juiz de Fora: Embrapa, 2010.

CHAMOND, N.; COSSON, A.; BLOM-POTAR, M. C.; JOUVION, G.; D'ARCHIVIO, S.; MEDINA, M.; DROIN-BERGE'RE, S.; HUERRE, M.; GOYARD, S.; MINOPRIO, P. Trypanosoma vivax Infections: Pushing Ahead with Mouse Models for the Study of Nagana. I. Parasitological, Hematological and Pathological Parameters. **Neglected Tropical diseases**, v.4, n.8, p.1-10. 2010.

CUGLOVICI, D. A., BARTHOLOMEU, D. C.; REIS-CUNHA, J. L.; CARVALHO, A. U.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiologic aspects of an outbreak of Trypanosoma vivax in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.11, n.3-4, p.320-326. 2010.

DALGLIESH, R. J.; STEWART, N. P. The use of tick transmission by Boophilus microplus to isolate pure strains of Babesia bovis, Babesia bigemina and Anaplasma marginale from cattle with mixed infections. **Veterinary Parasitology**, v. 13, n. 4, p. 317-323, 1983. DIAS, R. O. S. Quimioprofilaxia da babesiose bovina. 2001.

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

DA SILVA, N. B.; TAUS, N. S.; JOHNSON. W. C.; MIRA, A.; SCHNITTGER, L.; VALENTE, J. D. M.; VIDOTTO, O.; MASTERSON, H. E.; VIEIRA, T. S. W.; UETI, M.; VIEIRA, R. F.C, First report of Anaplasma marginale infection in goats, Brazil. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0202140, 2018.

D'IETEREN, G. D. M.; AUTHI'E, E.; WISSOCQ, N.; MURRAY, M. Trypanotolerance, an option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomosis. OIE **Revue Scientifique et Technique**, v.17, n.1, p.154–175. 1998.

DELAFOSSE, A.; THÉBAUD, E.; DESQUESNES, M.; MICHAUX, Y. Epidemiology of Trypanosoma vivax infection in cattle in the tse-tse free area of Lake Chad. **Preventive Veterinary Medicine,** v.74, p.108–119. 2006.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de Trypanosoma vivax. **Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.49, n.315-321. 1996.

DESQUESNES, M.; DIA, M. L. Mechanical transmition of Trypanosoma vivax in cattle by African tabanid Atylotus fuscipes . **Vet. Parasitol**. , v. 119, p. 9 - 19, 2004.

EISLER M. C.; LESSARD P.; MASAKE R. A.; MOLOO S. K.; PEREGRINE A. S.; Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of Trypanosoma congolense and Trypanosoma vivax infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 187-201, 1998.

ESPINOZA, E.; GONZÁLEZ, N.; ASO, P.; CABALLERO, H.; FUENMAYOR, J.; HIDALGO, L. Leucograma en novillas y becerros (Holstein) Infectados con una cepa venezolana de Trypanosoma vivax. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.3, p.647-652. 2000.

FARIAS, N. A., 2007. Cattle tick fever. In: 3a ed. In: Riet-Correa, F., Schild, A.L., Lemos, R.A.A., Borges, J.R.J. (Eds.), **Doenças de Ruminantes e equídeos**. 2. Pallotti, Santa Maria, pp. 524–532.

FELSHEIM, R. F.; CHÁVEZ, A. S. O.; PALMER, G. H.; CROSBY, L.; BARBET, A. F.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. Transformation of Anaplasma marginale. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 167-174, 2010.

FRANGE, R. C. C. **Tripanossomíase em vacas da microrregião de Uberaba – MG**: Estudo Soroepidemiológico e Relato de Surto. 2013, 76f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba – UNIUBE, Uberaba, 2013.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. **Controle estratégico do carrapato bovino**. A Hora Veterinária. v.23, n.137, p. 53-54, 2001.

GALIZA, G. J. N.; GARCIA, H. A.; ASSIS, A. C. O.; OLIVEIRA, D. M.; PIMENTEL, L. A.; DANTAS, A. F. M.; SIMÕES, S. V. D.; TEIXEIRA, M. M. G.; RIET-CORREA, F. High mortality and lesions of the central nervous system in Trypanosomosis by Trypanosoma vivax in Brazilian hair sheep. **Veterinary Parasitolog**y, n.182, p.359363, 2011.

GANYO, E. Y.; BOAMPONG, J. N.; MASIGA, D.; VILLINGER, J. Haematology of N'Dama and West African Short Horn cattle herds under natural Trypanosoma vivax challenge in Ghana. **F1000Research**, v. 7, 2018.

GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of Trypanosoma vivax. **Advances in Parasitology**, v.28, p.229-317. 1989.

GONZALES, J. C. O ecossistema do carrapato do boi. **In: _____**. O controle do carrapato. Porto Alegre: 2 edição do autor, 1995. cap. 5, p. 35-77.

GONÇALVES, P. M. **Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região Sudeste do Brasil**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 187-194, 2000.

GONZATTI, M. I.A. M.; GONZÁLEZ-BARADAT, B.; ASO, P. M.; REYNA-BELLO, A. Trypanosoma (Duttonella) vivax and Trypanosomosis in Latina America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. **In**: MAGEZ, S.; RADWANSKA, M. Trypanosomes and Trypanosomiasis. Springer-Verlag Wien, London, 2014.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B. **Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil.** A Hora Veterinária, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GUEDES JUNIOR, D. S.; ARAÚJO, F. R.; SILVA, F. J. M.; RANGEL, C. P.; BARBOSA NETO, J. D.; FONSECA, A. H. Frequency of antibodies to Babesia bigemina, B. bovis, Anaplasma marginale, Trypanosoma vivax and Borrelia burgdorferi in cattle from the Northeastern region of the State of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

GUERRA, R. M. S. N. C.; FEITOSA JÚNIOR, A. B.; SANTOS, H.P.; ABREU-SILVA, A. L.; SANTOS, A. C. G. Biometryof Trypanosoma vivax found in a calf in the state of Maranhão, **Brazil. Ciência Rural**, v.38, n.3, mai-jun, 2008.

GUERREIRO, L. T. A. **Identificação e caracterização de minicírculos de Trypanosoma vivax através de geração e análise de GSS (Genome Sequence Survey).** 82 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

HOARE, C. A. The Trypanosomoses of mamals. **Blackwell Scientific Publication,** Oxford: Blackwell, 1972. 749p.

HOLMES, P. H. New approaches to the control of trypanosomasis. **Veterinay Parasitology**, v.71, p.121-135, 1997.

JONES, T.; DÁVILA, A. M. R. Trypanosoma vivax out of África. **Trends in Parasitology**, v.2, n.17, p.99-101. 2001.

JULIANO, R. S.; MACHADO, R. Z.; FIORAVANTI, M. C. S.; ANDRADE, G. M.; JAYME, V. S. Soroepidemiologia da babesiose em rebanho de bovinos da raça curraleiro. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1387-1392, 2007.

KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. M.; RIBEIRO, O. C. Babesiose cerebral por Babesia bovis (Babés 1888 Starcovici 1893) em bezerros no Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18, n. 8, p. 931-935, 1983.

KIESER, S. T.; ERIKS, I. S.; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent Anaplasma marginale infection of cattle. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p. 1117-1119, 1990.

KIMETO, B. A.; MUGERA, G. M.; NYAGA, P. N. Haemorrhagic pancarditis in cattle infected with Trypanosoma vivax. **Veterinary Parasitology**, v.34, p.295-301.1990.

KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. The natural history of Anaplasma marginale. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 95-107, 2010.

LIMA, F. V. A.; MOLNÁR, E.; MOLNÁR, L.; SILVA, C. M. S. Exames soroepidemiológicos da babesiose bovina (Babesia bovis) através de um teste ELISA indireto no Estado do Pará. **Revista de Ciências Agrárias** (Belém), n. 32, p. 55-64, 1999.

LINHARES, G. F. C.; DIAS FILHO, F. D.; FERNANDES, P. R.; DUARTE, S. C.; Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins. Relato de Caso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 455-460, 2006.

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R.H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEIREDO, G. R.; CURVO, J. B. E. Níveis de anticorpos anti-Babesia bigemina e Babesia bovis em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamento de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 9, p. 1163-1168, 1984.

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

MASAKE, R. A. The pathogenesis of infection with Trypanosoma vivax in goats and cattle. **Veterinary Record**, v.107, p.551–557. 1980.

MASSARD, C. L.; FREIRE, R. B. **Etiologia, manifestações e diagnóstico das babesioses bovinas no Brasil.** A Hora Veterinária, v. 4, n. 23, p. 53-56, 1985.

MARANA, E. R. M.; DIAS, J. A.; FREIRE, R. L.; VICENTINI, J. C.; VIDOTTO, M. C.; VIDOTTO, O. Soroprevalência de Anaplasma marginale em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 20-26, 2009.

MARTINS, J. R.; CORRÊA, B. L.; CERESÉR, V. H. Estudo comparativo entre as provas de Elisa e Imunofluorescência Indireta (IFI) para detectar anticorpos contra Babesia bovis. **Ciência Rural**, v. 26, n. 1, p. 115-118, 1996

MATTIOLI, R.C.; FAYE, J. A.; JAITNER, J. Estimation of trypanosomal status by the buffy coat technique and an antibody ELISA for assessment of the impact of trypanosomosis on health and productivity of N'Dama cattle in The Gambia. **Veterinary Parasitology**, v.95, p.25–35. 2001.

MBEWE, N. J.; NAMANGALA, B.; SITALI, L.; VORSTER, I.; MICHELO, C. Prevalence of p athogenic trypanosomes in anaemic cattle from trypanosomosis challenged áreas of Itezhi - tezhi district in central Zambia. **Parasit. Vetctors**, v. 8, p. 1 - 6, 2015.

MEKURIA, S.; GADISSA, F. Survey on bovine trypanosomosis and its vector in Metekel and Awi zones of Northwest Ethiopia. **Acta Tropica**, 117, 146–151, 2011.

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

NOGUEIRA, F. R. C., MASSARD, C. L., BARREIRA, J. D. Tristeza parasitária bovina. Epidemiologia, sinais clínicos, diagnóstico, medidas de controle e profilaxia. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, EMBRAPA - PESAGRO, 1991. n. 12, 14 p. **Circular Técnico**.

ODENIRAN, P. O., MACLEOD, E. T.; ADEMOLA, I. O.; WELBUM, S. C. Molecular identification of bovine trypanosomes in relation to cattle sources in southwest Nigeria. **Parasitology international**, v. 68, n. 1, p. 1-8, 2019.

ONO, N. S. B., SOUT, P. C., CRUZ. J. A. L. O., GUERRA, N. R., GUIMARÃES, J. A., DANTAS A. C., ALVES l. C. Surto de Trypanosoma vivax em rebanhos bovinos na Zona da Mata do estado de Pernambuco, 2017 **Medicina Veterinária** (UFRPE).

OSAKI, S. C.; VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M.; VIDOTTO, M. C.; YOSHIHARA, E.;PACHECO, R. C.; IGARASHI, M.; MINHO, A. P. Ocorrência de anticorpos anti Babesia bovis e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 77-83, 2002.

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

PAIVA, F.; LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO, L.; MORI, A.E.; BRUM, K.B.; BERNARDO, K.C. *Trypanosoma vivax* em bovinos no pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: I – acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.2, p.135141. 2000.

PAIVA, E. **Tripanossomíase por Trypanosoma vivax em pequenos ruminantes: descrição de surtos e infecção experimental da doença**. 84f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Rio Grande do Norte, 2009.

PIMENTEL, D. S.; RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; BORBA, M. L.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. First report and molecular characterization of Trypanosoma vivax in cattle from state of Pernambuco, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.185, p.286-289. 2012.

PUPIN, R. C.; GUIZWLINI, C. C.; LEMOS, R. A. A.; MARTINS, T. B.; BORGES, D. G. L.; GOMES, D. C. Retrospective study of epidemiological, clinical and pathological findings of bovine babesiosis in Mato Grosso do Sul, Brazil (1995–2017). **Ticks and tick-borne diseases**, 2018.

RIET-CORREA, F. Tripanossomíase bovina. **In**: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES J. R. J. Doenças de ruminantes e equinos. 3ª ed. São Paulo: Varela, 2007. p. 696-701.

SANTOS, T. R. B.; GONZALES, J. C.; CHIES, J. M.; FARIAS, N. A. R. Transmissão transovariana de Babesia bigemina, (SMITH & KILBORNE, 1893) por partenóginas de Boophilus microplus (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 7-10, 1998.

SANTOS, H. Q.; LINHARES, G. F. C.; MADRUGA, C. R. Estudo da prevalência de anticorpos anti- Babesia bovis e anti-Babesia bigemina em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e elisa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 133-137, 2001.

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n.4, p. 157-161. 2001.

SERRA-FREIRE, N. M.; REZENDE, A. M. L. Stomoxys calcitrans, um vetor mecânico do Trypanosoma vivax no Brasil e notas sobre o comportamento do parasito no vetor. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.11, n.1, p.77-82, 1988.

SEQUEIRA, T. C. G. O.; AMARANTE, A. F. T. Filo Protozoa. **In**: _____. Parasitologia Veterinária: animais de produção. Rio de Janeiro: EPUB, 2001. cap. 3, p. 4774.

SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A.; FREITAS, J.; MORALES, G.; EULERT, E.; YBANEZ, R.; MONTENEGRO,A.; DÁVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L. Tripanossomose bovina por Trypanosoma vixax no Brasil e Bolívia: Sintomas clínicos, diagnósticos e dados epizootiológicos. **Embrapa**, Corumbá-MS, 17p., 1997.

SILVA, R. A. M. S.; RAMIREZ, L.; SOUZA, S. S.; ORTIZ, A. G.; PEREIRA, S. R.; DÁVILA, A. M. R. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.87–93. 1999.

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

SILVA, R. A. M. S.; PELLEGRIN, A. O.; LIMA, E. S. S.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. Abortos por Trypanosoma vivax no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia. **Embrapa**, Corumbá-MS,21p. 2004.

SILVA, R. A.; CORRÊA, F. N.; BOTTEON, R. C. C. M.; BOTTEON, P. T. L. Infecção natural por hemoparasitos em bezerros submetidos à quimio-profilaxia aos 30 dias de idade. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 163-165, 2007.

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

SINGH, H.; MISHRA, A. K.; RAO, J. R. Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of Babesia bigemina infection in bovines. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 2, p. 153159, 2009.

SOARES, C. O.; SOUZA, J. C. P.; MADRUGA, C. R.; MADUREIRA, R. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de Babesia bovis em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; SCOFIELD, A.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de Anaplasma marginale em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 97-101, 2000a.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C. R.; CUNHA, N. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de Babesia bigemina em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 20, n. 1, p. 26-30, 2000b.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; MASSARD, C. L. Prevalência de anticorpos anti Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do médio Paraíba. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 309-314, 2001.

SOUZA, F. A. L.; LIARTE, A. S. C.; CASTRO, K., N. C.; BESERRA, E. E. A.; BERNARDI, J. C. M.; SOUSA, G. V.; COSTA JUNIOR, L. M.; SILVA, S. M. M. S. Dynamics of natural infection by Babesia bovis and Babesia bigemina in dairy cattle from an enzootic instability area in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.

SOW, A., SIDIBE, I., BENGALY, Z., MARCOTTY, T., SERE, M., DIALLO, A., ET AL. (2012) Field detection of resistance to isometa- midium chloride and diminazene aceturate in Trypanosoma vivax from the region of the Boucle du Mouhoun in Burkina Faso. **Vet Parasitol** 187: 105–111.

STEVENSON, P.; OKECK, G.; MWENDIA, C.; SONES, K. R. Comparison of the isometamidium - based trypanocidal drugs Samorin ® and Veridium ® in cattle under field conditions at Nguruman, Kenya. **Acta Trop**. , v.77, p.195 - 201, 2000.

TERKAWI, M. A.; ALHASAN, H.; HUYEN, N. X.; SABAGH, A.; AWIER, K.; CAO, S.; GOO, Y. K.; ABOGE, G.; YOKOYAMA, N.; NISHIKAWA, Y.; KAILB-ALLOUZ, A. K.; TABBAA, D.; IGARASHI, I.; XUAN, X. Molecular and serological prevalence of Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle from central region of Syria. **Vet Parasitol** 2011; 187(1-2): 307-311. PMid:22265803.

UILENBERG, G. Babesia – A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 2006.

VENTURA, R. M.; PAIVA, F.; SILVA, R. A. M. S.; TAKEDA, G. F.; BUCK, G. A.; TEIXEIRA, M. M. G. 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,** v. 99, p. 37–48. 2001.

VIDOTTO, O.; ANDRADE, G. M.; AMARAL, C. H. S.; BARBOSA, C. S.; FREIRE, R. L.; ROCHA, M. A.; VIDOTTO, M. C. Frequência de anticorpos contra Babesia bigemina, B. bovis e A. marginale em rebanho leiteiro da região de Londrina, Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 49, n. 5, p. 655-659, 1997.

VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M. Diagnóstico em anaplasmose bovina. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 361-368, 2001.

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

ZIEMANN, 1905 in bovine of the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1996;52:561-562.