

Comparação de métodos de extração do DNA e avaliação de reações da polimerase em cadeia (PCR) para o diagnóstico de *Trypanosoma (Duttonella) vivax*

Introdução

A introdução de *Trypanosoma vivax* na América Latina ocorreu por meio de gado zebu importado do Senegal para Guiana Francesa e Antilhas, e no Brasil, o primeiro registro desse hemoprotozoário foi feito no Estado do Pará (SHAW; LAISON, 1972). Até recentemente, a distribuição de *T. vivax* estava restrita à região Norte do país. Entretanto, em 1995, Silva et al. (1995) diagnosticaram esse hemoparasito em um rebanho bovino do Pantanal do Estado de Mato Grosso, município de Poconé. Posteriormente, a tripanossomíase por essa espécie de *Trypanosoma* foi diagnosticada em Mato Grosso do Sul, no Pantanal do município de Miranda e da Nhecolândia (PAIVA et al., 2000; DÁVILA et al., 2003).

Como em outros países da América Latina, os surtos descritos no Pantanal foram severos e os animais apresentavam temperatura elevada, letargia, fraqueza, anemia, perda da condição física, lacrimejamento, diarreia e aborto (SILVA et al., 1996). Embora *T. vivax* ocorra endemicamente em vários países da América Latina, surtos com essas características são esporádicos e, mesmo assim, a tripanossomíase bovina é considerada economicamente relevante (OTTE et al., 1994).

Em decorrência do aumento da área com incidência endêmica de *T. vivax* no Brasil e da presença desse hemoprotozoário em vários países da América Latina (DÁVILA et al., 2003), provocando perdas econômicas importantes para a bovinocultura (SEIDL et al., 1999), o diagnóstico epidemiológico e etiológico tornam-se imprescindíveis.

Os exames parasitológicos, como o método de Woo (1969), apresentam elevada especificidade. Entretanto, a sensibilidade é considerada baixa na fase crônica da infecção, por causa da reduzida população de hemoprotozoários no sangue dos animais infectados (NANTULYA, 1990). O teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) para detecção de antígeno de *T. vivax*, que inicialmente foi descrito como possuidor de sensibilidade maior que o teste de Woo (MASAKE et al., 1995), apresentou desempenho inferior a essa prova parasitológica quando utilizado em estudos epidemiológicos na África e América Latina (EISLER et al., 1996). O ELISA para diagnóstico de anticorpos contra *T. vivax* tem grande aplicabilidade para estudos epidemiológicos, mas, por ser um método de diagnóstico indireto, não é o mais apropriado para o diagnóstico etiológico (MAGONA et al., 2002). A detecção do ácido desoxirribonucléico (DNA) das diferentes espécies de *Trypanosoma*, por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR), é uma alternativa de teste com elevada sensibilidade e especificidade como foi demonstrado para diversos parasitos de importância veterinária (ZARLENGA; HIGGINS, 2001), inclusive *T. vivax* (DESQUESNES; TRESSE, 1996; MASAKE et al., 1997; GEYSEN et al., 2003; DELESPAUX et al., 2003). A PCR com *primers* desenhados com base em seqüência repetitiva do gene que codifica o antígeno de 8 kDa detectou 75% de bovinos positivos em um grupo de animais infectados experimentalmente, contra 42% no método

Campo Grande, MS
Abril, 2006

Autores

Cláudio Roberto Madruga
Médico-veterinário,
Ph.D. em Parasitologia,
pesquisador da Embrapa
Gado de Corte, Campo
Grande, MS,
madruga@cnpqg.embrapa.br

Flábio Ribeiro de Araújo
Médico-veterinário,
Ph.D. em Imunologia,
pesquisador da Embrapa
Gado de Corte, Campo
Grande, MS,
flabio@cnpqg.embrapa.br

**Manoel Sebastião da
Costa Lima Júnior**
Biólogo, Mestrando em
Ciência Animal UFMS,
Campo Grande, MS,
manoelpax@ig.com.br

**Elaine Silva de Pádua
Melo**
Bióloga, Mestranda em
Ciência Animal UFMS,
Campo Grande, MS,
elaine@cnpqg.embrapa.br

de diagnóstico parasitológico, e 55% no ELISA para detecção de antígeno de *T. vivax* (MASAKE et al., 1997). Entretanto, o DNA utilizado nessa PCR, como em outras reações, é extraído pelo processo de fenol/clorofórmio ou com *kits* comerciais que são laboriosos e de custo elevado. Alternativas que tornam a extração de DNA mais rápida e econômica têm sido descritas (MORLAIS et al., 1998), o que torna prático e econômico o emprego da PCR, principalmente como ferramenta de estudo epidemiológico. Apesar da aparente simplicidade, na PCR existe uma complexa interação entre os componentes da prova, fazendo com que pequenas variações produzam alterações no resultado. Embora essa complexidade seja maior no *semi-nested*, a sensibilidade desse tipo de PCR tem sido constatada como maior e conseqüentemente mais apropriada para diagnóstico (GEYSEN et al., 2003; DELESPAUX et al., 2003).

O rDNA composto dos genes 18S, 5,8S e 28 S rRNA, bem como diversos *internal transcribed spacer* (ITS) e flanqueadas por regiões não transcritas, possui múltiplas cópias (DESQUENES et al., 2001). As seqüências que tenham elevada homologia entre espécies, como a região ITS dos genes ribossomais, podem, também, ser utilizadas como teste diagnóstico para diversas espécies de um mesmo gênero de parasito ou até mesmo espécie-específico em função do tamanho dos fragmentos do *amplicon*. A análise dos *amplicons* pode ser realizada diretamente (NJIRU et al., 2005) ou por meio de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP), usando as enzimas de restrição (GEYSEN et al., 2003).

Neste trabalho, foram avaliadas PCRs anteriormente descritas por Masake et al. (1997) e Geysen et al. (2003) e uma outra que utiliza *primers*, que tem seqüências complementares ao gene que codifica a proteína de transporte da glicose, desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte. O objetivo foi identificar a PCR de maior sensibilidade com relação ao exame parasitológico e analisar a eficiência da extração de DNA da camada de leucócitos adsorvidos em papel com a metodologia usual que está baseada no fenol/clorofórmio.

Metodologia

Para avaliar a sensibilidade dos exames parasitológicos de extensão delgada de sangue corada com May-Grunwald-Giemsa e teste de Woo (1969), verificados com aumento de 400x, e das reações da polimerase em cadeia, um bovino da raça Holandesa, de 26 meses de idade, e outro da Aberdeen-Angus, com oito meses de idade, foram inoculados com isolados de *T. vivax*, respectivamente de Poconé, Mato Grosso, e isolado de Aquidauana, Mato Grosso do Sul. Esses animais foram mantidos na área de isolamento da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. Esses animais foram considerados livres de infecção por *T. vivax*, após a realização de exames parasitológicos (WOO, 1969) e sorológicos por imunoadsorção enzimática indireta para detecção de anticorpos contra esse hemoparasito (MADRUGA et al., 1999).

Para análise de sensibilidade de infecção crônica, amostras de sangue de capilares da orelha do bovino da raça Holandesa foram obtidas a partir de 317 dias pós-inoculação, enquanto que as amostras de sangue do bovino Aberdeen-Angus com infecção recente foram colhidas a partir de dez dias pós-inoculação. O monitoramento dos animais foi realizado durante 33 dias com colheita de sangue três vezes por semana. Uma alíquota do sangue em tubo capilar com heparina foi centrifugada para impregnação da camada leucocitária em papel-filtro (FPA-Whatman BioScience), e posterior extração de DNA, de acordo com a técnica descrita por Geysen et al. (2003), que utilizou a resina Chelex 100 (Bio-Rad).

Para a extração de DNA de 300 µL de sangue total foi utilizado o *kit* Easy-DNA™ (Genomic Isolation-Invitrogen), conforme especificações do fabricante. O DNA extraído por ambos os métodos foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com solução de brometo de etídeo (5 µg/mL), e a concentração do DNA foi mensurada por espectrofotômetro a 260nm (Gene-Quant, Amersham Pharmacia). O DNA de *Trypanosoma evansi* foi extraído apenas do sangue total com o *kit* comercial, pois a finalidade era determinar o tamanho do *amplicon* comparativamente ao de *T. vivax* na PCR/18ST *semi-nested*.

No diagnóstico molecular foram realizadas três diferentes reações de PCR. Na primeira foram utilizados *primers* com base na seqüência do gene de

transporte da glicose (PCR/GTP) (acesso GenBank L47540); a segunda, fundamentada na seqüência do gene que codifica uma proteína solúvel de 8kD (acesso GenBank L25129), conservada entre os isolados de *T. vivax* (PCR/TV), descrita por Masake et al., 1997. A terceira PCR foi *semi-nested* (PCR/18ST), sendo utilizada a seqüência do gene da subunidade ribossomal (acesso GenBank U22316) para o desenho dos *primers* (GEYSEN et al. 2003). As seqüências dos *primers* utilizados nas reações de PCR são mostradas na Tabela 1.

A PCR/GTP foi realizada em um volume total de 50 µL tampão 10x (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3), 500 µM de MgCl₂, 400 µM de cada dNTPs, 20pMol de cada *primer* (GTP-F e GTP-R), 2,5U de *Taq* DNA polimerase e 2 µL de DNA). A programação para

amplificação do DNA foi realizada em 30 ciclos de 92°C por um minuto para desnaturação, 50°C por um minuto para anelamento e 72°C por um minuto para extensão. A PCR/TV foi executada conforme a descrição de Masake et al. (1997) e a PCR/18ST *semi-nested*, de acordo com Geysen et al. (2003). Os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio 5 µg/mL, visualizados em transluminador ultravioleta (UV) e documentados no programa AlphaDigidoc TM (Alfa Innotech). DNA genômico de isolado brasileiro de *Trypanosoma evansi* foi extraído com o *kit* Easy-DNA™ (Genomic Isolation-Invitrogen) para análise de diagnóstico diferencial entre as duas espécies de tripanossomas de bovinos endêmicas no Brasil. Na análise estatística dos resultados dos testes de diagnóstico para *T. vivax* foi empregado o quiquadrado e o teste t.

Tabela 1. Seqüências dos *primers* utilizados nas três reações da polimerase em cadeia (PCR) para diagnóstico de *Trypanosoma vivax* e estimativa do número de pares de base dos *amplicons*.

PCR	Oligonucleotídeos	Amplicons (pb)
PCR/GTP	GTP-f (5' - AATGGCTTCTCCATTGGGTTC - 3')	210
	GTP-r (5' - ATGGAGCAGGCAAAGAGACC - 3')	
PCR/TV	TVA-f (5' - CAGCTCGGCGAAGGCCACTTGGCTGGG - 3')	400
	TVB-r (5' - GCTACCACAGTCGCAATCGTCTCAAGG - 3')	
PCR/18ST <i>standard</i>	18STnF2 (5' - CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA - 3')	710
	18STnR3 (5' - TGCGCGACCAATAATTGCAATAC - 3')	
PCR/18ST <i>semi-nested</i>	18STnF2 (5' - CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA - 3')	616
	18STnR2 (5' - GTGTCTTGTTCTCACTGACATTGTAGTG - 3')	

Resultados e Discussão

Durante o período de monitoramento, foi verificada a presença de *T. vivax* no esfregaço sangüíneo corado com May-Grünwald-Giemsa e exame de Woo em ambos os bovinos utilizados no experimento. O desempenho estatisticamente idêntico do exame por esfregaço de sangue e o de microhematócrito (WOO, 1969) não era esperado, pois esse último teste tem sido considerado como de maior sensibilidade (NANTULYA, 1990). Possivelmente, a colheita do sangue a partir de capilares sangüíneos da orelha tenha aumentado a sensibilidade. Isto o torna um teste de maior praticidade para identificação da espécie de tripanossoma, uma vez que a morfologia

poderá ser analisada, enquanto que na prova do microhematócrito a identificação da espécie é estabelecida pela observação do movimento e do tamanho do hemoprotozoário, o que fornece um resultado subjetivo.

O maior número de resultados positivos no exame parasitológico do sangue do bovino com infecção recente era esperado, embora o animal com infecção crônica tenha permanecido portador durante o período experimental, o que foi comprovado pelo resultado positivo na última amostragem em ambas as provas parasitológicas. A detecção de *T. vivax* nos exames parasitológicos está principalmente associada às recidivas de parasitemia que ocorrem nos animais com infecção crônica, por causa da variação antigênica das

denominadas glicoproteínas variáveis de superfície (VGS) dos tripanossomas (DUBOIS et al., 2005). Entretanto, normalmente esses animais têm baixo número de *T. vivax* na circulação em consequência da resposta imune ou estão ausentes por causa do seqüestro no sistema nervoso central ou humor aquoso (WHITELAW et al., 1988). A baixa sensibilidade das provas parasitológicas em animais com infecção crônica já havia sido constatada em experimentos de infecção experimental (GARDINER, 1989) ou em estudos epidemiológicos quando comparada a outras técnicas (MAGONA et al., 2003).

As reações de PCR/GTP e PCR/TV PCR com DNA extraído do papel-filtro mostraram um número menor de reações positivas que as provas parasitológicas, mesmo quando foram detectados mais de cinco parasitos no teste de Woo (Tabela 2). Em estudo epidemiológico foi observada situação semelhante na

qual o teste parasitológico diagnosticou a presença de *T. vivax* enquanto a PCR foi negativa (GONZALEZ et al., 2003). Os fatores que possivelmente contribuíram para esse resultado foram a baixa eficiência da extração do DNA pelo método do papel e a sensibilidade dessas PCRs. Isso é confirmado pelo fato de que a PCR/18ST *semi-nested* detectou um número significativamente maior de reações positivas com o DNA extraído por essa metodologia, e que o número de reações positivas apresentadas pelas PCRs foram maiores quando o DNA foi extraído diretamente do sangue pelo *kit* comercial, no animal com infecção crônica (Tabela 2). Os resultados do animal com infecção recente confirmam as hipóteses mencionadas, porque as provas parasitológicas detectaram um maior número de animais positivos que as moleculares quando o DNA foi extraído do papel, enquanto que o processo de extração do sangue total possibilitou a maior sensibilidade da PCR/GTP e PCR/18ST (Tabela 3).

Tabela 2. Detecção de *Trypanosoma vivax* nos bovinos com infecção crônica nos exames parasitológicos e nas reações da polimerase em cadeia (PCR) com diferentes métodos de extração de DNA.

Animal em fase crônica	Exame parasitológico		PCR com DNA extraído do papel-filtro			PCR com DNA extraído diretamente do sangue		
	Observações	Esfregaço sangüíneo (parasitemia %)	Woo	GTP	TV	18ST <i>semi-nested</i>	GTP	TV
1	0,05	+++	-	-	-	+	-	+
2	-	-	-	-	+	+	-	+
3	-	-	-	-	-	+	-	+
4	-	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	+	-	+
7	-	-	-	-	-	+	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	+	-	-	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	+	-	-	+
14	-	-	-	-	+	-	-	+
15	2	+++	-	-	+	-	-	+
Total exames positivos	2	2	1	1	7	7	2	12

Nota a- Woo (+ = 1 a 2 parasitos, ++ = 3 a 5 parasitos, +++ = mais de 5 parasitos).

Tabela 3. Detecção de *Trypanosoma vivax* nos bovinos com infecção aguda nos exames parasitológicos e nas reações da polimerase em cadeia (PCR) com diferentes métodos de extração de DNA.

Animal em fase crônica	Exame parasitológico	PCR com DNA extraído do papel-filtro				PCR com DNA extraído diretamente do sangue		
		Esfregaço sangüíneo (parasitemia %)	Woo	GTP	TV	18ST <i>semi-nested</i>	GTP	TV
1	1,60	+++	-	-	+	+	+	+
2	3,75	+++	+	-	+	+	+	+
3	0,50	+++	-	-	-	+	+	+
4	2,20	+++	-	-	-	+	+	+
5	1	+++	-	-	-	+	+	+
6	3,60	+++	-	-	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	-	-	+	-	+
9	-	-	+	-	-	+	-	+
10	-	-	-	-	-	-	-	+
11	1	+++	-	-	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	+
13	6,10	+++	-	-	+	-	+	+
14	20	+++	-	-	+	+	+	+
15	0,05	+++	+	-	+	+	-	+
Total exames positivos	10	10	3	0	7	12	9	14

Nota a- Woo (+ = 1 a 2 parasitos, ++ = 3 a 5 parasitos, +++ = mais de 5 parasitos).

A maior sensibilidade da PCR, quando comparada com os exames parasitológicos (ZARLENGA; HIGGINS, 2001), depende da eficiência e qualidade do DNA extraído, escolha dos *primers*, padronização da reação e do tipo de reação de PCR. Apesar de Masake et al. (1997) já terem demonstrado que a PCR/TV é capaz de detectar o DNA correspondente ao genoma de um único parasito e de diagnosticar uma porcentagem significativamente maior de infecções, quando comparada com a prova sorológica de detecção de antígeno e a prova parasitológica, observaram-se no presente trabalho resultados inferiores às provas parasitológicas e moleculares. O polimorfismo do gene que codifica o antígeno solúvel no isolado brasileiro não justifica a baixa sensibilidade apresentada, pois essa PCR havia detectado, anteriormente, DNA de isolados da América Latina (MASAKE et al., 1997), e a similaridade desse gene entre o isolado de *T. vivax* da África e o do Pantanal do Estado de Mato Grosso foi demonstrada anteriormente (MADRUGA et al., 1999).

A PCR/18ST *semi-nested* apresentou um maior número de reações positivas quando realizada com DNA extraído a partir do sangue total, embora não tenha ocorrido diferença significativa ($P \geq 0,05$) em relação à PCR/GTP. No entanto, a PCR/18ST *semi-nested* demonstrou diferença significativa ($P \leq 0,01$) quando comparada com as demais PCRs, considerando ambos os métodos de extração de DNA. Esses resultados evidenciam que a segunda amplificação, a partir do produto de uma PCR inicial, aumenta consideravelmente a sensibilidade do teste (Fig. 1).

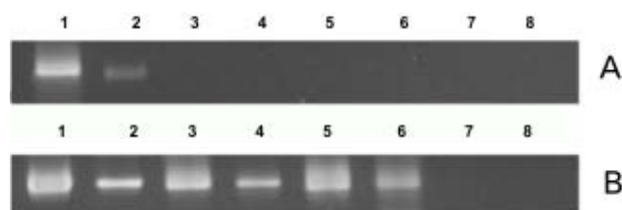


Fig. 1. PCR/18ST *semi-nested* com DNA extraído do sangue total com *kit* comercial de animais recentemente infectados com *Trypanosoma vivax*. A - PCR/18ST inicial; B - PCR/18ST *semi-nested*, 1 - controle positivo, 2 a 7 - amostras analisadas, 8 - controle negativo.

As PCR/GTP e PCR/TV demonstraram menor sensibilidade quando comparadas à PCR *semi-nested*, tanto para DNA proveniente do papel-filtro quanto para o sangue total (Fig. 2). Com relação à sensibilidade dos testes parasitológicos, que foi de 40%, estes foram significativamente superiores à PCR/TV ($P \geq 0,01$) e à PCR/GTP ($P \geq 0,05$). O intervalo de confiança da PCR 18ST *semi-nested* com DNA extraído a partir de sangue total demonstrou limite superior de 99% e inferior de 75%, sendo superior aos obtidos pelos outros testes, embora esse intervalo possua interseção com os limites da PCR/GTP com a mesma origem de DNA, que apresentou limite superior de 78% e inferior de 42%. O menor intervalo de confiança proporcionado pela PCR/TV com DNA obtido de papel-filtro.



Fig. 2. PCR/18ST com DNA extraído do sangue total com *kit* comercial de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi* isolados no Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul. Linhas, 1 - *T. vivax*; 2 - *T. evansi*; 3 - marcador de pares de base 1 kb.

Os resultados demonstram que o procedimento de extração de DNA a partir de sangue adsorvido em papel-filtro e tratado com a resina Chelex 100, que tem sido utilizado com alta eficiência em vários trabalhos (VENTURA et al., 2001), evidenciou um desempenho significativamente inferior ao método de obtenção de DNA diretamente do sangue total com o *kit* comercial ($P \leq 0,01$).

A PCR/18ST apresentou a vantagem adicional de diferenciar os isolados brasileiros de *T. vivax* e *T. evansi*, pois os *amplicons* gerados por essas espécies de tripanossomas tiveram tamanhos distintos, respectivamente 659 e 764 pares de bases (Fig. 2). Geysen et al. (2003) já haviam demonstrado que os *amplicons* da PCR/18ST *semi-nested* submetidos à técnica de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) com as enzimas de restrição *Msp1* e *Eco571* produziam fragmentos distintos. Conseqüentemente, essa técnica permitia o diagnóstico de diversas espécies de tripanossomas. Recentemente, utilizando a estratégia de desenhar *primers* baseados em seqüências da região ITS dos genes ribossomais do rDNA, que tem elevada homologia entre espécies de tripanossoma, foi desenvolvida uma PCR capaz de diferenciar membros do subgênero *Trypanozoon* de *T. congolense*, *T. simiae*, *T. godfreyi* e *T. vivax* e estes entre si (NJIRU et al., 2005).

Fundamentada nos resultados obtidos, a PCR/18ST é indicada para o diagnóstico etiológico das infecções por *T. vivax* e *T. evansi*, bem como para estudos epidemiológicos na América Latina, porque apresenta elevada sensibilidade para o diagnóstico dessas espécies endêmicas de tripanossomas, que são potencialmente patogênicas para espécies domésticas de importância econômica.

Referências bibliográficas

- 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, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, p. 1-13, 2003.
- DELESPAUX, V.; AYRAL, F.; GEYSEN, D.; GEERTS, S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification: applicability for the diagnosis of mixed infections with different trypanosome species in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, p. 185-193, 2003.
- DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins. **Revue D'Elevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v. 49, p. 322-327, 1996.
- DESQUESNES, M.; McLAUGHLIN, G.; ZOUNGRANA, A.; DÁVILA, A. M. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. **International Journal of Parasitology**, Melbourne, v. 31, p. 610-614, 2001.

- DUBOIS, M. E.; DEMICK, K. P.; MANSFIELD, J. M. Trypanosomes expressing a mosaic variant surface glycoprotein coat escape early detection by the immune system. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, p. 2690-2697, 2005.
- 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**, Amsterdam, v. 79, p. 187-201, 1998.
- GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances Parasitology**, New York, v. 28, p. 229-313, 1989.
- GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 110, p. 171-180, 2003.
- GONZALEZ, J. L.; JONES, T. W.; PICOZZI, K.; CUELLAR, H. R. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of bovine trypanosomiasis and epidemiological surveillance in Bolívia. **Kinetoplastid Biology and Disease**, New York, v. 28, p. 8-12, 2003.
- MADRUGA, C. R.; MORZARIA, S.; MAJUWA, P. O. **Caracterização genética do *Trypanosoma vivax* isolado no Pantanal do Estado de Mato Grosso e o diagnóstico diferencial da infecção por *Trypanosoma evansi* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**. Resultados preliminares. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 1999. 5 p. (Embrapa Gado de Corte. Pesquisa em Andamento, 49).
- MAGONA, J. W.; MAYENDE, J. W.; WALUBENGO, J. Comparative evaluation of the antibody-detection ELISA technique using microplates precoated with denatured crude antigens from *Trypanosoma congolense* or *Trypanosoma vivax*. **Tropical Animal Health Production**, Edinburgh, v. 34, p. 295-308, 2002.
- MAGONA, J. W.; MAYENDE, J. S.; OLAHO-MUKANI, W.; COLEMAN, P. G.; JONSSON, N. N.; WELBURN, S. C.; EISLER, M. C. A comparative study on clinical, parasitological and molecular diagnosis of bovine trypanosomiasis in Uganda. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Jonesburgh, v. 70, p. 213-218, 2003.
- MASAKE, R. A.; MOLOO, S. K.; NANTULYA, V. M.; MINJA, S. H.; MAKAU, J. M.; NJUGUNA, J. T. Comparative sensitivity of antigen-detection enzyme immunosorbent assay and microhaematocrit centrifugation technique in the diagnosis of *Trypanosoma brucei* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 56, p. 37-46, 1995.
- 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, v. 85, p. 193-205, 1997.
- MORLAIS, I.; GREBAUT, P.; BOBO, J. M.; DJOHA, S.; CUNY, G.; HERDER, S. Detection and identification of trypanosomes by polymerase chain reaction in wild tsetse flies in Cameroon. **Acta Tropica**, Basel, v. 70, p. 109-117, 1998.
- NANTULYA, V. M. Tripanosomiasis in domestic animals: The problems of diagnosis. **Revue D'Elevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v. 9, p. 357-367, 1990.
- NJIRU, Z. K.; CONSTANTINE, C. C.; GUYA, S.; CROWTHER, J.; KIRAGU, J. M.; THOMPSON, R. C. A.; DÁVILA, A. M. R. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. **Parasitology Research**, New York, v. 95, p. 186-192, 2005.
- OTTE, M. J.; ABUABARA, J. Y.; WELLS, E. A. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 26, p. 146-156, 1994.
- PAIVA, F.; LEMOS, R. A. A.; NAKAZATO, L.; MORI, A. E.; BRUM, K. B.; BERNARDO, K. C. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil: I – Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 135-141, 2000.
- SEIDL, A.; DÁVILA, A. M.; SILVA, R. A. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian lowlands. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, p. 269-272, 1999.
- SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brasil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 66, p. 25-32, 1972.
- SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; FREITAS, J.; MESQUITA, D. P.; MESQUITA, T. C.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Bovine trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* in the Northern subregion of Pantanal, Brasil. **Trypnews**, v. 4, p.1-2, 1995.
- SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; FREITAS, J.; MESQUITA, D.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, p. 561-562, 1996.

VENTURA, R. M.; PAIVA, F.; SILVA, R. A.; TAKEDA, G. F.; BUCK, G. A.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an interagency spacer sequence. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 99, p. 37-48, 2001.

WHITELAW, D. D.; GARDINER, P. R.; MURRAY, M. Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. **Parasitology**, New York, v. 7, p. 51-61, 1988.

WOO, P. T. K. The hematocrit centrifuge for the detection of trypanosomose in Blood. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 47, p. 921, 1969.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 101, p. 215-230, 2001.

Circular Técnica, 34

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Corte
Endereço: Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal
154, 79002-970 Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368-2083
Fax: (67) 3368-2083
E-mail: publicacoes@cnpqg.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2006): 500 exemplares

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



Comitê de publicações

Presidente: Cleber Oliveira Soares
Secretário-Executivo: Gracia Maria Soares Rosinha
Membros: Antonio do N. Rosa, Ecila Carolina N. Z. Lima, Geraldo Augusto de Melo Filho, Gracia Maria S. Rosinha, Lúcia Gatto, Manuel Antônio C. Jacinto, Maria Antonia M. de U. Cintra, Tênisson Waldow de Souza, Wilson Werner Koller

Expediente

Supervisão editorial: Ecila Carolina N. Zampieri Lima
Revisão de texto: Lúcia Helena Paula do Canto
Editoração eletrônica: Ecila Carolina N. Zampieri Lima