

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS E TRATAMENTO DA
TRIPANOSOMOSE BOVINA POR *Trypanosoma vivax* NO ESTADO DE
GOIÁS**

Thiago Souza Azeredo Bastos
Orientador: Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes

GOIÂNIA
2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

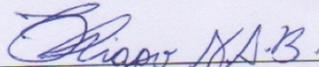
Nome completo do autor: Thiago Souza Azeredo Bastos

Título do trabalho: ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS E TRATAMENTO DA TRIPANOSOMOSE BOVINA POR *Trypanosoma vivax* NO ESTADO DE GOIÁS

3. Informações de acesso ao documento:

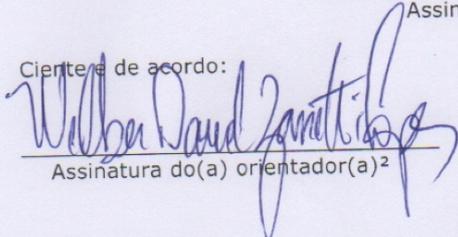
Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 06/03/2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do(a) autor(a): Thiago Souza Azeredo Bastos

Título do trabalho: ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS E TRATAMENTO DA TRIPANOSOMOSE BOVINA POR *Trypanosoma vivax* NO ESTADO DE GOIÁS

3. Informações de acesso ao documento:

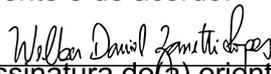
Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 21 / 01 / 2021

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

THIAGO SOUZA AZEREDO BASTOS

**ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS E TRATAMENTO DA
TRIPANOSOMOSE BOVINA POR *Trypanosoma vivax* NO ESTADO DE
GOIÁS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciência Animal junto ao programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Escola de Veterinária e
Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de concentração:

Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos

Linhas de pesquisa:

Parasitologia e doenças parasitárias dos animais de companhia,
produção e selvagens

Orientador:

Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes - IPTSP/UFG

Comitê de Orientação:

Prof.^a Dr.^a Valéria de Sá Jayme - EVZ/UFG

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares - EVZ/UFG

GOIÂNIA

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Souza Azeredo Bastos, Thiago
ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS E TRATAMENTO DA
TRIPANOSOMOSE BOVINA POR *Trypanosoma vivax* NO ESTADO
DE GOIÁS [manuscrito] / Thiago Souza Azeredo Bastos. - 2019.
xvi, 85 f.

Orientador: Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes; co-orientadora
Dra. Valéria de Sá Jayme ; co-orientador Dr. Guido Fontgalland
Coelho Linhares .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Brasil. 2. Bovinos. 3. Infecção. 4. Tripanossomose. I. Daniel
Zanetti Lopes, Welber, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO 268 DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **Thiago Souza Azeredo Bastos**. Às
4 **14h00min** do dia **01/03/2019**, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em
5 Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus
6 Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao
7 julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) **Thiago**
8 **Souza Azeredo Bastos**, intitulada "**Aspectos clínico-epidemiológicos e tratamento da**
9 **tripanosomose bovina por *Trypanosoma vivax* no estado de Goiás**", apresentada para obtenção
10 do **Título de Doutor em Ciência Animal**, junto à Área de Concentração: **Saúde Animal,**
11 **Tecnologia e Segurança de alimentos** desta Universidade. O (A) Presidente da Comissão
12 Julgadora **Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao
13 (a) candidato (a) **Thiago Souza Azeredo Bastos** para exposição em **quarenta** minutos do seu
14 trabalho. A seguir, o (a) senhor (a) Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos
15 Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte**
16 minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores.
17 Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta,
18 expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

19 Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes

20 Prof. Dr. Gustavo Felippelli

21 Prof. Dr. Felipe da Silva Krawczak

22 Profª. Drª. Lorena Lopes Ferreira

23 Prof. Dr. Osvaldo José da Silveira Neto

24 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **Thiago Souza**
25 **Azeredo Bastos**, **HABILITADO** **[[Habilitado (a) ou não Habilitado (a)]** pelo(s)

26 motivo(s) abaixo exposto(s):

27 _____

28 _____

29 _____

30 _____

31 _____

32 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



33

34

35

36

37

38 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

39

40

41

42

43

44

45 Nada mais havendo a tratar, eu, **Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes**, lavrei a presente ata que,
46 após lida e achada conforme, foi por todos assinada.

47 Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes

48 Prof. Dr. Gustavo Felippelli

49 Prof. Dr. Felipe da Silva Krawczak

50 Profª. Drª. Lorena Lopes Ferreira

51 Prof. Dr. Osvaldo José da Silveira Neto

A minha família, que sempre me motivou a continuar, por saber o quanto isto tudo me preenche de alegria.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço, imensamente, a todos que me ajudaram nesta jornada. Reconheço o quão importante foi estar, mesmo por poucos segundos, ao lado de cada um. Cada dia que passou, mostrou-me o quanto é incrível a capacidade humana. Um ser que está continuamente buscando formas de ajudar uns aos outros. Creio, afinal, que esta é a essência da humanidade.

Sem citar nomes, pela imensidão de pessoas que aqui desejo mencionar, agradeço:

- à minha família, por não pouparem esforços para me ajudar a iniciar e finalizar mais esta etapa;
- aos professores, pessoas incríveis que encantam os alunos, conquistam corações e estimulam novas ideias;
- às instituições de fomento a pesquisa (CAPES, CNPQ, FAPEG), com destaque ao FUNDEPEC-GOIÁS, que possibilitaram a execução de cada etapa deste trabalho;
- aos colegas de trabalho (graduandos, pós-graduandos, técnicos-laboratoriais, técnicos-administrativos, servidores terceirizados de segurança, limpeza, manutenção, informática e todas as demais áreas que eu não fui capaz de mencionar aqui);
- aos produtores rurais, por serem o braço forte desta nação, bem como pelos constantes questionamentos que levaram à muitas ideias novas.

Este trabalho, que aqui se encerra, só pode ser concluída pois todos vocês acreditaram nesta ideia e estiveram ao meu lado. Espero que, assim como me ajudaram, eu possa ter contribuído com algo.

Portanto, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos	14
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL, PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA OCORRÊNCIA AGUDA DE <i>Trypanosoma vivax</i> EM BOVINOS DO ESTADO DE GOIÁS, BRASIL	19
CAPÍTULO 3: ESTUDO COMPARATIVO DA CAPACIDADE DE INFECÇÃO DE <i>Trypanosoma vivax</i> INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE POR DIFERENTES VIAS EM BOVINOS COM <i>Anaplasma marginale</i> LATENTE	37
CAPÍTULO 4: EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO DIMINAZENE (7MG/KG), IMIDOCARB (4,8MG/KG) E ISOMETAMIDIUM (0,5 E 1,0MG/KG), ADMINISTRADOS EM DIFERENTES PROTOCOLOS, CONTRA <i>Trypanosoma vivax</i> EM BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS	57
CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
ANEXOS	82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: *Trypanosoma vivax* e variações de sua forma, obtidos em amostra de sangue de bovino infectado, em extensão sanguínea corado com May Grunwald/Giemsa e observados em microscopia com óleo de imersão (1.000x). Pequeno tripomastigota (A), grande tripomastigota (B) e tripomastigotas em divisão (C e D). Arquivo pessoal, 2019.....3

CAPÍTULO 2

Figura 1: Mesorregiões do estado de Goiás (A), Distribuição espacial de *T. vivax* no estado de Goiás durante o período avaliado (B) e Distribuição da criação de gado bovino no estado de Goiás, em relação a aptidão (corte, leite ou mista). Adaptado de Rocha et al. 2009.33

CAPÍTULO 3

Figura 1: Resultados das quantificações de tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* em bezerros com *Anaplasma marginale* latente, pertencentes ao grupo controle (não infectado) e aos grupos inoculados em diferentes vias com 1×10^6 formas infectantes do protozoário em questão, Goiânia, Goiás, Brasil. Fevereiro, 2017.....56

CAPÍTULO 4

Figura 1: Volume globular médio em bezerros experimentalmente infectados com *Trypanosoma vivax* e posteriormente tratados com diferentes formulações ou mantidos como controle. CPOS= Controle positivo; ISO0.5= tratamento com isometamidium (0,5mg/kg) no dia 0; ISO1.0= tratamento com Isometamidium (1mg/kg) no dia 0; DIM+ISO1.0= tratamento com Diminazene (7mg/kg) no dia 0 e Isometamidium 1.0 (1,0mg/kg) no dia 14.....72

Figura 2: Valores médios de parasitemia em bezerros experimentalmente infectados com *Trypanosoma vivax* e posteriormente tratados com diferentes formulações ou mantidos como controle. CPOS= Controle positivo; DIM= tratamento com aceturato de diminazene (7 mg/kg) no dia 0; IMI= tratamento com dipropionato de imidocarb (4,8mg/kg) nos dias 0 e 14; ISO0.5= tratamento com Isometamidium (0,5mg/kg) no dia 0; ISO1.0= tratamento com Isometamidium (1mg/kg) no dia 0; DIM+ISO1.0= tratamento com Diminazene (7mg/kg) no dia 0 e Isometamidium 1.0 (1,0mg/kg) no dia 14.....73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Análise de associação entre as mesorregiões do estado de Goiás, referente a prevalência de *Trypanosoma vivax* diagnosticados nos bovinos.34

Tabela 2: Análise de associação entre os municípios do estado de Goiás, referente a prevalência de *Trypanosoma vivax* diagnosticados nos bovinos.35

Tabela 3: Associação entre a prevalência de *Trypanosoma vivax* diagnosticado no estado de Goiás, com algumas variáveis epidemiológicas utilizando a análise de regressão logística.36

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Resultados das comparações múltiplas das temperaturas corporais dos bezerros do controle (não infectado) e dos grupos inoculados em diferentes vias com 1×10^6 formas infectantes do protozoário em questão. Dados transformados em $y = \text{Log}(x+1)$. Goiânia, Goiás, Brasil. Fevereiro, 2017.50

Tabela 2: Resultados das comparações múltiplas do Volume globular dos bezerros do controle (não infectado) e dos grupos inoculados em diferentes vias com 1×10^6 formas infectantes do protozoário em questão. Dados transformados em $y = \text{Log}(x+1)$. Goiânia, Goiás, Brasil. Fevereiro, 2017.51

Tabela 3: Período pré-patente (dias pós-inoculação) de *Trypanosoma vivax* em bezerros infectados experimentalmente por diferentes vias com 1×10^6 tripomastigotas.....52

Tabela 4: Resultados das comparações múltiplas das quantificações de tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* nos bezerros do controle (não infectado) e dos grupos inoculados em diferentes vias com 1×10^6 formas infectantes do protozoário em questão. Dados transformados em $y = \text{Log}(x+1)$. Goiânia, Goiás, Brasil. Fevereiro, 2017.....53

Tabela 5: Resultados das comparações múltiplas dos percentuais de parasitemia por *Anaplasma marginale* quantificado nos animais dos grupos infectados e controle. Dados transformados em $y = \text{asin}(\text{sqrt}(x/100)) * 180/\pi$. Goiânia, Goiás, Brasil. Fevereiro de 2017.54

Tabela 6: Achados de necropsia de bezerros com infecção latente por *Anaplasma marginale* e posteriormente infectados com *Trypanosoma vivax* por diferentes vias, que foram a óbito durante o estudo.55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Grupos experimentais, produtos utilizados, dose, via de inoculação, regime de tratamentos e desafio pós-tratamento dos bezerros.....74

Tabela 2: Percentuais de eficácia e de redução nas contagens de tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* em animais experimentalmente infectados com 1×10^6 tripomastigotas, e posteriormente tratados com diferentes formulações ou mantidos como controle.....75

Tabela 3: Parasitemia por tripomastigotas de *Trypanosoma vivax*, diagnosticada pela técnica de Brener, em animais experimentalmente infectados com 1×10^6 tripomastigotas do protozoário em questão, e posteriormente tratados com diferentes formulações, ou mantidos como controle.....76

Tabela 4: Valores médios de temperatura retal mensuradas em animais experimentalmente infectados com 1×10^6 tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* e posteriormente tratados com diferentes formulações, ou mantidos como controle.....77

Tabela 5: Valores médios de volume globular aferido de animais experimentalmente infectados com 1×10^6 tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* e posteriormente tratados com diferentes formulações, ou mantidos como controle.....78

Tabela 6: Resultados dos exames de diagnóstico para *Trypanosoma vivax* realizados nos bovinos previamente infectados com 1×10^6 tripomastigotas e posteriormente tratados com diferentes formulações, ou mantidos como controle.....79

RESUMO

Trypanosoma (Duttonella) vivax é o protozoário causador da tripanosomose bovina. Uma hemoparasitose de ruminantes que vem assumindo grande importância econômica no Brasil. Sua transmissão pode ocorrer por vetores e também pela via iatrogênica. Animais infectados apresentam sinais clínicos comuns a diversas outras doenças, o que dificulta o diagnóstico e tratamento precoce em rebanhos infectados. Nos últimos 10 anos, a doença vem constantemente se expandindo para novos territórios brasileiro. Este estudo relata o primeiro caso de tripanosomose bovina causada por *Trypanosoma vivax* no estado de Goiás, bem como outros casos que ocorreram dentro de um período de 24 meses, demonstrando aspectos epidemiológicos, como o compartilhamento de agulhas e a comercialização de vacas infectadas, que influenciaram na dispersão da doença. Ainda, observou-se que *T. vivax* foi capaz de infectar e desenvolver a doença em bezerros, independente se inoculados pela via intradérmica, subcutânea, intramuscular ou endovenosa. A presença de *Anaplasma marginale* latente nos bezerros com tripanosomose interferiu diretamente no percentual de mortalidade dos animais. Por fim, com relação à eficácia, apenas animais que receberam isometamidium foram capazes de permanecer sem nova parasitemia durante os 180 dias de estudo. Animais que receberam diminazene apresentaram nova parasitemia quando reinfectedos 50 dias após o tratamento e, por último, imidocarb não foi eficaz no tratamento da tripanosomose bovina. Este é o primeiro trabalho que descreve a presença de *T. vivax*, bem como sua epidemiologia no estado de Goiás, avaliou-se a capacidade de infecção deste parasito por diferentes vias, os sinais clínicos, métodos de diagnóstico e, também, avaliou-se a eficácia do tratamento com imidocarb, diminazene e isometamidium em bovinos experimentalmente infectados com *T. vivax* no Brasil.

Palavras-chave: Brasil, bovinos, infecção, tripanossomose.

ABSTRACT

Trypanosoma (Duttonella) vivax is the protozoan that causes bovine trypanosomiasis. A hemoparasitosis of ruminants that has been assuming great economic importance in Brazil. Its transmission can occur by vectors and also by the iatrogenic way. Infected animals show clinical signs common to several other diseases, which makes it difficult to diagnose and treat early in infected herds. In the last 10 years, the disease has been constantly expanding to new Brazilian territories. This study reports the first case of bovine trypanosomiasis caused by *Trypanosoma vivax* in Goiás, Brazil, as well as other cases that occurred within a period of 24 months, demonstrating epidemiological aspects such as needle sharing and commercialization of infected cows influencing the spread of this disease. Furthermore, it was observed that *T. vivax* was able to infect and develop the disease in calves when they were inoculated by intradermal, subcutaneous, intramuscular or intravenous way. The presence of *Anaplasma marginale* latent, in calves with trypanosomiasis, interfer directly in the percentage of mortality of the animals. Finally, with regard to efficacy, only animals that received isometamidium were able to remain without new parasitaemia after 180 days of study. Treatment with diminazene allowed new parasitemia when reinfected 50 days after treatment and, finally, imidocarb was not effective in the treatment of bovine trypanosomiasis. This is the first study that describes the presence of *T. vivax*, as well as its epidemiology in the State of Goiás, evaluated the infection capacity of this parasite by different pathways, clinical signs, and diagnostic methods and also evaluated the efficacy of the treatment with imidocarb, diminazene and isometamidium in cattle experimentally infected with *T. vivax* in Brazil.

Keywords: Brazil, bovines, infection, trypanosomiasis.

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma vivax é o protozoário causador da tripanosomose bovina. Uma hemoparasitose de ruminantes que vem assumindo grande importância econômica no Brasil ¹. Sua ocorrência tem ocasionado expressivas perdas econômicas devido a mortalidade de animais e à queda de cerca de 50% do retorno financeiro diário bruto de uma propriedade leiteira ².

A transmissão desta parasitose pode ocorrer por vetores e também pela via iatrogênica ³. Na América do Sul, mutucas (*Tabanus*) são os vetores mecânico desta enfermidade ⁴. Mas, outras moscas como *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans* também são incriminadas pela transmissão mecânica deste parasito ⁵. O uso compartilhado de agulhas é outra prática de risco relacionada com maior frequência à disseminação desta enfermidade ³.

Animais infectados apresentam sinais clínicos comuns a diversas outras doenças, o que dificulta o diagnóstico e tratamento precoce em rebanhos infectados. Os sinais mais comuns da tripanosomose bovina são: febre, anemia, perda de peso e redução dos índices produtivos, decúbito prolongado, aborto e morte ⁶.

Esta doença, de origem africana, foi relatada pela primeira vez na América do Sul no início do século passado. Os primeiros casos de tripanosomose bovina no Brasil foram descritos em 1946. Desde então, a doença vem constantemente se expandindo para novos territórios ⁷.

Em Goiás, local onde a tripanosomose bovina foi relatada pela primeira vez em 2015 ³, poucas informações sobre os aspectos clínicos, epidemiológicos, bem como formas de diagnóstico e tratamento desta doença. Tal observação repete-se também em outras partes do Brasil. Portanto, este trabalho investigou e reuniu informações sobre os aspectos clinico-epidemiológicos em Goiás, e também comparou diferentes métodos de diagnóstico de tripanosomose bovina, concomitantemente, o presente estudo determinou a eficácia de diferentes protocolos, com diminazene, imidocarb e isometamidium, para o tratamento desta hemoparasitose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etiologia

Trypanosoma (Duttonella) vivax é um protozoário hemoparasito que localiza-se no plasma sanguíneo de bovinos, e também de outros ungulados². Foi no continente africano, entre 1894 e 1897, que pela primeira vez sua presença foi relacionada à ocorrência de doença em bovinos, bem como foi demonstrado que o agente era transmitido pelo vetor biológico do gênero *Glossina*, conhecido como mosca tsé-tsé (que na linguagem Tswana significa “mosca que mata o rebanho”⁸). Algum tempo depois, também descobriu-se que animais selvagens atuavam como reservatórios deste protozoário. Em 1905, *T. vivax* passou a ser considerado a principal espécie de tripanossomatídeo que afeta bovinos, causando a doença denominada Nagana, como é conhecida na África, ou tripanosomose bovina, denominação utilizada no continente americano⁹.

T. vivax foi classificado como pertencente ao subgênero *Duttonella* e Seção Salivaria, pois possui formas flageladas monomórficas (com pequenas variações de tamanho) e por desenvolver-se exclusivamente na probóscide do vetor biológico⁹. Morfológicamente, possui região posterior do corpo arredondada, cinetoplasto terminal grande e arredondado ou elíptico, apresenta um flagelo livre e com membrana ondulante semidesenvolvida¹⁰. A observação de algumas estruturas, como a membrana ondulante (de tamanho maior que a de *Trypanosoma congolense* e menor que de *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma evansi*) e a sua extremidade posterior (cuja forma é arredondada), por exemplo, permite a diferenciação de *T. vivax* das demais espécies quando observados na microscopia luminosa⁷. Não só pelas características morfológicas, *T. vivax* também pode ser diferenciado dos demais tripanossomatídeos pela sua capacidade de movimentação, que ao exame microscópico à fresco apresenta rápida movimentação (geralmente retilínea), enquanto que outros tripanossomatídeos locomovem-se em círculos¹⁰.

A partir de análises biométrica, observou-se que o comprimento de *T. vivax* varia de 18 a 31 μm , sendo que 3 a 6 μm deste total corresponde ao tamanho do flagelo livre⁹. Inicialmente, o conhecimento destas medidas foi utilizado para realizar diferenciação entre isolados de Mato Grosso, Pará e Bolívia, cujo resultados de comprimento médio eram 18,73 μm , 22,77 μm e 15,86 μm , respectivamente^{10,11}. Também, foram feitas algumas relações entre morfologia e patogenicidade, mas sem sucesso¹².

Esta reunião de resultados discrepantes do mesmo organismo, entre diferentes autores, levou ao questionamento dos dados, uma vez que foram utilizados diversos métodos

(como técnicas de desenho com câmera lúcida e captura de imagens com máquina fotográfica) que, além de tediosos, sua acurácia depende da habilidade de cada pessoa¹¹.

A partir disso, descobriu-se que apesar de serem monomórficos, *T. vivax* pode apresentar quatro variações de sua forma, que ocorrem nas diferentes fases de parasitismo. Estas formas são classificadas como: (1) pequenos tripomastigotas ou “stumpy forms”; (2) tripomastigotas intermediários; (3) grandes tripomastigotas ou “slender forms”; e (4) tripomastigotas em divisão (durante a fissão binária)¹¹. A observação de grandes tripomastigotas predomina durante a fase ascendente de parasitemia, enquanto que durante a fase decrescente, pequenos tripomastigotas são mais frequentes¹⁰ (Figura 1).

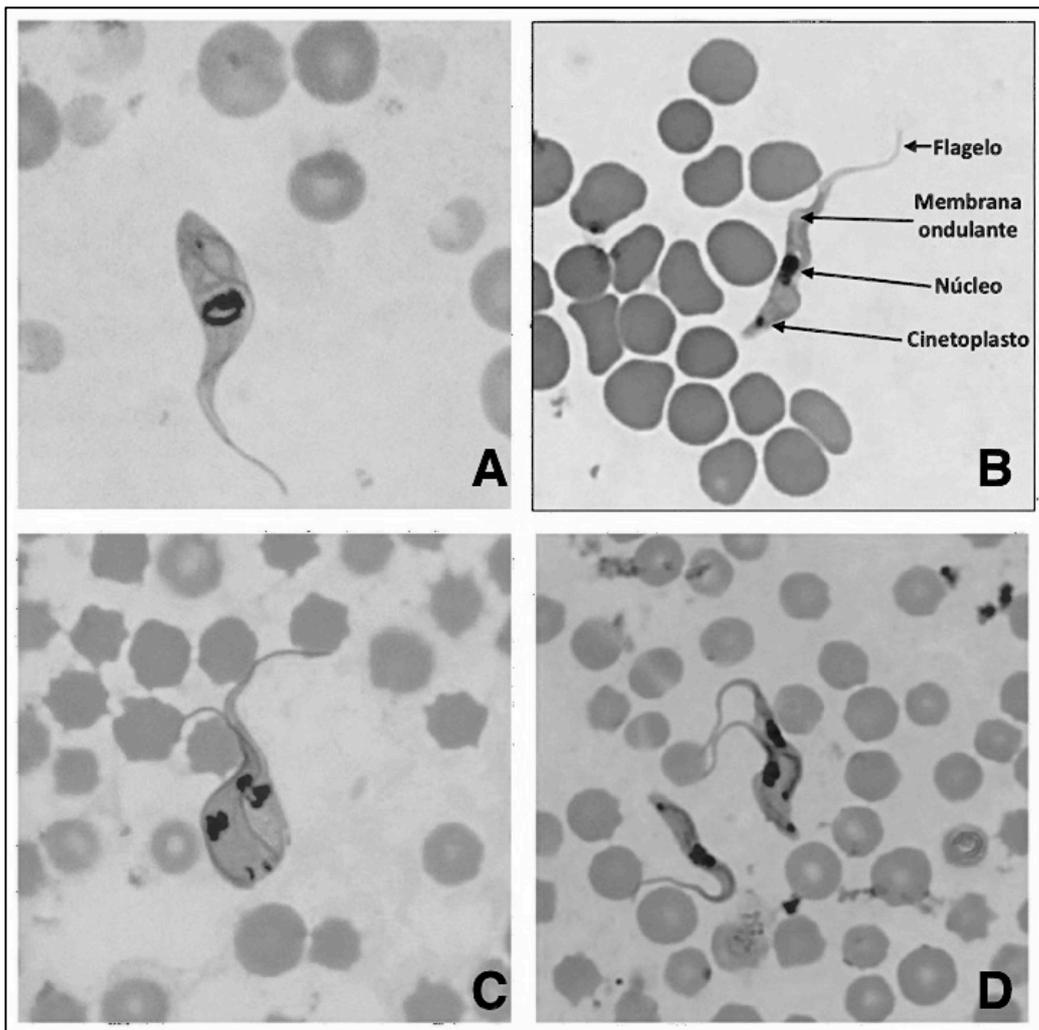


FIGURA 1: *Trypanosoma vivax* e variações de sua forma, obtidos em amostra de sangue de bovino naturalmente infectado. Extensão sanguínea corado com May Grunwald/Giemsa e observada em microscopia com óleo de imersão (1.000x). Pequeno tripomastigota (A), grande tripomastigota (B) e tripomastigotas em divisão (C e D). Arquivo pessoal, 2019.

Para melhor compreender este polimorfismo, foram empregadas técnicas de diagnóstico molecular e demonstrou-se que isolados da Colômbia, Venezuela e da Guiana, apesar de próximos, apresentam moderada diversidade genética¹³. Mas, aparentemente, esta diferença é inferior quando comparada aos isolados africanos⁷. Ainda, isolados brasileiros oriundos de Para, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul apresentaram alta similaridade genética (ou homogeneidade)¹⁴, mesmo quando obtidos de animais sintomáticos e assintomáticos¹⁰ e que amostras de *T. vivax* obtidas em Mato Grosso apresentaram sequências de alta homogeneidade com amostras analisadas do oeste da África¹⁵.

2.2. Epidemiologia

2.2.1. Distribuição

Tripanosomose bovina é uma doença de ocorrência mundial, contudo os maiores números de casos da doença ocorrem no continente africano, onde houve os primeiros relatos dessa doença, e na América latina, local onde vem causando danos à bovinocultura e com isso sendo progressivamente estudada¹⁰.

Com relação à América do Sul, especificamente, não sabe-se com exatidão quando *T. vivax* foi introduzido. Mas, a primeira detecção ocorreu na Guiana Francesa, no início do século XX, sendo encontrado em seguida na Venezuela. Desde então, a presença deste agente foi relatada em diversos outros países sul americanos como: Colômbia, Suriname e Guyana, Panamá e Brasil, dentre outros¹⁰.

No Brasil, a ocorrência desta doença em bovinos foi descrita pela primeira vez no Pará, em 1946 por Bulhosa. Neste mesmo Estado, posteriormente foi descrito novos casos em búfalos¹¹. Após isto, diversos outros relatos de tripanosomose bovina foram feitos, registrando sua disseminação para outros 18 estados (Quadro 1).

2.2.2. Hospedeiros

Tripanosomose causada por *T. vivax* é uma doença que afeta animais ungulados, podendo ocorrer em ruminantes e equídeos⁶. Na América do Sul, assim como na África, infecta principalmente bovinos²⁸, sendo também detectada em equinos, ovinos, caprinos, búfalos, lhamas, alpacas e veados. Entretanto, a infecção em equinos precisa ser melhor estudada⁷.

QUADRO 1: Distribuição, ano de ocorrência e referência bibliográfica dos primeiros relatos de *Trypanosoma vivax* nos diferentes estados brasileiros.

N	Local	Ano	Referência
1	Pará	1946	Shaw e Lainson ¹¹
2	Amapá	1981	Serra-Freire ¹⁶
3	Mato Grosso	1995	Silva et al. ¹⁷
4	Mato Grosso do Sul	1997	Paiva et al. ¹⁸
5	Paraíba	2002	Batista et al. ¹⁹
6	Maranhão	2003	Guerra et al. ²⁰
7	Tocantins	2005	Linhares et al. ²¹
8	Minas Gerais	2007	Carvalho et al. ²²
9	São Paulo	2008	Cadioli et al. ⁵
10	Rio Grande do Sul	2009	Silva et al. ²³
11	Pernambuco	2010	Pimentel et al. ²⁴
12	Alagoas	2013	Andrade Neto e André ²⁵
13	Goiás	2015	Bastos et al. ³
14	Sergipe	2015	Vieira et al. ²⁶
15	Piauí	2015	Lopes et al. ¹
16	Rio de Janeiro	2016	Costa et al. ²⁷
17	Espírito Santo	2016	IDAF (2016) (Dados não publicados)
18	Rio Grande do Norte	2017	Lopes et al. ¹

Nos bovinos brasileiros, tripanosomose foi identificada afetando rebanhos de corte (Nelore, Angus, Brahman) e de leite (Pardo Suíço, Gir e Girolando)^{21,23}. Há relatos de raças taurinas (*Bos taurus taurus*) que são conhecidas pela capacidade de serem tripanotolerantes. Animais das raças N'Dama, Muturu e Dahomey, encontrados principalmente no oeste da África, apresentam este tipo de resistência à *T. congolense*, *T. brucei* e a isolados de *T. vivax* do oeste africano¹⁰.

Para melhor compreender o parasito, tentativas de inoculação *in vitro* em ratos e coelhos foram realizadas, mas não foram efetivas. Apenas infecção em camundongos foi possível a partir de cepas específicas⁷. Foi demonstrado que rato do algodão (*Sigmodon* sp.), por exemplo, é imune ao *T. vivax* pois em seu soro há anticorpos capazes de causar lise celular deste parasito. Também, foram feitos testes em babuínos e concluíram que estes animais são refratários à infecção⁹. Além disso, testes realizados em burros demonstrou que estes equídeos podem se infectar com *T. vivax* e, apesar de não manifestarem a doença, possivelmente podem atuar como reservatório no semiárido brasileiro²⁹.

2.2.3. Transmissão

Trypanosoma são parasitos obrigatórios e heterogenéticos que não sobrevivem fora do corpo do hospedeiro. Por ser da classe Salivaria, *T. vivax* pode apresentar transmissão biológica (por vetores biológicos que possuem o parasito em sua glândula salivar) e

transmissão mecânica (por vetores mecânicos ou iatrogênica)³⁰. Também, apesar de menos frequente, é possível que ocorra transmissão por via transplacentária¹⁰.

A transmissão por vetores ocorre principalmente na África, onde a mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.), reconhecida como vetor biológico, é endêmica. Já na América do Sul, onde não existe tsé-tsé, aparentemente o parasito se adaptou para sobreviver a partir da transmissão mecânica. Esta última é atribuída a vetores como *Tabanus* spp. e, possivelmente, moscas como *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*. Relata-se que em Cuba, mosquitos possam ser potenciais vetores¹⁰. Ainda, causas iatrogênicas, como quando se utiliza seringas, agulhas e outros equipamentos contaminados também podem transmitir o agente^{2,23,31}.

A transmissão mecânica pode ser influenciada pelo nível de parasitemia do hospedeiro, de modo que animais com alta parasitemia atuam como fontes de infecção mais eficiente do que animais com baixa parasitemia⁷. Mas, para que a transmissão mecânica ocorra, diversas condições devem ocorrer simultaneamente, como a existência de um animal portador com alta parasitemia, abundância de vetores (ou outra condição favorável para a transmissão, como a forma iatrogênica) e presença de animais susceptíveis (situação comum onde há rotas comerciais de bovinos)¹⁰, seja pela idade, presença de infecções concomitantes, gravidez, lactação e/ou condição nutricional³².

Uma vez que é baixa a probabilidade de todos estes fatores ocorrerem concomitantemente¹⁰, casos da doença são imprevisíveis em áreas onde a transmissão de *T. vivax* é estritamente mecânica. Neste locais, sua ocorrência é observada na forma de surtos que, após ondas epidêmicas, gradualmente resulta no controle do parasito, seja pela autocura ou pelo tratamento. Deste modo, a situação epidemiológica torna-se instável e, após alguns anos, a população retorna ao estado de susceptível (quando a soroprevalência está abaixo de 20 a 30%), sendo possível ocorrer nova onda epidêmica⁷.

Depois que o parasito se estabelece em um rebanho de susceptíveis, é importante ressaltar a facilidade de disseminação que ele possui¹⁰. Há relatos de que esta doença pode se disseminar por todo o rebanho em seis meses, quando formado por animais que não foram previamente expostos ao agente³³.

Com relação à transmissão transplacentária, na América latina este tipo de transmissão foi relatada em bezerro que apresentou alta parasitemia cinco horas após o parto³³. A manifestação perinatal da doença aparenta ter relevância epidemiológica neste continente¹⁰.

2.3. Patogenia

Após infecção do hospedeiro vertebrado, tripanosomatídeos da classe *Salivaria* multiplicam-se no sangue continuamente por fissão binária, mantendo a forma tripomastigota⁹. Durante o período de incubação, que geralmente varia de sete a 11 dias, em bovinos, o animal infectado não apresenta sinais clínicos³³. Esta variação do período pré-patente (PPP) pode ocorrer em função da patogenicidade do isolado ou da quantidade de inóculo que o animal susceptível receber³². Há casos em que o PPP foi de 59 dias. Mas, isso ocorreu com isolados pouco virulentos⁹.

Após a incubação, um primeiro pico de parasitemia pode ser detectado entre seis e 12 dias pós-infecção³². Simultaneamente com este pico, hipertermia, trombocitopenia e anemia aguda severa podem ser observados. Animais com anemia persistente podem desenvolver insuficiência cardíaca congestiva, que resulta em óbito¹⁰.

Redução do hematócrito está associado a estágios mais severos da tripanosomose. Há relato de animais que o valor de hematócrito atingiu valor de 8%³⁴. A anemia causada por *T. vivax* é descrita como normocítica e normocrômica, com tendência a se tornar macrocítica e normocrômica. Sugere-se que esta anemia seja por hemólise do tipo imunomediada e ocorra pela deposição de imonocomplexos na superfície de eritrócitos, desencadeando a eritrofagocitose¹⁰. Mas, os mecanismos patofisiológicos desta doença ainda não são completamente conhecidos³⁵. Apesar de menos frequente, zebuínos infectados também podem desenvolver leucopenia, com neutropenia e linfopenia, com posterior reestabelecimento dos parâmetros normais³⁴.

Em testes com touros zebuínos observou-se que o valor médio do hematócrito reduziu de 29% para 16%, após 20 dias de infecção. Mas, além da anemia, estes animais também apresentaram vários graus de lesão testicular, afetando principalmente as células de Leydig e túbulos seminíferos, o que resultou em degeneração epididimal dois meses após infecção. Aparentemente a glândula pituitária e produção de hormônio luteinizante (LH) não foram afetadas, mas a destruição de células de Leydig pode resultar na diminuição da esteroidogênese testicular e consequentemente afetar a espermatogênese. Danos que dificilmente podem ser revertidos³⁵.

Com relação às vacas, foi observado que a gestação provoca exacerbação da infecção, manifestada por aumento persistente da parasitemia, seguido por hipertermia. Ovelhas infectadas no início de gestação morreram 35 dias após infecção, enquanto que ovelhas infectadas no terço final de gestação apresentaram aborto e nascimento de cordeiro fraco, mas não foram à óbito³⁴.

Foi observado que entre 30 a 60 dias pós-infecção, a parasitemia deixa de ser detectável por métodos microscópicos. A partir deste período, considera-se que tem início a fase crônica da doença. Nesta fase, é comum o animal deixar de apresentar sinais clínicos³². Animais com a doença crônica podem se tornar reservatórios de *T. vivax* que, nestes casos, permanece alojado extravascularmente em linfonodos, no humor aquoso dos olhos ou no líquido. Tais infecções ocultas, posteriormente podem ser reativadas quando os bovinos forem submetidos a estresse¹⁰ ou infecção concomitante. Esta reativação também pode ocorrer em períodos de pouca disponibilidade de alimentos ou após imunossupressão²⁹. Por outro lado, animais bem alimentados e bem manejados (livre de calor extremo, ectoparasitos e endoparasitos, por exemplo) podem responder bem à infecção e sobreviver³².

Em caso de óbito, nas carcaças apenas sinais como edema e anemia são observados. Entretanto, estes sinais são comuns a várias outras doenças de bovinos, como helmintíase e mal nutrição, o que dificulta o diagnóstico por meio de exame necroscópico¹⁰.

2.4. Sinais clínicos

A infecção causada por *T. vivax* em bovinos adultos pode causar desde infecção assintomática até doença grave¹¹. A febre é um dos primeiros sinais que pode ser observado, seguido de anemia hemolítica, parasitemia, apatia, anorexia, letargia, ataxia, perda de peso progressiva, palidez de mucosa, aumento de tamanho dos linfonodos (no pescoço e no flanco principalmente), baixa condição corporal, queda na produção de leite, aborto e morte³³.

Em alguns casos pode ser observado lacrimejamento, tosse, diarreia, depressão, edema submandibular, descarga nasal, ceratite e cegueira transitória. Casos graves da doença desenvolvem sinais neurológicos como dismetria, ataxia, fraqueza muscular nos membros posteriores, bem como decúbito externo e morte súbita. Taxas de mortalidade de aproximadamente 10% e a morbidade de 50% são relatadas em alguns trabalhos^{5,33}.

A ocorrência destes sinais variam de acordo com diversos fatores, como a fase da doença (aguda ou crônica) e resposta imune do hospedeiro¹⁰. Doença aguda geralmente ocorre após introdução de animais infectados em um rebanho de susceptíveis³⁶. Sintomatologia em bezerras, por exemplo, é mais grave que em vacas. A infecção no terço final de gestação parece ser mais danosa às fêmeas, uma vez que pode resultar em morte, retenção de placenta, atraso na involução uterina, natimortalidade e aumento do intervalo entre parto³³.

Uma vez que o parasito sobrepõe o sistema imune do bovino, os animais infectados podem apresentar sinais clínicos comuns a diversas outras enfermidades como helmintíase, babesiose, anaplasmose, raiva, deficiência nutricional e intoxicações por

plantas³³, o que dificulta o diagnóstico²¹. Entretanto, já foi observado que durante a tripanosomose aguda, anemia é o principal sinal clínico, enquanto que leucopenia e icterícia raramente ocorrem. A icterícia, quando observada, não é acompanhada por hemoglobinúria^{10,37}.

Em ovelhas com a doença aguda, o aparecimento de *T. vivax* no sangue periférico ocorreu junto com o aumento da temperatura corpórea do animal. Foi possível notar a perda de peso seguida de óbito, em casos severos. Durante a necropsia, não foram observadas alterações macroscópicas nos pulmões, baço, cérebro e rins. Por outro lado, o fígado apresentou pequenos pontos brancos, o coração apresentou-se flácido e medula óssea pálida¹¹.

Cabras experimentalmente inoculadas apresentaram a doença clínica e tiveram que ser eutanasiadas. Por outro lado, o mesmo inóculo quando utilizado em burros, não produziu sinais clínicos, parasitemia detectável pelos métodos microscópicos direto ou alterações hematológicas. Apenas foi possível detectar DNA do parasito nos burros. Portanto, no Brasil, burros foram considerados animais tolerantes e talvez possam atuar como reservatório para ruminantes²⁹.

Em búfalos, a infecção caracteriza-se por baixa parasitemia, acompanhando por períodos de detecção de *T. vivax* no sangue circulante juntamente com o aumento de temperatura¹¹. Alguns casos em bovinos a doença também pode-se estabelecer equilíbrio com o parasito e permanecer assintomática por longo período, caracterizando a fase crônica da doença³⁸.

A fase crônica da doença está relacionada principalmente com aparecimento de problemas reprodutivos em fêmeas e machos³³. Em touros, *T. vivax* causa dano testicular e epididimal que pode resultar em infertilidade e, provavelmente, esterilidade³⁵. Sugere-se, pela detecção de DNA do parasito na placenta de animais infectados, que este agente tem importante função na patogênese da disfunção placentária e aborto³⁴. De acordo com Silva et al.³⁷, aborto no terço final de gestação acompanhado de anemia é sinal indicativo de tripanosomose bovina. Além disso, ciclo estral alterado, anestro permanente³³, repetição de cio e mortalidade perinatal também são sinais reprodutivos da doença em fêmeas^{5,39}. Febre, anemia e presença de parasitos no sangue circulante, que são os sinais mais frequentes na fase aguda, são intermitentes na fase crônica¹⁰.

2.5. Diagnóstico

Tripanosomose pode ser diagnosticada pela associação de achados clínicos e epidemiológicos com técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares. Já, com relação ao diagnóstico necroscópico, não há sinais patognômicos que podem ser observados³³.

Há diversas técnicas parasitológicas para diagnóstico de tripanosomose. Elas podem ser divididas em três tipos: (1) Técnicas de gota úmida e esfregaço (espesso e fino), dentre outros (Figura 2); (2) Técnicas de concentração (Teste de concentração em tubo de hematócrito e Método de Woo); e (3) Técnica de inoculação em animal susceptível^{40, 41}. Há ainda outros métodos, como a técnica de concentração após lise e centrifugação⁴² e a pesquisa de parasito em *imprint* de baço, medula óssea, cérebro e pâncreas¹¹, mas são menos utilizadas.

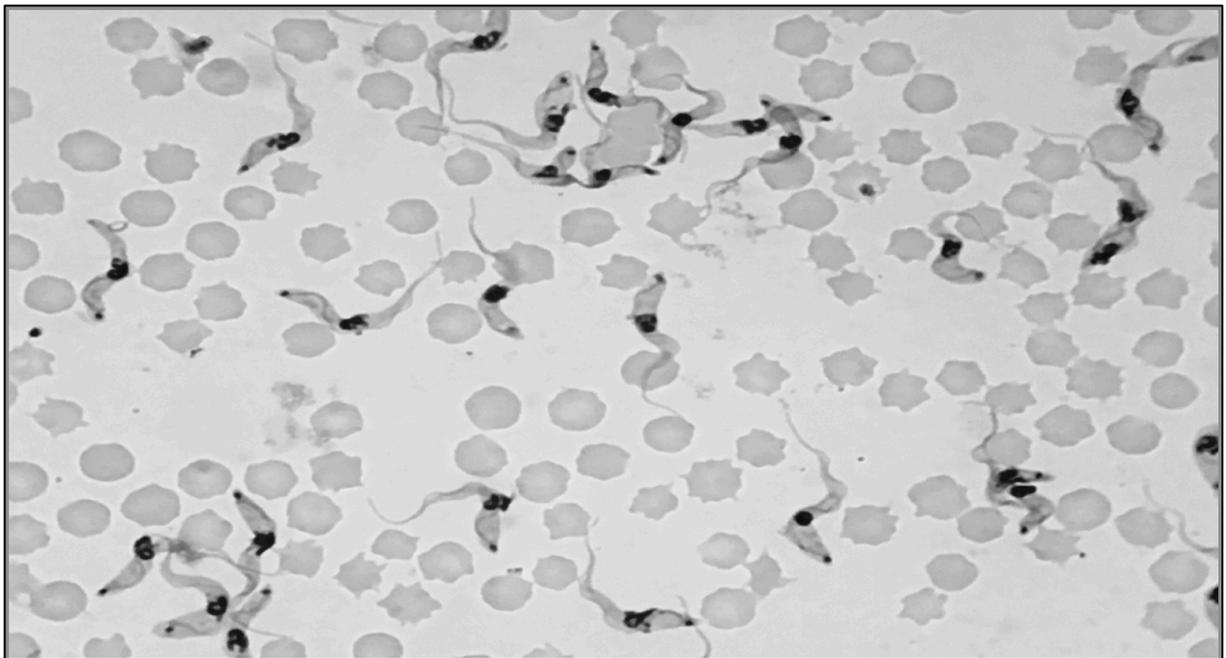


FIGURA 2: *Trypanosoma vivax* em extensão sanguínea corado com May Grunwald/Giemsa e observada em microscopia com óleo de imersão (1.000x). Arquivo pessoal, 2019.

Todas estas técnicas são diretamente influenciadas pela parasitemia, podendo ser úteis para se diagnosticar este parasito no sangue durante a fase aguda da doença, a partir de quatro dias após a infecção, e em seguida por vários meses. Mas, devido a baixa sensibilidade, não são capazes de detectar o parasito durante o período pré-patente, ou durante a fase crônica da enfermidade¹⁰.

Técnicas sorológicas como imunofluorescência (IF) e ensaio Imunoenzimático (ELISA) podem ser utilizadas para diagnóstico direto e indireto. São técnicas úteis para investigação epidemiológica, especialmente para determinação da distribuição de *T. vivax*¹⁰.

Entretanto, a ocorrência de variação antigênica, característica comum de *T. vivax*, dificulta o desenvolvimento e padronização de testes imunológicos, fazendo com que o diagnóstico específico em qualquer caso continue dependendo da demonstração de tripanosomatídeos por métodos parasitológico^{43,44}.

Métodos que envolvem a pesquisa de DNA do parasito são caracterizados como métodos moleculares de diagnóstico direto. Neste caso, um resultado positivo indica infecção ativa, ou seja, presença do agente no organismo do hospedeiro. Dentre os métodos moleculares disponíveis, dois são utilizados com maior frequência: a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o Teste LAMP. São testes que podem detectar baixa parasitemia (comum na fase crônica da doença), entretanto possuem alto custo^{43,45}, além de poderem ser inibidos pela presença de hemoglobina e heparina⁴⁵.

2.6. Tratamento

Quimioterapia com drogas tripanocidas possuem efeito curativo e/ou preventivo, dependendo da forma e dose que forem utilizadas. Estas drogas impedem um ou mais processos, ainda não totalmente compreendidos, que são essenciais para a sobrevivência do microrganismo no corpo do hospedeiro. Animais tratados apresentam rápida eliminação da parasitemia, mas é importante afirmar que tratamento tripanocida isolado não irá curar a tripanosomose, e nem deixar o animal livre do parasito, pois este pode permanecer fora dos locais de ação da droga por algum tempo, antes de retornar ao sangue circulante. Além disso, a recuperação do animal tratado exige manejo eficiente, como fornecimento de alimento adequado e controle de estresse⁴².

Por volta de 1920, o Tartarato de antimônio e potássio foi a primeira droga utilizada com sucesso no tratamento da tripanosomose bovina. Mas, além de exigir várias aplicações, tratava-se de uma droga extremamente irritante e sua aplicação deveria ser feita exclusivamente via endovenosa⁴². Depois que este quimioterápico deixou de ser empregado, foram iniciados tratamentos em bovinos com Brometo de Etídio, na dose de 0,05mg/kg e via intramuscular³⁶.

Posteriormente, dois novos ativos foram empregados no tratamento da tripanosomose bovina: diaceturato de diminazene (de 3,5 a 7mg/kg, aplicado via intramuscular) e cloridrato isometamidium (com uso intramuscular profundo, apresentando efeito curativo na dose de 0,5mg/kg e preventivo quando utilizado 1,0mg/kg)³³. Bovinos, ovinos e equinos tratados com estes fármacos, apresentam efetivo *clearance* do parasito no sangue circulante algumas horas após administração, sendo confirmado através de cPCR.

Entretanto, estudos demonstraram que mesmo após tratamento com estes fármacos, *T. vivax* pode reaparecer espontaneamente na circulação sanguínea do hospedeiro quando este é submetido a situações de estresse, por exemplo^{29 7}.

Em casos onde a incidência da doença é baixa, havendo poucos indivíduos infectados durante o ano, é indicado que se realize tratamento do tipo curativo. Situação comum em casos de *T. vivax* transmitido mecanicamente. O tratamento com drogas curativas é mais efetivo em rebanhos monitorados a cada três meses. Caso algum animal venha à óbito, neste rebanho, sugere que as visitas sejam mensais ou quinzenais.

Por outro lado, quando o rebanho está em constante risco de adquirir o parasito, onde muitos animais se infectam frequentemente, deve-se realizar tratamento do tipo profilático. Tal situação ocorre em áreas onde existe transmissão pela mosca tsé-tsé. Este tipo de tratamento também pode ser utilizado quando o rebanho apresenta baixo desempenho produtivo e reprodutivo, mesmo recebendo visitas e tratamento curativo regularmente. Em situações nas quais não é possível fazer diagnóstico para identificar os animais infectados ou quando o risco de se infectar for intenso, indica-se o tratamento do tipo profilático⁴².

2.6.1. Resistência às drogas tripanocida comercializadas

O desenvolvimento de resistência de *Trypanosoma* às drogas tripanocidas dificulta o tratamento e prevenção da enfermidade¹⁰. Continuamente são relatadas a detecção de cepas denominadas resistentes. Estas, assim como as demais, desaparecem rapidamente do sangue circulante após tratamento. Mas, apresentam a capacidade de reaparecer após um período de tempo variável⁴². Provavelmente, cepas resistentes tenham desenvolvido uma capacidade de se esconder em partes do organismo do hospedeiro, como, por exemplo, nas câmaras oculares ou partes do cérebro, onde a droga não consegue penetrar²⁹. Também, foi observado que cepas resistentes apresentaram virulência menor que cepas não-resistentes e que quando juntas, por competição as cepas resistentes tendem a desaparecer⁴².

2.7. Controle

Tratando-se de um protozoário cuja variabilidade genética dificulta a produção de uma vacina eficaz, o controle deste agente deve ser feito por meio da adoção de medidas como: tratamento de animais doentes; restrição de movimentação de animais infectados, não permitindo o ingresso em áreas não-endêmicas; eliminação da possibilidade de transmissão iatrogênica; controle de vetores, principalmente na época do ano que se reproduzem³³. Esta

restrição de movimentação de animais infectados é importante, pois estes quando sobrevivem à doença, tratados ou não, podem se tornar portadores assintomáticos e posteriormente disseminar o agente no rebanho³³. Já, o uso de defesa inata do hospedeiro no combate à infecção, oferecendo manejo adequado e explorando melhor características genética de raças tripanotolerantes¹⁰.

Justificativa

A partir dos contexto apresentado, este trabalho investigou e reuniu informações sobre os aspectos clinico-epidemiológicos em Goiás, e também comparou diferentes métodos de diagnóstico de tripanosomose bovina, concomitantemente, o presente estudo determinou a eficácia de diferentes protocolos, com diminazene, imidocarb e isometamidium, para o tratamento desta hemoparasitose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar, caracterizar e descrever os aspectos epidemiológicos e clínicos da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanhos bovino leiteiro no estado de Goiás, bem como determinar as vias de infecção, sinais clínicos, eficácia terapêutica de drogas tripanocidas em bezerros Girolando infectados artificialmente com o isolado Ipameri.

3.2. Objetivos específicos

Investigar surtos da tripanosomose no estado de Goiás.

Realizar estudo epidemiológico da tripanosomose bovina causada por *T. vivax* nos rebanhos goianos.

Determinar a capacidade de infecção de *T. vivax* isolado Ipameri pelas seguintes vias: endovenosa, intramuscular, intradérmica e subcutânea, em bezerros.

Descrever as alterações clínicas causadas pelo isolado de *T. vivax* proveniente de Ipameri-GO, em bezerros experimentalmente infectados.

Determinar a eficácia de diacetato de diminazene (7,0 mg/Kg), dipropionato de imidocarb (4,8 mg/kg) e cloridrato de isometamidium (0,5 e 1,0 mg/kg) no tratamento de bezerros experimentalmente infectados com *T. vivax*.

REFERÊNCIAS

1. Lopes STP, da Silva Prado B, Martins GHC, Beserra HEA, de Sousa Filho MAC, Evangelista LSM, Cardoso JFS, Mineiro ALBB, Souza JAT. *Trypanosoma vivax* em bovino leiteiro. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2018;46(1):287.
2. Abrão DC, de Carvalho AÚ, Facury Filho EJ, Bartholomeu DC, Ribeiro MFB. ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DA INFECÇÃO NATURAL EM BOVINOS LEITEIROS POR *Trypanosoma vivax* EM MINAS GERAIS, BRASIL. *Ciência Animal Brasileira*. 2009;1:666-71.
3. Bastos TSA, Faria AM, Madrid DMdC, Bessa LCd, Linhares GFC, Fidelis Junior OL, et al. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2017;26(3):366-71.
4. Otte MJ, Abuabara JY. Transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. *Acta tropica*. 1991;49(1):73-6.
5. Cadioli FA, Barnabé PdA, Machado RZ, Teixeira MCA, André MR, Sampaio PH, et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2012;21(2):118-24.
6. Dagnachew S, Bezie M. Review on *Trypanosoma vivax*. *Afr J Basic Appl Sci*. 2015;7(1):41-64.
7. Desquesnes M. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America: OIE (World Organisation for Animal Health); 2004.
8. Mattioli RC, Wilson RT. Trypanosomes, tsetse and trypanotolerance: coevolution in tropical Africa. *Parassitologia*. 1996;38(3):531-5.
9. Hoare CA. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. The trypanosomes of mammals A zoological monograph. 1972.
10. Osório ALAR, Madruga CR, Desquesnes M, Soares CO, Ribeiro LRR, Costa SCGd. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World-a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(1):1-13.
11. Shaw JJ, Lainson R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1972;66(1):25-32.
12. Fairbairn H. Studies on *Trypanosoma vivax* In.-Morphological differences in strains and their relation to pathogenicity. *Ann Trop Med Parasitol*. 1953 Dec;47(4):394-405.
13. Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Anez N, et al. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*. 2006;133(2):159-69.

14. Madruga CR, Araújo FRd, Soares CO, Melo ESdP, Almeida DA, Almeida Jr NF. Diagnóstico molecular e análise filogenética de isolados brasileiros de *Trypanosoma vivax* baseado na reação da polimerase em cadeia-PCR: Embrapa Gado de Corte Campo Grande; 2003. 5p.
15. Madruga CR, Morzaria S, Majiwa PO. 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). 1999;49:5p.
16. Serra-Freire NM. Oiapoque-outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. Rev Bras Med Vet. 1981;4:30-1.
17. Silva RAMS, Silva JAd, Schneider RC, Freitas Jd, Mesquita D, Mesquita T, et al. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1996;91(5):561-2.
18. Paiva F, Lemos RAAd, Nakasato L, Mori AE, Brum KB, Bernardo KC. *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. 2000;9(2):135-41.
19. Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. Veterinary parasitology. 2007;143(2):174-81.
20. Guerra RdMSN, Júnior F, Batista A, Santos HP, Abreu-Silva AL, Santos ACGd. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. Ciência Rural. 2008;38(3):833-5.
21. Linhares GFC, de Carvalho Dias Filho F, Fernandes PR, Duarte SC. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). Ciência Animal Brasileira. 2006;7(4):455-60.
22. Carvalho AU, Abrão DC, Facury Filho EJ, Paes PRO, Ribeiro MFB. Occurrence of *Trypanosoma vivax* in Minas Gerais state, Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2008;60(3):769-71.
23. Silva ASd, Costa MM, Polenz MF, Polenz CH, Teixeira MMG, Lopes STDA, et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ciênc rural. 2009;39(8):2550-4.
24. Pimentel DS, do Nascimento Ramos CA, do Nascimento Ramos RA, de Araújo FR, Borba ML, da Gloria Faustino MA, et al. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. Veterinary parasitology. 2012;185(2):286-9.
25. Andrade Neto AQA, J.A.B.; Mendonça, C.L.; Souto, R.J.C.; André MRM, R.Z. Surtos de tripanossomíase em bovinos leiteiros no agreste dos estados de Pernambuco e Alagoas. O biológico, supl 2. 2015;77:143.

26. Vieira OLE, Macedo LOd, Santos MAB, Silva JABA, Mendonça CLd, Faustino MAdG, et al. Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2017;26(4):516-20.
27. Costa RVC, Abreu APM, Machado MN, Thomé SMG, Massard CL, Santos HA, et al. Tripanossomíase em bovinos no estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2016;36:161-3.
28. Davila AMR, Ramirez L, Silva R. *Trypanosoma vivax* en Amérique: morphométrie et spectre d'hôtes. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*. 1998;51(1):29-35.
29. Rodrigues CMF, Batista JS, Lima JM, Freitas FJC, Barros IO, Garcia HA, et al. Field and experimental symptomless infections support wandering donkeys as healthy carriers of *Trypanosoma vivax* in the Brazilian Semiarid, a region of outbreaks of high mortality in cattle and sheep. *Parasites & vectors*. 2015;8(1):564.
30. Brener Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas. Belo Horizonte,. Tese de Livre Docência-Faculdade de Odontologia e Farmácia da UFMG. 1961.
31. Silva R, Rivera DÁVila AM, Seidl A, Ramirez L. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. Embrapa Pantanal-Livros científicos (ALICE). 2003.
32. Fidelis Junior OL, Sampaio PH, Machado RZ, André MR, Marques LC, Cadioli FA. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2016;25(1):69-81.
33. Hurtado OJB, Castro PDJ, Giraldo-Rios C. Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. *Veterinary parasitology*. 2016;229:54-9.
34. Silva TMF, Olinda RG, Rodrigues CMF, Câmara ACL, Lopes FC, Coelho WAC, et al. Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. *Veterinary research*. 2013;44(1):1.
35. Adamu S, Fatihu MY, Useh NM, Mamman M, Sekoni VO, Esievo KAN. Sequential testicular and epididymal damage in Zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Veterinary parasitology*. 2007;143(1):29-34.
36. Pereira LJ, de Abreu ACVV. Ocorrência de tripanosomas em bovinos e ovinos na região amazônica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 1978;13(3):17-21.
37. Silva R, Ramirez L, Souza SS, Ortiz AG, Pereira SR, Dávila AMR. Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. *Veterinary parasitology*. 1999;85(1):87-93.

38. Radostits OM, Mayhew IG, Houston DM, Mayhew IGJ. Veterinary clinical examination and diagnosis: WB Saunders; 2000.
39. Batista JS, Bezerra FSB, Lira RA, Carvalho JRG, Neto AMR, Petri AA, et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. Pesq Vet Bras. 2008;28(1):63-9.
40. Woo PTK. Evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for the field diagnosis of human trypanosomiasis and filariasis. Acta tropica. 1971;28(3):298-303.
41. Wilson AJ. Value of the indirect fluorescent antibody test as a serological aid to diagnosis of glossina-transmitted bovine trypanosomiasis. Tropical Animal Health and Production. 1969;1(2):89-95.
42. Uilenberg G, Boyt WP. A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomiasis: Food & Agriculture Org.; 1998.
43. Murray M, Murray PK, McIntyre WIM. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1977;71(4):325-6.
44. Fleming JR, Sastry L, Wall SJ, Sullivan L, Ferguson MAJ. Proteomic identification of immunodiagnostic antigens for *Trypanosoma vivax* infections in cattle and generation of a proof-of-concept lateral flow test diagnostic device. PLoS neglected tropical diseases. 2016;10(9):e0004977.
45. Almeida PJLP, Ndao M, Van Meirvenne N, Geerts S. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. Acta tropica. 1997;66(1):45-50.

CAPÍTULO 2: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL, PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA OCORRÊNCIA AGUDA DE *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DO ESTADO DE GOIÁS, BRASIL

Thiago Souza Azeredo Bastos^{1*}; Adriana Marques Faria¹; Darling Mélyny de Carvalho Madrid¹; Leonardo Bueno Cruvinel¹; João Eduardo Nicaretta¹; Alliny Souza de Assis Cavalcante¹; Dina Maria Beltrán Zapa¹, Luciana Maffini Heller¹; Luiz Fellipe Monteiro Couto¹; Guido Fontgalland Coelho Linhares¹; Valéria de Sá Jayme¹; Gabriel Augusto Marques Rossi²; Vando Edésio Soares³; Fabiano Antônio Cadioli⁴; Welber Daniel Zanetti Lopes⁵.

1-Departamento de Parasitologia Veterinária, Escola de Veterinária e Zootecnia – EVZ, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, GO, Brasil. *E-mail: tsabvet@gmail.com.

2- Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

3- Universidade Brasil – Campus de Descalvado. São Paulo, SP, Brazil.

4- Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rua Clóvis Pestana 793, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil.

5-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, GO, Brasil.

Resumo

Trypanosoma vivax é um protozoário flagelado, causador da tripanosomose bovina. Hemoparasito que vem se disseminando no território brasileiro nos últimos anos. O presente estudo teve como objetivo, verificar a distribuição espacial, a prevalência e fatores de risco para ocorrência aguda de *T. vivax* em bovinos do estado de Goiás, Brasil, por meio da técnica de Woo. Entre maio de 2015 a maio de 2017, foram colhidas amostras de 4.049 animais oriundos de 42 propriedades rurais, localizadas em 26 municípios do estado de Goiás. Com base nos resultados observados, pode-se concluir que surtos de *T. vivax* foram diagnosticados em 358 (8,84%) vacas apenas da raça Girolando com aptidão leiteira, de 24 propriedades localizadas basicamente nas regiões Central e Sul do referido Estado. A presença de tabanídeos, *S. calcitrans* e *H. irritans* não apresentaram-se como fator de risco ($P < 0,05$) para ocorrência deste protozoário. Após a constatação dos surtos, houve um decréscimo de 39,62% na produção média diária de litros de leite das vacas. Além disso, em vacas de três propriedades em que os produtores acreditavam que o problema seria *T. vivax*, foram encontrados animais com elevado grau de parasitismo por *A. marginale*. Por fim, é possível afirmar que a aquisição de novos animais portadores de *T. vivax*, aliado à conduta de administração da ocitocina exógena nas vacas em cada ordenha, utilizando-se a mesma

seringa e agulhas entre vários animais, foram os principais fatores de risco ($P \leq 0,05$) para disseminar este hemoparasito no estado de Goiás, bem como em outras regiões do Brasil, conforme discutido neste estudo. Tal fato demonstra a importância em se restringir, que seja em médio a longo prazo, a prática de se comercializar animais Girolando de aptidão leiteira infectados em eventos de venda coletiva (leilões), assim como eliminar o uso de ocitocina exógena nos animais durante o processo de ordenha de vacas Girolando, podendo, desta maneira, evitar graves problemas aos criadores de bovinos desta raça no Brasil.

Palavras-chave: Epidemiologia; tripanosomose; vetores mecânicos; via iatrogênica.

1. Introdução

Trypanosoma vivax é um protozoário flagelado, causador da tripanosomose bovina. Este agente é originário da África, e acredita-se que foi introduzido no continente Sul Americano por volta de 1.830 com o transporte de bovinos infectados, provenientes do Senegal (Osório et al., 2008; Ventura et al., 2001). O hemoparasito supracitado vive no plasma sanguíneo dos ruminantes, pode ser transmitido por vetores ou de forma iatrogênica e vem assumindo grande importância econômica para bovinos no Brasil (Bastos et al., 2017; Lopes et al., 2018).

Durante aproximadamente 30 anos, desde o primeiro relato de *T. vivax* no Brasil, que aconteceu no Estado do Pará em 1972 (Shaw and Lainson, 1972) até por volta do ano 2.000, o referido protozoário era considerado endêmico e importante apenas para bovinos de corte da região do Pantanal brasileiro (Paiva et al., 2000; Silva et al., 1996), que envolve os estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Depois disso, dentro de aproximadamente 16 anos, a presença de *T. vivax* passou a ser detectada praticamente em todo território nacional, sendo: na Paraíba em 2002 (Batista et al., 2007), Maranhão em 2003 (Guerra et al., 2008), Tocantins em 2005 (Linhares et al., 2006), Minas Gerais em 2007 (Carvalho et al., 2008), São Paulo em 2008 (Cadioli et al., 2012), Rio Grande do Sul em 2009 (Silva et al., 2009), Pernambuco em 2010 (Pimentel et al., 2012), Alagoas em 2013 (Andrade Neto and André, 2015), Goiás em 2015 (Bastos et al., 2017), Sergipe em 2015 (Vieira et al., 2017), Piauí em 2015 (Lopes et al., 2018), Rio de Janeiro 2016 (Costa et al., 2016) e Rio Grande do Norte em 2017 (Lopes et al., 2018).

Diante do histórico descrito anteriormente, é notório que nos últimos anos, *T. vivax* se disseminou rapidamente, em rebanhos bovinos, no território brasileiro. Tal fato, justifica a realização deste estudo que objetivou verificar a distribuição espacial, a prevalência e fatores de risco para ocorrência aguda de *T. vivax* em bovinos do estado de Goiás, Brasil, pela técnica de Woo.

2. Material e Métodos

Este projeto foi submetido e aprovado, protocolo nº 032/16, pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1. Seleção das propriedades e pesquisa de *Trypanosoma vivax* nos bovinos

Entre maio de 2015 a maio de 2017, foram colhidas amostras de 4.049 animais oriundos de 42 propriedades rurais, localizadas em 26 municípios do estado de Goiás (Alexânia, Anápolis, Bonfinópolis, Buriti Alegre, Caldas Novas, Campo Alegre de Goiás, Corumbáiba, Cromínia, Edealina, Gameleira de Goiás, Goianópolis, Goianésia, Goiatuba, Guapó, Ipameri, Itaberaí, Itauçu, Jataí, Mairipotaba, Mambaí, Morrinhos, Pontalina, Porteirão, Quirinópolis, Santa Bárbara de Goiás, Urutaí).

Dentre todos bovinos avaliados, aproximadamente 73% pertenciam a raça originária de cruzamento Girolando (1/2 Holandês + 1/2 sangue Gir e 3/4 Holandês + 1/4 Gir). Os demais 27% eram bovinos da raça holandesa (7/8 Holandês + 1/8 Gir e 15/16 Holandês + 1/16 Gir), Gir, Jersey ou mestiços/Nelore, estes últimos com aptidão para gado de corte.

As propriedades visitadas foram escolhidas de forma aleatória, após contato telefônico com proprietários cadastrados junto à Agência de defesa sanitária do estado de Goiás. Entretanto, durante o contato telefônico, somente as propriedades em que os animais não receberam nenhuma medicação com ação específica contra *T. vivax*, e com problemas agudos sugestivos da enfermidade em questão, e relato de mortalidade de animais recentemente, foram selecionadas para serem visitadas. Durante as visitas, foi feita anamnese e colheita de sangue de todos animais da propriedade, sempre que possível. Também, é importante frisar, que houve contato com proprietários de todas as regiões do estado de Goiás, independente do tipo de exploração (leite, corte ou mista).

A pesquisa de *T. vivax* nas amostras de sangue colhidas dos bovinos, foi realizada por meio da técnica de Woo (Woo, 1970). Aproximadamente 4 mL de sangue, de cada animal, foi colhido da veia caudal, em tubo contendo anticoagulante (EDTA). Imediatamente após a colheita, as amostras foram homogeneizadas e o sangue foi transferido para tubos “capilar” (tubo de microhematócrito) até o preenchimento de 75% do tubo. Em seguida, cada tubo foi colocado em uma micro-centrífuga e depois de cinco minutos de centrifugação (13.000 RCF) realizou-se a leitura do tubo capilar em microscópio óptico, para pesquisa de

tripomastigotas de *T. vivax*, em aumento de 400x. Animais apáticos, e com elevada quantidade de tripomastigotas diagnosticados pela técnica de Woo, aferiu-se temperatura retal bem como quantificou-se a carga parasitêmica de *T. vivax* pela técnica de Brener (Brener, 1969). Quando não foi encontrado *T. vivax* nas propriedades, extensões sanguíneas (Dagnachew e Bezie, 2015) coradas com Giemsa, e/ou observações complementares foram realizadas com o objetivo de tentar determinar a *causa mortis* dos animais. De cada propriedade, foram colhidas amostras de 90% a 100% do rebanho para pesquisa de *T. vivax*.

Em cada propriedade de leite, dos registros presentes nas fazendas, anotou-se a quantidade total diária de leite produzido uma semana antes da compra de novos animais, bem como a quantidade total diária de leite produzida na semana em que foi realizada a visita por nós, na propriedade.

2.2. Distribuição espacial e estimativa dos fatores de risco

O estado de Goiás, situado na região Centro-Oeste do Brasil, possui extensão territorial de 340.106 km². Portanto, para facilitar a interpretação dos resultados de distribuição espacial dos casos registrados, os dados foram agrupados por mesorregiões. As divisões de mesorregiões (Centro, Leste, Norte, Noroeste e Sul), bem como a divisão de municípios, onde foi pesquisado a presença de *T. vivax* nos bovinos, seguiram a divisão estabelecida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019).

Os possíveis fatores de risco, para os bovinos adquirirem *T. vivax* nos rebanhos provenientes do estado de Goiás, foi estimado por meio da análise de dados obtidos com um questionário, aplicado em cada propriedade visitada. Neste questionário perguntava-se: tipo de exploração (corte, leite ou mista); categoria animal que apresenta o problema (vacas em lactação, vacas secas, novilhas, bezerras, touros, novilhos, bezerros); houve compra de animais nos últimos 90 dias, e local de compra dos animais; ocorreu aborto durante esse período; animal doente apresentou dificuldade em se locomover; aconteceu queda na produção de leite recentemente; ocitocina é utilizada durante a ordenha das vacas, e ocorre compartilhamento da mesma seringa e agulha entre os animais; há a presença de moscas hematófagas (como *Tabanus*, *Stomoxys calcitrans* ou *Haematobia irritans*) no rebanho; e se era empregado inseminação artificial.

2.3. Análise dos dados

Os dados referentes às ocorrências do total de animais diagnosticados com *T. vivax* nas mesorregiões e municípios do estado de Goiás, foram utilizados para os cálculos das prevalências e intervalos de confiança com 95% de significância ($P \leq 0,05$). Posteriormente, os percentuais de prevalência foram dispostos em ordem crescente, tanto para mesorregiões quanto para os municípios, definindo o valor de razão de chance (RC) igual a 1 para a menor prevalência observada, sendo então calculadas as demais RC em relação a este. Neste caso, para verificar a significância ($P \leq 0,05$), foi utilizado o teste Z.

A análise de regressão para os fatores de risco, foi verificada a associação entre a prevalência (dicotomizada pela mediana, sendo zero para os valores abaixo e um para os valores acima) de *T. vivax* com todas as variáveis epidemiológicas citadas anteriormente. Com estes dados, aplicou-se uma análise de regressão logística binária simples, para todas as variáveis epidemiológicas supracitadas, sendo selecionadas apenas aquelas que apresentaram $p \leq 0,20$.

Na sequência, utilizando apenas as variáveis que foram significativas na análise univariada ($p \leq 0,20$), realizou-se uma análise de regressão logística binária multivariada. A força de associação entre variáveis dependentes e independentes foi estimada pela Razão de Chance (RC), que foi derivada das estimativas de regressão logística, considerando significativo as que apresentaram $p \leq 0,05$.

Além disso, análise de correlação dos resultados de prevalência de *T. vivax*, com os dados epidemiológicos colhidos nas visitas, foram feitas pelo coeficiente de correlação de Spermann. Todos os procedimentos de manipulação de dados, foram obtidos utilizando o software Epi Info, versão 7.1.5.2.

3. Resultados

T. vivax foi encontrado em 24 propriedades, distribuídas em 14 municípios, apenas em bovinos com aptidão leiteira da raça Girolando e, dentre estes, somente em vacas em lactação e/ou vacas secas. Do total de 4.049 amostras de sangue de bovinos analisadas, por meio da técnica de Woo¹⁹, 358 (8,84%; IC 95% 7,97 – 9,72) apresentaram-se positivas para forma aguda da tripanosomose, conforme exposto na Tabela 1 e Figuras 1A, 1B e 1C.

Em relação às mesorregiões analisadas, a que apresentou maior prevalência em Goiás durante o período analisado foi a região Sul (11,34% - IC 95% 9,70% – 12,99%). Além disso, as regiões Sul (RR= 33,41 e OR= 37,56; $p < 0,0001$) e Central (RR= 28,17 e OR=

30,98; $p < 0,0001$) apresentaram maior chance de conter bovinos com *T. vivax*, em comparação a região Leste.

Em ordem decrescente, os municípios de Urutaí (OR= 35,40 e RR= 25,61; $p=0,0005$), Campo Alegre de Goiás (OR= 34,12 e RR= 24,94; $p=0,0006$), Pontalina (OR=24,62 e RR= 19,50; $p=0,0016$), Morrinhos (OR= 17,16 e RR= 14,55; $p=0,0064$), Caldas Novas (OR=10,74 e RR= 9,69; $p=0,0283$), Bonfinópolis (OR= 10,58 e RR= 9,56; $p=0,0194$) e Ipameri (OR= 10,19 e RR= 9,25; $p=0,0222$), apresentaram maiores chances de ocorrência de *T. vivax* nos bovinos, quando comparado aos municípios de Quirinópolis, Mairipotaba, Goianópolis, Alexânia, Cromínia, Itauçu e Santa Barbara de Goiás, que apresentaram as menores taxas de prevalência (1% a 10%) para *T. vivax* (Figura 1B e Tabela 2).

Ao analisar os resultados pelo município de procedência, observou-se que dos 26 analisados no estado de Goiás, em 12 deles (Anápolis, Edealina, Buriti Alegre, Corumbaíba, Gameleira de Goiás, Goianésia, Goiatuba, Guapó, Itaberaí, Jataí, Mambaí e Porteirão) não foram identificados animais positivos para *T. vivax* (Tabela 2). É importante frisar que em quatro destas propriedades, localizadas nos municípios de Mambaí, Buriti Alegre, Jataí e Quirinópolis, em que não foi encontrada a presença de *T. vivax*, a extensão sanguínea revelou a presença de elevado parasitismo por *Anaplasma marginale* nas vacas, o que provavelmente foi a *causa mortis* de alguns animais, evento relatado pelos proprietários destes locais durante o preenchimento dos questionários.

Os municípios com a maior quantidade de animais avaliados, ou seja, que tiveram melhor representatividade amostral, em ordem crescente, foram Jataí, Urutaí, Itauçu Pontalina, Mambaí, Ipameri e Bonfinópolis. Nestes, a prevalência de *T. vivax* nos bovinos variou de 0,0% a 28,46% (Tabela 2). No entanto, quando se considera a maior prevalência aparente, os municípios Quirinópolis, Ipameri, Bonfinópolis, Caldas Novas, Morrinhos, Pontalina, Campo Alegre de Goiás e Urutaí apresentaram índices superiores a 10% (Tabela 2).

Dentre as variáveis epidemiológicas avaliadas neste estudo, por meio da análise de regressão logística, foi possível verificar que o tipo de exploração animal (corte, leite ou mista), a categoria animal (vacas em lactação e demais), a compra de animais nos últimos 90 dias, o impacto negativo na produção de leite diária repentina e a utilização de ocitocina durante a ordenha das vacas compartilhando a mesma seringa e agulha entre os animais, apresentaram associação significativa ($P \geq 0,05$) com a ocorrência de *T. vivax* nos bovinos do estado de Goiás (Tabela 3).

Foi possível verificar correlação positiva significativa ($P \leq 0,05$) entre a prevalência de *T. vivax* com a categoria animal (0,78), tipo de exploração bovina (0,68), compra de animais nos últimos 90 dias (0,38), local de compra destes animais (0,87) e uso de ocitocina nas vacas durante a ordenha compartilhando a mesma seringa e agulha (0,69). Além disso, a compra de animais nos últimos 90 dias também apresentou correlação positiva significativa ($P \leq 0,05$) com a ocorrência de abortos (0,69), com a dificuldade dos animais se locomoverem, com o impacto negativo na produção de leite diária repentina (0,54) e com o local de compra destes animais (0,41). Ainda foi possível observar correlação positiva significativa ($P \leq 0,05$) entre o local de compra dos animais com o tipo de exploração bovina (0,40) e também com o uso de ocitocina nas vacas durante a ordenha compartilhando a mesma seringa e agulha (0,38).

A produção média diária de litros de leite produzida antes dos surtos (1.595 litros $\pm 1201,9$), nas 24 propriedades em que o *T. vivax* foi diagnosticado, foi estatisticamente ($P \leq 0,05$) superior a quantidade média de litros leite diária produzida (963,0 $\pm 686,2$) por estas mesmas propriedades após os surtos causados pela infecção deste protozoário. Em outras palavras, a ocorrência dos surtos por *T. vivax* (± 90 dias) proporcionou uma queda de 39,62% na produção média diária de litros de leite produzido pelas vacas destas 24 propriedades.

4. Discussão

Nos últimos 16 anos, *T. vivax* se disseminou rapidamente pelo território brasileiro (Andrade Neto e André, 2015; Bastos et al., 2017; Batista et al., 2007; Cadioli et al., 2012; Carvalho et al., 2008; Costa et al., 2016; Guerra et al., 2008; Linhares et al., 2006; Lopes et al., 2018; Pimentel et al., 2012; Silva et al., 2009; Vieira et al., 2017). Entretanto, é importante frisar que em 11 destes surtos publicados, aconteceram em gado leiteiro Girolando, e, dentre estes, em dez haviam relatos da introdução de novos animais no rebanho, provenientes de compra. Além disso, em sete destes relatos, os pesquisadores descrevem a utilização de ocitocina e/ou vacinas, como possíveis fatores predisponentes para ocorrência de *T. vivax* nos respectivos rebanhos.

Os resultados encontrados no presente estudo, com associação significativa ($P \leq 0,05$) principalmente entre o tipo de exploração bovina, a compra de animais recentemente e uso de ocitocina nas vacas durante a ordenha, com a prevalência de *T. vivax* nos bovinos, justificam o porque da rápida disseminação deste protozoário, em bovinos com aptidão leiteira, no estado de Goiás e possivelmente em outras regiões do Brasil.

O uso de ocitocina nas vacas é um manejo que comumente vem sendo adotada em propriedades de animais Girolando. Diariamente, administra-se cinco unidades internacionais (UI) de ocitocina via endovenosa (veia epigástrica cranial superficial) nas fêmeas em lactação. Esse hormônio está envolvido em diferentes funções como nas contrações uterinas durante o parto, acasalamento e descida do leite (Araújo et al., 2012). Em animais Girolando, para ocorrer a descida do leite até o teto da vaca de forma rápida durante a ordenha, geralmente é necessário o condicionamento/treinamento dos animais desde novilhas (método mais indicado), ou é necessária a presença e estímulo do bezerro junto a vaca, sendo, na sequência, a ocitocina endógena naturalmente liberada na corrente sanguínea do animal. Como atualmente a ordenha das vacas da raça Girolando acontece sem a presença dos bezerros, e em muitos sistemas de criação os proprietários não condicionam os animais de forma adequada, estes produtores optam pela administração endovenosa de ocitocina exógena antes de cada ordenha, o que aumenta a velocidade da descida do leite até o teto da vaca, reduzindo desta forma, o tempo de cada ordenha (Araújo et al., 2012). O problema é que nestes casos, esta prática de manejo acaba sendo realizada com a mesma agulha e seringa em vários animais. Entretanto, a administração de ocitocina apresenta importância na disseminação de enfermidades entre os animais de uma mesma propriedade.

A aquisição de novos animais, potencialmente infectados por *T. vivax*, apresenta-se como um dos principais fatores predisponentes para que ocorra a disseminação deste protozoário entre diferentes propriedades. O principal agravante para que ocorra o comércio de animais com aptidão leiteira entre os proprietários, é o valor agregado que há nas vacas, quando comparado ao valor de comércio de um animal com aptidão para o corte. Por exemplo, uma vaca de leite custa em torno de R\$ 5.000,00 (cerca de \$1.350,00) quando comercializada entre proprietários, enquanto que se este mesmo animal for abatido em frigorífico, como se fosse um animal de corte, o proprietário receberá um valor máximo de R\$2.500,00 a R\$3.000,00 (entre \$675,00 e \$810,00)²². Por este motivo, os proprietários acabam comercializando estes animais de aptidão leiteira de maneira coletiva, em leilões, o que auxilia diretamente na disseminação deste protozoário para outras propriedades. Desta maneira, diante dos resultados obtidos, aliado ao histórico de trabalhos citados anteriormente, é possível afirmar que a aquisição de novos animais portadores de *T. vivax*, aliado a conduta da administração da ocitocina exógena nas vacas em cada ordenha, utilizando-se a mesma seringa e agulhas em vários animais, foi a principal causa de disseminação do agente no estado de Goiás e também em outras regiões do Brasil.

No estado do Mato Grosso, Silva et al. (1996), relataram que a transmissão animal-animal nesta região está relacionada à presença de vetores mecânicos, como mutucas do gênero *Tabanus* (Otte e Abuabara, 1991). No semiárido brasileiro, e também em Minas Gerais, um surto de *T. vivax* foi relacionado com a grande quantidade de *Stomoxys calcitrans* (Batista et al., 2018; Batista et al., 2012). Cadioli et al. (2012), no estado de São Paulo, verificaram que a transmissão de bovino para bovino, possivelmente aconteceu com auxílio da grande densidade populacional de *Haematobia irritans* e *Stomoxys calcitrans*. Entretanto, em nenhuma das 24 propriedades em que os surtos de *T. vivax* foram diagnosticados, puderam ser correlacionados ($P > 0,05$) com a presença de tabanídeos, *S. calcitrans* ou mesmo de *H. irritans*. Sendo assim, futuros estudos que avaliem a capacidade de disseminação de transmissão de *T. vivax* pelas moscas hematófagas, bem como um estudo que avalie a capacidade de propagação de *T. vivax* via iatrogênica, são necessários.

A queda repentina de 39,62% na produção média diária de litros leite dos animais observada nas propriedades com surtos de *T. vivax*, esta pode ser justificada pela febre persistente que a fase aguda desta doença desencadeia nos bovinos com elevada parasitemia por *T. vivax* ($\geq 2 \times 10^6$). É notório que a febre repentina e persistente, resulta em anorexia nos animais (Cavalcante, 2000; Peixoto et al., 2011). Além disso, resultados encontrados por demais pesquisadores (Almeida et al., 2010; Dagnachew e Bezie, 2015; Desquesnes, 2004; Schenk et al., 2001), que descrevem haver correlação positiva entre a presença de hipertermia nos bovinos durante a fase aguda da enfermidade em questão, reforçam ainda mais a inferência descrita neste parágrafo.

A prevalência para *T. vivax* em bovinos, tem relação direta com a sensibilidade do método de diagnóstico utilizado. Tais valores variam de 29% de positividade quando se utiliza as técnicas parasitológicas diretas (Cuglovici et al., 2010), chegando até 62% para técnicas sorológicas (Alves et al., 2017; Cuglovici et al., 2010). Entretanto, em um estudo comparativo entre as técnicas de Imunofluorescência indireta, com PCR convencional (cPCR) e Woo, realizado por Alves et al. (2017), os autores concluem que a cPCR mostrou ser mais sensível na detecção de baixas parasitemia, enquanto que a técnica de Woo, é uma ferramenta que pode ser utilizada na identificação de animais durante a fase aguda da infecção em surtos de *T. vivax*. Tal fato, justifica a utilização da técnica de Woo, uma vez que o objetivo neste estudo, foi diagnosticar casos agudos da enfermidade em bovinos, e desta forma, obter informações mais precisas por parte dos produtores, possibilitando compreender melhor o perfil epidemiológico de disseminação desta enfermidade no estado de Goiás.

5. Conclusão

Surtos de tripanosomose ocorreram principalmente nas regiões Central e Sul e Goiás. A prevalência da tripanosomose no estado foi de 8,84%, afetando apenas vacas da raça Girolando com aptidão leiteira. Nas propriedades afetadas, houve decréscimo de 39,62% na produção média diária de litros de leite das vacas. A presença de tabanídeos, *S. calcitrans* e *H. irritans* não apresentaram-se como fator de risco ($P < 0,05$) para ocorrência deste protozoário. Além disso, em três propriedades em que os produtores acreditavam que o problema seria *T. vivax*, foram encontrados animais com elevado grau de parasitismo por *A. marginale* nas vacas. Por fim, é possível afirmar que a aquisição de novos animais portadores de *T. vivax*, aliado à conduta de administração da ocitocina nas vacas em cada ordenha, utilizando-se a mesma seringa e agulhas entre vários animais, foram os principais fatores de risco ($P \leq 0,05$) para ocorrer a disseminação deste hemoparasito no estado de Goiás e também em outras regiões do Brasil, conforme discutido neste estudo. Tal fato, demonstra a importância em buscar alternativas para eliminar, que seja em médio a longo prazo, a prática de se comercializar animais Girolando de aptidão leiteira infectados em eventos de venda coletiva (como leilões), assim eliminar o uso de ocitocina exógena nos animais durante o processo de ordenha de vacas Girolando, evitando, desta maneira, graves problemas aos criadores de bovinos desta raça no Brasil.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Fundo para o Desenvolvimento da Agropecuária em Goiás (FUNDEPEC-GOIÁS), termo de compromisso assinado em 05/05/2016, e também contou com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Referências

Almeida KS, Freitas FLC, Tebaldi JH, Alessi AC, Machado RZ, Nascimento AA. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. *Ciência Animal Brasileira*. 2010;11(3):669-76.

Alves WP, Abrã D, Fern L, Angã J, Facury-Filho EJ, Flã Mc. Comparison of three methods for diagnosis of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in cattle. *Genetics and Molecular Research*. 2017;16(4).

Andrade Neto AQA, J.A.B.; Mendonça, C.L.; Souto, R.J.C.; André MRM, R.Z. Surtos de tripanossomíase em bovinos leiteiros no agreste dos estados de Pernambuco e Alagoas. . *O biológico*, supl 2. 2015;77:143.

Araújo WAGd, Carvalho CGV, Marcondes MI, do Sacramento AJR, Paulino PVR. Ocitocina exógena e a presença do bezerro sobre a produção e qualidade do leite de vacas mestiças. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2012;49(6):465-70.

Bastos TSA, Faria AM, Madrid DMdC, Bessa LCd, Linhares GFC, Fidelis Junior OL, et al. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2017;23(3):366-71.

Batista JS, Moura GHF, Lopes FC, Paiva KARd, Araújo Júnior HNd, Góis RCdS, et al. Risk factors for trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle raised in Rio Grande do Norte state. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2018;85.

Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary parasitology*. 2007;143(2):174-81.

Batista JS, Rodrigues CMF, Olinda RG, Silva TMF, Vale RG, Câmara ACL, et al. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. *Parasitology research*. 2012;110(1):73-80.

Cadioli FA, Barnabé PdA, Machado RZ, Teixeira MCA, André MR, Sampaio PH, et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2012;21(2):118-24.

Carvalho AU, Abrão DC, Facury Filho EJ, Paes PRO, Ribeiro MFB. Occurrence of *Trypanosoma vivax* in Minas Gerais state, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2008;60(3):769-71.

Cavalcante FA. Rinotraqueíte infecciosa bovina (nariz vermelho), diagnóstico e controle. Embrapa Acre-Séries anteriores (INFOTECA-E). 2000.

Costa RVC, Abreu APM, Machado MN, Thomé SMG, Massard CL, Santos HA, et al. Tripanossomíase em bovinos no estado do Rio de Janeiro. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2016;36:161-3.

Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MFB. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. Veterinary parasitology. 2010;169(3-4):320-6.

Dagnachew S, Bezie M. Review on *Trypanosoma vivax*. Afr J Basic Appl Sci. 2015;7(1):41-64.

Desquesnes M. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America: OIE (World Organisation for Animal Health); 2004.

Guerra RdMSN, Júnior F, Batista A, Santos HP, Abreu-Silva AL, Santos ACGd. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. Ciência Rural. 2008;38(3):833-5.

IBGE. - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário de 2008. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br>. Acesso em: 06 jan. 2019.

Linhares GFC, de Carvalho Dias Filho F, Fernandes PR, Duarte SC. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). Ciência Animal Brasileira. 2006;7(4):455-60.

Lopes STP, da Silva Prado B, Martins GHC, Esmeraldo H, Beserra A, de Sousa Filho MAC, et al. *Trypanosoma vivax* em bovino leiteiro. Acta Scientiae Veterinariae. 2018;46(1):287.

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

Otte MJ, Abuabara JY. Transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. *Acta tropica*. 1991;49(1):73-6.

Paiva F, Lemos RAA, Nakasato L, Mori AE, Brum KB, Bernardo KC. *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*. 2000;9(2):135-41.

Peixoto PV, Cunha BM, França TN, Bezerra Junior PS, Brust LAC, Terra TMF, et al. Hereditary encephalopathy of cattle in Espírito Santo state, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2011;31(9):723-30.

Pimentel DS, do Nascimento Ramos CA, do Nascimento Ramos RA, de Araújo FR, Borba ML, da Gloria Faustino MA, et al. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. *Veterinary parasitology*. 2012;185(2):286-9.

Rocha WV, Gonçalves VSP, Coelho CGFL, Brito WME, Dias R, Delphino M, Ferreira F, Amaku M, Ferreira Neto JS, Figueiredo VC, Lôbo JR, Brito LAB. Epidemiological status of bovine brucellosis in the State of Goiás, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009;61(supl 1):27-34.

Schenk MAM, Mendonça CL, Madruga CR, Kohayagawa A, Araújo FR. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2001:157-61.

Scot. consultoria. Disponível em: <https://www.scotconsultoria.com.br/leite/mercado-leite>. Acesso em: 06/01/2019. 2019.

Shaw JJ, Lainson R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1972;66(1):25-32.

Silva ASd, Costa MM, Polenz MF, Polenz CH, Teixeira MMG, Lopes STDA, et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc rural*. 2009;39(8):2550-4.

Silva RAMS, Silva JAd, Schneider RC, Freitas Jd, Mesquita D, Mesquita T, et al. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1996;91(5):561-2.

Ventura RM, Paiva F, Silva RAMS, Takeda GF, Buck GA, Teixeira MMG. *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*. 2001;99(1):37-48.

Vieira OLE, Macedo LOd, Santos MAB, Silva JABA, Mendonça CLd, Faustino MAdG, et al. Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2017. 24(4):516-20.

Woo PTK. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta tropica*. 1970;27(4):384-6.

FIGURA 1: (A) Mesorregiões do estado de Goiás, (B) Distribuição espacial de *T. vivax* no estado de Goiás durante o período avaliado e (C) Distribuição da criação de gado bovino no estado de Goiás, em relação a aptidão (corte, leite ou mista). Adaptado de Rocha et al. 2009.

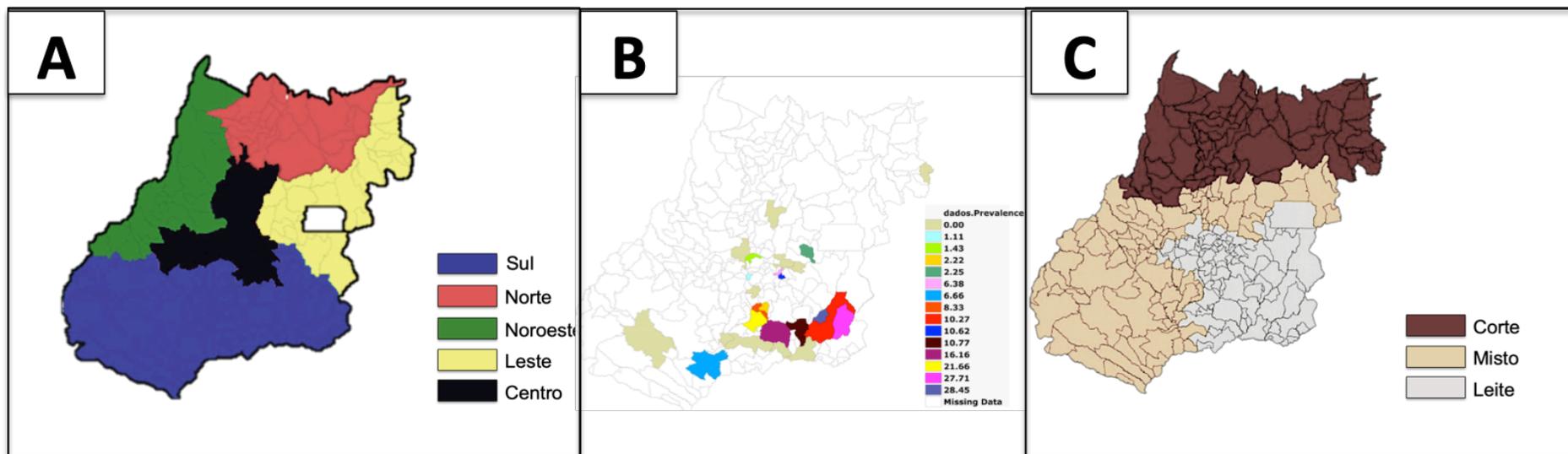


TABELA 1: Análise de associação entre as mesorregiões do estado de Goiás, referente a prevalência de *Trypanosoma vivax* diagnosticados nos bovinos.

Mesorregião	Total de Animais	Representatividade (%) da <i>T. vivax</i> em relação ao total de bovinos abatidos			Prevalência (%)			Risco Relativo					Odds ratio				
		Positivo	Negativo		Valor	95 % CI		Valor	95 % CI		z statistic	Significance level	Valor	95 % CI		z statistic	Significance level
Norte	0	0	0	0	0.00												
Noroeste	0	0	0	0	0.00												
Leste	589	14.55	2	587	0.34	-0.13	- 0.81	1.00					1.00				
Central	2032	50.19	194	1838	9.55	8.27	- 10.82	28.17	7.00	- 112.89	4.70	<0,0001	30.98	7.67	- 125.14	4.82	<0,0001
Sul	1428	35.27	162	1266	11.34	9.70	- 12.99	33.41	8.31	- 134.29	4.94	<0,0001	37.56	30.12	- 46.82	32.22	<0,0001
-	4049	100.0	358	3691	8.84	7.97	- 9.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Mesorregiões com Odds ratio (OR) e Risco relativo > 1 (95% CI > 1), apresentam maior chance de conter bovinos com *Trypanosoma vivax*.

TABELA 2: Análise de associação entre os municípios do estado de Goiás, referente a prevalência de *Trypanosoma vivax* diagnosticados nos bovinos, no período de maio de 2015 a maio de 2017.

MUNICÍPIO	Mesorregião	Total de Animais	Representatividade (%) do município em relação ao total de bovinos abatidos	Protozoários		Prevalência (%)			Risco Relativo				Odds ratio					
				Positivo	Negativo	Valor	95 % CI		Valor	95 % CI		z statistic	Significance level	Valor	95 % CI		z statistic	Significance level
Anápolis	Central	110	2.72	0	110	0.00												
Edealina	Sul	25	0.62	0	25	0.00												
Buriti Alegre	Central	27	0.67	0	27	0.00												
Corumbáiba	Sul	25	0.62	0	25	0.00												
Gameleira de Goiás	Sul	40	0.99	0	40	0.00												
Goianésia	Central	10	0.25	0	10	0.00												
Goiatuba	Sul	50	1.23	0	50	0.00												
Guapó	Central	20	0.49	0	20	0.00												
Itaberaí	Central	25	0.62	0	25	0.00												
Jataí	Sul	120	2.96	0	120	0.00												
Mambai	Leste	500	12.35	0	500	0.00												
Porteirão	Sul	20	0.49	0	20	0.00												
Santa Bárbara de Goiás	Central	90	2.22	1	89	1.11	0.00 - 3.28	1.00						1.00				
Itauçu	Central	140	3.46	2	138	1.43	0.00 - 3.39	1.29	0.12 - 13.97	0.21	0.8364	1.29	0.12 - 14.44	0.21	0.8364			
Cromínia	Sul	45	1.11	1	44	2.22	0.00 - 6.53	2.00	0.13 - 31.24	0.49	0.6211	2.02	0.12 - 33.11	0.49	0.6213			
Alexânia	Leste	89	2.20	2	87	2.25	0.00 - 5.33	2.02	0.19 - 21.91	0.58	0.5623	2.05	0.18 - 22.98	0.58	0.5618			
Goianápolis	Central	47	1.16	3	44	6.38	0.00 - 13.37	5.74	0.61 - 53.72	1.53	0.1253	6.07	0.61 - 60.03	1.54	0.1231			
Mairipotaba	Sul	12	0.30	1	11	8.33	0.00 - 23.97	7.50	0.50 - 112.23	1.46	0.1444	8.09	0.47 - 138.73	1.44	0.1493			
Quirinópolis	Sul	20	0.49	2	18	10.00	0.00 - 23.15	9.00	0.86 - 94.47	1.83	0.0670	9.89	0.85 - 114.98	1.83	0.0672			
Ipameri	Sul	584	14.42	60	524	10.27	7.81 - 12.74	9.25	1.30 - 65.89	2.22	0.0264	10.19	1.39 - 74.48	2.29	0.0222			
Bonfinópolis	Central	1440	35.56	153	1287	10.63	9.03 - 12.22	9.56	1.35 - 67.54	2.26	0.0236	10.58	1.46 - 76.49	2.34	0.0194			
Caldas Novas	Sul	65	1.61	7	58	10.77	3.23 - 18.31	9.69	1.22 - 76.88	2.15	0.0316	10.74	1.29 - 89.60	2.19	0.0283			
Morrinhos	Sul	99	2.45	16	83	16.16	8.91 - 23.41	14.55	1.97 - 107.48	2.62	0.0087	17.16	2.23 - 132.25	2.73	0.0064			
Pontalina	Sul	240	5.93	52	188	21.67	16.45 - 26.88	19.50	2.74 - 138.97	2.96	0.0030	24.62	3.35 - 180.95	3.15	0.0016			
Campo Alegre de Goiás	Sul	83	2.05	23	60	27.71	18.08 - 37.34	24.94	3.44 - 180.60	3.18	0.0015	34.12	4.49 - 259.44	3.41	0.0006			
Urutaí	Central	123	3.04	35	88	28.46	20.48 - 36.43	25.61	3.57 - 183.48	3.23	0.0012	35.40	4.75 - 264.06	3.48	0.0005			
-	-	4049	100.00	358	3691	8.84	7.97 - 9.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Municípios com Odds ratio (OR) e Risco relativo > 1 (95% CI > 1), apresentam maior chance de conter bovinos com *Trypanosoma vivax*.

TABELA 3: Associação entre a prevalência de *Trypanosoma vivax* diagnosticado no estado de Goiás, entre maio de 2015 a maio de 2017, com variáveis epidemiológicas utilizando a análise de regressão logística.

Variável epidemiológica*	Odds ratio	95 % CI		Nível de significância
Tipo de exploração (bovinocultura de leite)	1,3175	1,1309	- 1,5349	0,0004
Categoria animal (vacas em lactação ou secas)	1,4096	1,2505	1,5889	< 0,00001
Compra de animais nos últimos 90 dias	2,6009	2,0057	- 3,3726	< 0,00001
Utilizam ocitocina durante a ordenha compartilhando a mesma agulha e seringa entre vários animais	18,4205	12,3217	- 27,5379	< 0,00001
Impacto repentino na produção diária de leite	1,0002	1,0002	- 1,0003	< 0,00001

* Variável epidemiológica com Odds ratio (OR) > 1 (95% CI > 1), apresentam maior chance de conter bovinos com *Trypanosoma vivax*.

CAPÍTULO 3: CAPACIDADE DE INFECÇÃO DE *Trypanosoma vivax* INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE POR DIFERENTES VIAS EM BOVINOS COM *Anaplasma marginale* LATENTE

Thiago Souza Azeredo Bastos^{1*}; Adriana Marques Faria¹; Alliny Souza de Assis Cavalcante¹; Darling Mélyny de Carvalho Madrid¹; Dina Maria Beltrán Zapa¹, Jaires Gomes de Oliveira Filho¹; João Eduardo Nicaretta¹; Leonardo Bueno Cruvinel¹; Lorena Lopes Ferreira¹; Luciana Maffini Heller¹; Luiza Gabriella Ferreira de Paula¹; Luiz Fellipe Monteiro Couto¹; Vando Edésio Soares²; Fabiano Antônio Cadioli³; Welber Daniel Zanetti Lopes⁴.

1-Departamento de Parasitologia Veterinária, Escola de Veterinária e Zootecnia – EVZ, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, GO, Brasil. *E-mail: tsabvet@gmail.com.

2- Universidade Brasil – Campus de Descalvado. São Paulo, SP, Brazil.

3- Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rua Clóvis Pestana 793, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil.

4-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, GO, Brasil.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo realizar um estudo comparativo da capacidade de infecção de *Trypanosoma vivax* inoculados experimentalmente por diferentes vias em bovinos com *Anaplasma marginale* latente. Vinte e cinco bezerros Girolando, naturalmente infectados por *A. marginale*, no dia 0 do estudo receberam aproximadamente 1×10^6 tripomastigotas de *T. vivax* isolado Ipameri-GO pelas vias intradérmica (T01), subcutânea (T02), intramuscular (T03) e endovenosa (T04). Outros cinco animais permaneceram como controle (não infectados). Pesquisa de *T. vivax* foi realizado em todos os bovinos entre D+1 e D+30 pelos Métodos de Woo, Brener e extensão sanguínea. PCR foi realizado nos dias D+1, D+3, D+ 4, D+5, D+28, D+29 e D+30. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que *T. vivax* foi capaz de infectar e desenvolver a doença nos bezerros, independente da via inoculada. Os animais apresentaram correlação positiva entre *T. vivax* e temperatura retal ($P \leq 0,05$), e correlação negativa entre este protozoário e volume globular ($P \leq 0,05$). Foram à óbito 60% dos bezerros. *A. marginale* latente nos bezerros atuou como co-infecção para *T. vivax*, interferindo diretamente no percentual de mortalidade dos animais. Icterícia foi visualizada apenas nos bezerros que apresentaram elevada parasitemia por *A. marginale*. Por este motivo, em áreas com a presença confirmada de *T. vivax* nos bovinos, este protozoário deve ser incluído junto ao complexo denominado “Tristeza Parasitária Bovina”, que, atualmente, englobam apenas *Anaplasma* e *Babesia*.

Palavras-chave: Anaplasmoses; Infecção; Tripanossomíase; Tristeza Parasitária Bovina.

1. Introdução

Dentre os hemoparasitos que acometem bovinos, destacam-se o protozoário *Trypanosoma vivax*, e os agentes causadores da síndrome Tristeza Parasitária Bovina (TPB): *Anaplasma marginale*, uma riquetsia, e *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, ambos protozoários. A prevalência de bovinos infectados pelos agentes da TPB em áreas endêmicas é maior que 90% em animais com idade superior a sete meses. Entretanto, *A. marginale* vem se destacando em relação à *Babesia*, demonstrando prevalência/parasitemia mais elevada nos bovinos e, conseqüentemente, desencadeando surtos em rebanhos (Machado et al. 2015; Yeó et al. 2017).

Em relação ao *T. vivax*, este vive no plasma sanguíneo dos animais e gera prejuízos significativos em inúmeros rebanhos de bovinos leiteiros no Brasil (Batista et al. 2007; Cadioli et al. 2012; Andrade Neto et al. 2015; Bastos et al. 2017). A transmissão deste agente para os bovinos pode ocorrer tanto por dípteros hematófagos, quanto por fômites contaminados. Na África, os principais vetores biológicos são moscas hematófagas Tsé-Tsé (*Glossina* spp.), enquanto que na América do Sul, está comprovado a transmissão por tabanídeos. Mas, no Brasil, acredita-se que também possa ocorrer a transmissão mecânica por *Stomoxys calcitrans* (Dagnachew et al., 2015) ou *Haematobia irritans* (Cadioli et al. 2012). No que diz respeito aos fômites contaminados, como fonte de infecção para os bovinos, utilização compartilhada de agulhas merecem destaque uma vez que geralmente, em um mesmo dia, são reutilizadas em diferentes animais. Um manual confeccionado pelo USDA (2011), relata que aproximadamente 85% dos produtores reutilizam a mesma agulha entre os animais. Dentre estes, 32% utilizam a mesma agulha em 11 a 30 bovinos.

Apesar da reutilização das agulhas em diferentes animais poder apresentar destaque na transmissão de *T. vivax* entre os bovinos, seu uso por diferentes vias merece ser estudada. Inúmeros são os medicamentos que apresentam indicação de uso pelas vias subcutânea, intramuscular ou endovenosa (Lopes et al. 2009, Spézió et al. 2015, Gomes et al. 2015), ou ainda, quando a mesma agulha é compartilhada para mais de um bovino pela via intradérmica, em testes de diagnóstico para tuberculose (Brasil - IN, 2017). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a capacidade de infecção de *T. vivax* em bovinos, inoculados experimentalmente por diferentes vias, com *A. marginale* latente.

2. Material e Métodos

Este projeto foi submetido e aprovado, protocolo nº 032/16, pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1. Histórico dos bovinos, local do estudo, alimentação e período de aclimação

Os 25 animais utilizados neste estudo eram provenientes de uma fazenda comercial livre de *T. vivax*, localizada no município de Goiatuba, estado de Goiás, distante 140 km da cidade de Goiânia-GO. Os 25 bezerros machos, Girolando, após o nascimento foram criados em sistema de casinhas em contato com o solo até o desmame (aproximadamente 60 dias de idade), quando na sequência foram destinados a áreas de piquetes com gramínea *Brachiaria decumbens* para haver contato com carrapatos e consequentemente agentes da TPB. Durante este período, os animais recebiam *ad libitum* gramínea e água. Com aproximadamente seis meses de idade (D-14 do estudo), quando todos os bezerros apresentaram, de forma assintomática, presença de *A. marginale* diagnosticados por meio da extensão sanguínea (Dagnachew et al. 2015), e ausência de infecção por *T. vivax* detectado pelos métodos de Woo, Brener, esfregaço e cPCR (Woo 1970, Brener 1961, Dagnachew et al. 2015, Cortez et al. 2009), os animais foram transportados para a Universidade Federal de Goiás.

A etapa experimental deste estudo foi realizada entre Fevereiro e Março de 2017 no Galpão de Experimentação para Animais de Grande Porte e no Centro de Parasitologia Veterinária, ambos pertencentes à Universidade Federal de Goiás (CPV/UFG). Neste local, os animais foram alojados em 10 baias de 9 m², protegidas com tela de *nylon* (com 3 mm de distância entre fios), para prevenção de ataques por possíveis moscas hematófagas. Em cada baia haviam de dois a três animais.

Ao adentrarem nas baias, todos bezerros receberam: medicação específica contra helmintos (albendazole 5mg/kg, Valbazen®, Zoetis); pulverização com associação de alfacipermetrina + clorpirifós + ethion (Potenty®, MSD Saúde Animal) contra carrapatos e toltrazuril 15mg/kg (Baycox®, Bayer Saúde Animal) via oral contra *Eimeria* spp. Durante todo período que permaneceram estabulados, os bezerros receberam água e feno de capim tifton *ad libitum*, bem como ração comercial na quantidade de 1,5% de peso do animal por dia. O período de aclimação foi de 10 dias (D-10 ao D-1).

2.2. Formação dos grupos experimentais, preparação e infecção dos bovinos com o inóculo

Os animais foram distribuídos em cinco grupos e infectados por diferentes vias: T01= intradérmica, T02 = subcutânea, T03 = intramuscular, T04 = endovenosa e T05 = controle negativo não infectado. O critério de randomização e distribuição dos animais aos grupos de tratamentos foi realizado de acordo com o peso aferido de cada animal obtido no dia -1 e na localização da baía. Os bovinos foram divididos em cinco blocos de cinco animais cada, e dentro de cada bloco, os animais foram aleatoriamente alocados aos grupos de tratamento. Conjuntos de dois e três blocos subsequentes foram designados a conjuntos de cinco baias próximas, respectivamente, e os animais dentro destes agrupamentos de blocos foram alocados ao acaso às baias dentro do conjunto.

A presença de parasitismo por *A. marginale*, detectado pela extensão sanguínea (Dagnachew et al. 2015), bem como ausência de infecção por *T. vivax* diagnosticado pelos métodos de Woo (Woo, 1970), Brener (1961), extensões sanguíneas (Dagnachew et al. 2015) e PCR convencional (cPCR - Cortez et al. 2009), foi confirmado novamente nos 25 bezerros no D-1, antes da administração do inóculo.

Como inóculo, foi utilizado o isolado Ipameri (Bastos et al., 2017 - código de acesso Genbank MK392089), mantido criopreservado (com 8% de glicerol) em nitrogênio líquido no CPV/UFG. Para tal, no D-6 amostras de *T. vivax* deste isolado foram descongeladas e inoculadas em um bovino mantido como doador (girolando, também com seis meses), no mesmo local onde o estudo foi realizado. No D-1 do estudo, foi possível detectar elevada quantidade de tripomastigotas circulantes no sangue (3×10^6) deste animal doador. Sangue deste animal foi utilizado para inocular os demais bovinos no dia 0 do estudo, após nova quantificação de *T. vivax*, realizada pela técnica de Brener (1961). Cada um dos 20 bovinos receberam o inóculo, sangue colhido do animal doador em EDTA, contendo aproximadamente 1×10^6 tripomastigotas viáveis do protozoário em questão, nas respectivas vias citadas anteriormente, utilizando-se uma seringa e agulha por animal.

2.3. Sinais clínicos, temperatura retal e determinação do volume globular

Para cada animal foi confeccionada uma ficha de identificação e, diariamente, entre o D-1 ao D+30 todos os bovinos foram observados quanto possíveis anormalidades dos olhos e dos sistemas músculo-esquelético, tegumentar (pele, pelos e cascos), gastrintestinal, nervoso, linfático e urinário. Além disso, a redução do apetite e do consumo de alimento, apatia e palidez de mucosas também foram observados.

Na mesma periodicidade estabelecida para as observações clínicas dos bezerros (D-1 ao D+30), aferiu-se a temperatura retal e o volume globular dos animais. A temperatura

retal foi mensurada todos os dias entre 06:00 e 07:00h. Valores igual ou abaixo de 38,2°C foram considerados normais para a categoria (Almeida et al., 2010). O volume globular foi realizado por meio do microhematócrito. Para determinação do volume globular (VG), aproximadamente 4mL de sangue, de cada animal, foi colhido da veia jugular, em tubo contendo anticoagulante (EDTA). No laboratório, as amostras foram homogeneizadas novamente e o sangue foi transferido para tubos “capilar” (tubo de microhematócrito) até o preenchimento de 75% do tubo. Em seguida, cada tubo foi colocado em uma micro-centrífuga (13.000 RCF) e logo após cinco minutos de centrifugação realizou-se a leitura do VG de cada animal, utilizando um cartão específico para o microhematócrito (Gomes et al., 2007). Valores igual ou acima de 24% foram considerados normais para a categoria.

2.4. Colheita de sangue para pesquisa de *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale*; achados de necropsia nos animais que vieram à óbito durante o estudo

Do D-1 ao D+30, de cada animal foram colhidos aproximadamente 4 ml de sangue, contendo EDTA, da veia jugular para pesquisa de *T. vivax* pelos métodos de Woo (Woo, 1970), Brener (Brener, 1961) e extensões sanguíneas (Dagnachew et al. 2015) coradas com Giemsa. A técnica da cPCR (Cortez et al. 2009), foi realizada nos 25 bezerros nos dias D-1, D+1, D+3, D+4, D+5, D+28, D+29 e D+30. Além disso, como as técnicas de Woo e Brener foram realizadas diariamente, foi possível estabelecer o período pré-patente para *T. vivax*, nas diferentes vias de infecção.

A pesquisa de *A. marginale* nos animais, foi realizada entre os D-1 e D+30. Para tal, foram analisadas as mesmas lâminas que continham as extensões sanguíneas coradas com Giemsa que foram confeccionadas para pesquisa de *T. vivax*. Neste caso, a extensão sanguínea (esfregaço) foi observada ao microscópio óptico em ocular 10x, com objetiva de 100x, em óleo de imersão, onde foi feita a pesquisa de *A. marginale* e posterior cálculo do percentual de parasitemia, de acordo com a metodologia descrita por IICA (1984).

Animais que vieram à óbito durante o estudo, foram submetidos a necropsia patológica para se observar alterações macroscópicas encontradas nas carcaças, bem como a possível *causa mortis* de cada bezerro. No final do estudo, os animais infectados com *T. vivax* sobreviventes, receberam três tratamentos consecutivos de diminazene 7mg/kg, e somente após ter sido constatada a cura parasitológica e clínica dos animais, estes foram soltos em pastagens da fazenda escola da UFG, e retornaram a rotina adotada no local.

2.5. Análise dos dados

Os dados de temperatura retal e volume globular foram analisados utilizando-se um modelo linear misto de análise de covariância com medições repetidas, estabelecendo como tratamento principal os cinco grupos experimentais, com cinco repetições cada e como tratamento secundário as datas de observações (SAS, 2008). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste Tukey-Kramer ao nível de 95% de confiabilidade ($P \leq 0,05$).

As contagens brutas de *T. vivax* e *A. marginale* quantificadas nos bovinos, os diferentes tratamentos foram confrontadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis pelo método Simes-Hochberg (SAS, 2008). Diferenças entre os tratamentos foram avaliadas ao nível de 95% de confiabilidade ($P \leq 0,05$). As análises foram efetuadas utilizando o software estatístico Statistica, versão 12 (StatSoft, Inc., 2014) ao nível de 95% de confiabilidade ($P \leq 0,05$).

Análise de correlação em relação aos dados quantitativos de infecção por *T. vivax* e *A. marginale*, bem como os resultados de temperatura retal e volume globular mensurados nos animais, foram analisados pelo coeficiente de correlação de Spearman.

3. Resultados

Independente da via de infecção, os bezerros após serem infectados com *T. vivax* apresentaram ao longo do estudo apatia, anorexia, diminuição de apetite, anemia, lacrimejamento, diarreia, desidratação, aumento da temperatura retal e queda no volume globular. Icterícia foi observada apenas nos animais com alto parasitismo por *A. marginale*. Por outro lado, os animais do grupo controle mantiveram-se clinicamente saudáveis, não demonstrando nenhuma anormalidade durante todo experimento, além de não terem demonstrado parasitismo por *T. vivax*.

Os grupos infectados pelas vias intradérmica, subcutânea, intramuscular e endovenoso, apresentaram médias de temperatura retal superiores ($P \leq 0,05$) às mensuradas no grupo controle em D+13, D+16, D+19 e D+20 datas pós-inoculação (DPI), respectivamente (Tabela 1). Para o volume globular, foi possível verificar que os animais pertencentes aos grupos infectados com *T. vivax* pelas vias intradérmica, subcutânea, intramuscular e endovenosa, demonstraram valores médios de hematócrito inferiores ($P \leq 0,05$) aos dos grupo controle a partir do 14^o, 17^o, 17^o e 14^o dia pós-inoculação (Tabela 2), respectivamente. Analisando os resultados de todos os grupos infectados em conjunto, verifica-se que houve correlação positiva tanto de *T. vivax* (0,33; $p = 0,0005$), quanto de *A. marginale* (0,21;

$p=0,0325$) com a temperatura retal dos animais. Por outro lado, foi encontrada correlação negativa de *T. vivax* (-0,40; $p=0,0385$) e *A. marginale* (-0,51; $p=<0,00001$) com o volume globular.

As primeiras tripomastigotas detectadas pela técnica de Woo nos bovinos foram encontrados a partir do 3º dia pós-inoculação, nos animais dos grupos infectados pelas vias intradérmica, intramuscular e endovenosa. Os bezerros inoculados pela via subcutânea apresentaram Woo positivo a partir do 6º dia pós-inoculação (Tabela 3). Pela técnica de Brener, os primeiros *T. vivax* foram encontrados no 5º DPI para os bezerros infectados pela via endovenosa, enquanto que os animais inoculados pelas vias intradérmica, subcutânea e intramuscular, demonstraram parasitismo pelo protozoário em questão a partir do 6º, 6º e 5º DPI, respectivamente (Tabela 3). Pela cPCR foi possível diagnosticar tripomastigotas do protozoário em questão em um animal do 1º DPI. Nos dias D+3, D+4 e D+5 pós-inoculação 15, 19 e 20 animais, respectivamente, demonstraram presença de *T. vivax* utilizando esta técnica de diagnóstico.

Os resultados estatísticos quanto à quantificação de *T. vivax* obtidos nos bezerros dos diferentes grupos, encontram-se registrados na Tabela 4. Foi possível verificar que apenas no 5º e 6º DPI, os animais infectados pela via endovenosa apresentaram contagem média de tripomastigotas superiores ($p\leq 0,05$) a dos demais grupos que receberam *T. vivax* nas diferentes vias. Depois disso, esporadicamente ocorreu diferença estatística ($P\leq 0,05$) na quantidade média de *T. vivax* quantificado entre os grupos infectados (Tabela 4 e Figura 1). Já para *A. marginale*, parasitemia aumentou significativamente ($P\leq 0,05$) do 23º DPI até o 30º DPI, apenas nos bovinos que foram infectados experimentalmente com *T. vivax*, enquanto que os animais mantidos como controle (não infectados com *T. vivax*), não demonstraram aumento significativo ($P>0,05$) de parasitismo por *A. marginale* durante todo experimento (Tabela 5 e Figura 1). Foi encontrada correlação negativa (-0,22; $p=0,0233$) entre *T. vivax* e *A. marginale* nos animais.

Durante o estudo, 12 (60%) dos 20 animais vieram à óbito até o D+30, sendo que, 2 (10%), 3 (15%), 3 (15%) e 4 (20%) pertenciam ao grupo de bezerros infectados pelas vias intradérmica, subcutânea, intramuscular e endovenosa, respectivamente (Tabela 6). Pela referida tabela, é possível verificar que as principais alterações encontradas nas 12 carcaças foram: anemia (100%), petéquias no coração (50%), pneumonia (50%), icterícia (41,7%), desidratação (41,7%), hepato e esplenomegalia (41,7%), caquexia (33,3%), anasarca (25,0%) e lesões neurológicas (16,7%).

4. Discussão

Este é o primeiro trabalho que avaliou a capacidade de infecção de *T. vivax* em bovinos, inoculados experimentalmente por diferentes vias, com *A. marginale* latente. Os artigos com *T. vivax* em que os autores infectaram experimentalmente bovinos pela via iatrogênica, conhecidos por nós, foram os trabalhos de Schenk et al. (2001) e Junior et al. (2016), onde seis e três bezerros foram inoculados pela via endovenosa, respectivamente, com a dose de aproximadamente 2×10^7 tripomastigotas viáveis deste protozoário. Bassi et al. (2018) por sua vez, inocularam 10 animais Girolando por via subcutânea na dose de 2×10^6 tripomastigotas de *T. vivax* provenientes de sangue de carneiros, entretanto, os animais foram tratados 18 dias após a infecção. Nos dois primeiros estudos, os pesquisadores utilizaram bovinos Nelore de aproximadamente sete meses (isolado MS) e vacas Girolando (isolado Lins), respectivamente. Nestes casos, os autores relatam que houve alterações hematológicas e/ou bioquímicas nos animais durante a fase aguda, entretanto, os animais estabeleceram uma relação de equilíbrio com o parasito e nenhum bovino veio à obtido durante o experimento. Por outro lado, em casos de infecção natural, é comum encontrar na literatura o relato de mortalidade de bovinos primo-infectados por *T. vivax* (Carvalho et al. 2008, Silva et al. 2009, Pimentel et al. 2012, Andrade Neto et al. 2015, Bastos et al. 2017) No presente estudo, conforme mencionado, foi utilizada o isolado Ipameri (Bastos et al., 2017 - código de acesso Genbank MK392089), para os 20 bovinos na dose de 1×10^6 tripanossomatídeos inoculados nas vias intradérmica, subcutânea, intramuscular e endovenosa. Um aspecto que os autores mencionam é que a virulência do isolado de *T. vivax* tem influência sobre a patogenicidade do parasito, entretanto, os resultados encontrados neste trabalho demonstram que a categoria animal, e o fato de estes bovinos serem co-infectados naturalmente com outros hemoparasitos como *A. marginale*, também pode influenciar na patogenicidade de *T. vivax*, bem como interferir na mortalidade dos bovinos.

Na literatura, são inúmeros os trabalhos que descrevem os sinais clínicos de *T. vivax* em surtos diagnosticados em bovinos (Dagnachew et al. 2015, Batista et al. 2007; Gradner 2007, Guerra et al. 2008; Linhares et al. 2006; Carvalho et al. 2008; Cadioli et al. 2012; Silva et al. 2009; Pimentel et al. 2012; Andrade Neto et al. 2015). Segundo estes autores, apesar de que os sinais possam variar conforme a virulência do isolado, na doença aguda, geralmente, ocorre febre, anemia, perda de apetite, fraqueza progressiva, decúbito, emagrecimento, edema de barbela/ascite e morte se o animal não for tratado. No presente estudo, os sinais clínicos apresentados pelos bezerros, demonstram que *T. vivax* teve

capacidade de infectar os bovinos, independente da via de infecção, bem como desencadear nestes animais quadros agudos desta enfermidade. Ajudam a reforçar esta inferência, a presença de correlação positiva entre *T. vivax* e temperatura retal (0,33; $p= 0,0005$), bem como correlação negativa para este mesmo agente com o volume globular dos animais (-0,40; $p= 0,0385$). Além disso, o fato de 60% dos bezerros infectados chegarem à óbito até o D+30.

Alguns pesquisadores descrevem que os sinais clínicos são comuns a diversas enfermidades, o que dificulta o diagnóstico (Shaw e Lainson, 1972; Serra-Freire, 1981; Silva et al. 1996; Paiva et al. 2000; Batista et al. 2007; Guerra et al. 2008; Linhares et al. 2006; Carvalho et al. 2008; Cadioli et al. 2012; Silva et al. 2009; Pimentel et al. 2012; Andrade Neto et al. 2015, Bastos et al. 2017, Bassi et al 2018). Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho destacam a importância de considerar a presença de *T. vivax* com co-infecção com *A. marginale*. Também, ficou claro que o aumento do nível de parasitemia por *A. marginale* nos bezerros, ocorre aproximadamente 22 dias após a primo-infecção experimental destes mesmos bovinos com *T. vivax*. Este tempo em dias, é referente ao período pré-patente (PPP) de *A. marginale* em estudos de infecção experimental em bovinos realizados por Gale et al. (1996) e Lopes et al. (2016). Em outras palavras, a anaplasmose latente foi “reativada” 22 dias após a infecção por *T. vivax*. Os achados de necropsia encontrados nos bezerros, reforçam ainda mais as inferências descritas anteriormente, assim como o que ocorreu 26 e 30 dias pós-infecção por *T. vivax*. Ou seja, basicamente as mortalidades que aconteceram até o D+22 foram oriundas da infecção por *T. vivax*, e entre o D+23 até D+30 foram decorrentes da presença de *A. marginale* ou de *A. marginale* + *T. vivax* nos bezerros. A presença conjunta de *T. vivax*, *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos, já foi relatada na Costa do Marfim por Yeó et al. (2017).

Outro aspecto que merece atenção foi a presença de icterícia nos animais e nas carcaças. Apesar de alguns autores considerarem a ocorrência de hemólise extravascular com posterior presença de icterícia em bovinos infectados com *T. vivax* (Silva et al. 2009, Cadioli et al. 2012), no presente estudo, tal síndrome foi visualizada apenas nos animais que apresentaram elevada parasitemia por *A. marginale*, o que possivelmente nos permite concluir que este ocorrido estava relacionado à presença desta riquetsia. Ajudam a reforçar estas inferências citadas nos parágrafos anteriores, a ausência de icterícia, mortalidade e de parasitismo elevado por *A. marginale* nos bezerros mantidos como controle.

O PPP de *T. vivax* variou de um a cinco dias. Estes resultados assemelham-se com os encontrados por Junior et al (2016) e Bassi et al. (2018) que encontraram o referido parasito dois e 12 dias pós-infecção pela técnica de Brener, entretanto, Bassi et al. (2018)

realizou o diagnóstico a cada três dias, e por este motivo, é possível que o PPP deste estudo tenha sido menor que o relato por estes pesquisadores. Outro aspecto interfere no PPP é a dose infectante, via de infecção e também método de diagnóstico utilizado. No presente estudo, pela cPCR foi possível detectar o agente em um animal desde o 1º DPI. Já pela técnica de Woo o PPP em média foi de três dias para via endovenosa e de quatro para as demais (intradérmica, subcutânea e intramuscular). Já pela técnica de Brener, o PPP médio variou de quatro a cinco dias para via endovenosa, e de seis dias para as demais (vias intradérmica, subcutânea e intramuscular). Na América do Sul e África, estudos que utilizaram *Tabanus* (Otte et al. 1991) e *Glossina* spp. (Anosa et al. 1992) como vetores de infecção para bovinos, respectivamente, o PPP variou de oito a 10 dias. Devido a essa variação supracitada, é possível que o PPP descrito em literatura para *T. vivax* possa variar de um a 15 dias, entretanto, esse período tende a ser menor sempre que o referido protozoário é inoculado pela via endovenosa.

5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que *T. vivax* foi capaz de infectar e desenvolver a doença nos bezerros, independente se inoculados pela via intradérmica, subcutânea, intramuscular ou endovenosa. Os animais apresentaram correlação positiva entre *T. vivax* e temperatura retal ($P \leq 0,05$), e correlação negativa entre este protozoário e volume globular ($P \leq 0,05$), 60% dos bezerros vieram à óbito. *A. marginale* latente nos bezerros atuou como co-infecção para *T. vivax*, interferindo diretamente no percentual de mortalidade dos animais. Icterícia foi visualizada apenas nos bezerros que apresentaram elevada parasitemia por *A. marginale*. Por este motivo, este estudo propõe que, em áreas com a presença confirmada de *T. vivax* nos bovinos, este protozoário deve ser incluído junto ao complexo denominado “Tristeza Parasitária Bovina”, que atualmente engloba apenas *Anaplasma* e *Babesia*.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Fundo para o Desenvolvimento da Agropecuária em Goiás (FUNDEPEC-GOIÁS), termo de compromisso assinado em 05/05/2016, e também contou com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Referências

- Almeida GLP, Pandorfi H, Guiselini C, Almeida GAP, Morri WBB. Investimento em climatização na pré-ordenha de vacas girolando e seus efeitos na produção de leite. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, v. 14, n. 12, 2010.
- Andrade Neto AQA, J.A.B.; Mendonça, C.L.; Souto, R.J.C.; André MRM, R.Z. Surtos de tripanossomíase em bovinos leiteiros no agreste dos estados de Pernambuco e Alagoas. *O Biológico*, supl 2. 2015; 1 (77):143.
- Anosa, V.O., Logan-Henfrey, L., Shaw, M., 1992. A Light and Electron Microscopic Study of Changes in Blood and Bone Marrow in Acute Hemorrhagic *Trypanosoma vivax* Infection in Calves. *Journal Pathol.* 29: 33-45.
- Banzatto, D. A.; Kronka, S. N. Experimentação Agrícola. Jaboticabal, FUNEP, 1989. 149p.
- Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary Parasitology*. 2007; 143 (2):174-181.
- Bastos, T. S. A., Madrid, D.M.C., Bessa, L., Linhares, G.F.C., Junior, O.L.Fidelis, Sampaio, P.H., Cruz, B.C., Cruvinel, L.B., Nicaretta, J.E., Machado, R.Z., Lopes, W.D.Z. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 2017;26(3):366-71.
- Basse, P.B., Araújo, F.F., Garcia, G.C., Silva, M.V., Freire, C., Bittar, E.R., Gomes, M.S., Amaral, L.R., Silva, M.S., Nascentes, G.A.N., Junior, V.R., Filho, O.A., Araujo, M.S.S., Bittar, J.F.F., 2018. Parasitological and immunological evaluation of cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Experimental Parasitology*. 185: 98-106.
- Brazil, 2017. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução normativa n.10, 03/03/2017.
- Brener, Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas. Belo Horizonte,. Tese de Livre Docência-Faculdade de Odontologia e Farmácia da UFMG, 1961.
- Cadioli FA, Barnabé PdA, Machado RZ, Teixeira MCA, André MR, Sampaio PH, Fidélis Junior OL, Teixeira MMG, Marques LC. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2012; 21 (2): 118-124.
- Carvalho AU, Abrão DC, Facury Filho EJ, Paes PRO, Ribeiro MFB. Occurrence of *Trypanosoma vivax* in Minas Gerais state, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2008; 60 (3):769-71.
- Cortez, A. P. et al. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America—characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular probes*, v. 23, n. 1, p. 44-51, 2009.
- Dagnachew S, Bezie M. Review on *Trypanosoma vivax*. *African Journal of Basic & Applied Sciences*. 2015; 7 (1): 41-64.
- Guerra RDMSN, Júnior F, Batista A, Santos HP, Abreu-Silva AL, Santos ACGd. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. *Ciência Rural*. 2008; 38 (3): 833-835.
- Gale KR, Leatch G, Vos AJ, Jorgensen WK. *Anaplasma marginale* effect of challenge of cattle with varying dosis of infected erythrocyte. *Int J Parasitol*. 1996;26(4):1417-20.

- Gomes, L.V.C., Lopes, W.D.Z., Cruz, B.C., Teixeira, W.F.P., Felippelli, G., Maciel, W.G., Bichuette, M.A., Ruivo, M.A., Colli, M.H.A., Carvalho, R.S., Martinez, A.C., Soares, V.E., Costa, A.J. 2015. Acaricidal effects of fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluazuron (1.6 mg/kg) + ivermectin (0.63 mg/kg) administered at different routes, against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitizing cattle. *Exp. Parasitol.* 153, 22–28.
- Gomes K, Santos MGC, Franco DF, Pires RB, Silva MG, Neves MF, Bassani-Silva S. Avaliação do hematócrito e da proteína plasmática em sangues hemodiluídos. *Revista eletrônica de Medicina Veterinária.* Ano III, n. 7, 2007.
- IICA 1984. Técnicas para el Diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis Bovina. Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura, Costa Rica (Serie Salud Animal. Publicacion Científica n.8).
- Junior, O.L.F., Sampaio, P.H., Machado, R.Z., André, M R., Marques, L.C., Cadioli, F.A., 2016. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 25: 69-81
- Lopes, W.D.Z., Lima, R.C.A., Santos, T.R., Sakamoto, C.A.M., Silva, H.C., Buzzulini, C., Garcia, M.V., Oliveira, G.P., Costa, A.J., 2009. Avaliação da eficácia preventiva da doramectina 3,5%*contra larvas de *Cochliomyia hominivorax* (miíases) em bolsas escrotais de bovinos recém-castrados. *A Hora Veterinária, Edição Extra.* 33-36.
- Lopes, W.D.Z., Martins, J.R.S., Soares, V.E., Teixeira, W.F., Cruz, B.C., Maciel, W.G., Felippelli, G., Carvalho, R.S., 2016. Aspectos da infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos experimentalmente infectados. *Veterinária e Zootecnia.* 23: 272-284.
- Machado, R.Z., Silva, J.B., André, M.R., Gonçalves, L.R., Matos, C.A., Obregón, D., 2015. Outbreak of anaplasmosis associated with the presence of different *Anaplasma marginale* strains in dairy cattle in the states of São Paulo and Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 24: 438-446.
- Otte, M.J., Abuabara, J.Y., 1991. Transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. *Acta Tropica.* 49: 73-76.
- Pimentel DS, Ramos CADN, Ramos RADN, Araújo FRD, Borba ML, Faustino MADG, Alves LC. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. *Veterinary Parasitology.* 2012;185(2):286-9.
- SAS Institute, 2008. SAS® User's Guide: Etatistics. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.
- Shaw JJ, Lainson R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of tropical medicine and parasitology.* 1972; 66 (1):25-32.
- Serra-Freire NM. Oiapoque-outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. *Rev Bras Med Vet.* 1981; 4 (2):30-31.
- Shenk, M.A.M., Mendonça, C.L., Madruga, C.R., Kohayagawa, A., Araújo, F.R., 201. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 21: 157-161.
- Spézia, J.P.S., Okano, W., Barros, M.P., Toma, H.S., Costa, D.S., Freitas, S.H., Camargo, L.M., Santos, M.D., 2015. Efeito de diferentes doses de ocitocina sobre a produção leiteira de fêmeas bovina. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* 9: 215-222.
- USDA, Dairy Heifer Raiser. 2011 An overview of operations that specialize in raising dairy heifers. USDA, 149p.
- WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta tropica,* v. 27, n. 4, p. 384-6, 1970.

Yeó, N., Karamoko, Y., Soro, D., Bi, Z.F., Okon, A.J.L., Gagnon, B.G., 2017. Prevalence of *Trypanosoma*, *Babesia* and *Anaplasma* in cattle reared in the North of Côte d'Ivoire. *International Journal of Biosciences*. 10: 21-28.

TABELA 1: Resultados das comparações múltiplas das temperaturas corporais dos bezerros do controle (não infectado) e dos grupos inoculados em diferentes vias com 1×10^6 formas infectantes de *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri. Dados transformados em $y = \text{Log}(x+1)$. Goiânia, Goiás, Brasil. Fevereiro, 2017.

Período Experimental (dias)	Grupos Experimentais Infectados / Médias e Desvios Padrões ¹					Análise de Variância	
	T 01: Via intradérmica	T 02: Via subcutânea	T 03: Via intramuscular	T 04: Via endovenosa	T 05: Controle	Valor de F ²	prob. < F ³
1	38,55 ± 0,35 A	38,74 ± 0,72 A	38,57 ± 0,50 A	38,95 ± 0,78 A	38,50 ± 0,00 Aa	0,14	0,9655
2	38,28 ± 0,49 A	38,42 ± 0,50 A	38,66 ± 0,64 A	38,36 ± 0,57 A	38,53 ± 0,30 Aa	0,37	0,8302
3	38,14 ± 0,32 A	38,58 ± 0,61 A	38,26 ± 0,43 A	38,82 ± 0,64 A	38,23 ± 0,40 Aa	1,4	0,2333
4	38,58 ± 0,79 A	38,84 ± 0,57 A	38,50 ± 0,49 A	38,98 ± 0,61 A	38,75 ± 0,40 Aa	0,64	0,6325
5	38,74 ± 0,80 B	39,16 ± 0,61 AB	38,44 ± 1,01 B	39,80 ± 0,91 A	38,45 ± 0,33 Ba	5,56	0,0002
6	39,58 ± 0,41 A	39,08 ± 0,60 A	39,60 ± 0,33 A	39,70 ± 0,85 A	38,25 ± 0,19 Ba	6,14	<0,0001
7	38,72 ± 0,69 AB	38,60 ± 0,57 B	39,58 ± 0,17 A	38,68 ± 1,08 B	38,25 ± 0,51 Ba	4,07	0,0029
8	39,52 ± 0,41 A	39,72 ± 0,48 A	39,55 ± 0,33 A	39,50 ± 0,32 A	38,55 ± 0,10 Ba	3,64	0,0061
9	38,80 ± 0,51 A	39,00 ± 0,41 A	38,70 ± 0,41 A	38,68 ± 0,61 A	37,75 ± 0,33 Ba	3,92	0,0037
10	38,70 ± 0,42 AB	39,04 ± 0,26 AB	38,68 ± 0,60 B	39,20 ± 0,36 A	38,18 ± 0,43 Ca	2,63	0,0334
11	38,82 ± 0,39 A	38,74 ± 0,51 A	39,20 ± 0,57 A	38,50 ± 0,50 A	38,43 ± 0,66 Aa	1,61	0,1705
12	38,32 ± 0,43 BC	38,38 ± 0,54 BC	39,13 ± 0,90 A	38,90 ± 0,37 AB	37,88 ± 0,57 Ca	4,14	0,0025
13	38,74 ± 0,50 AB	38,96 ± 0,81 AB	39,28 ± 0,67 A	39,13 ± 0,85 A	38,25 ± 0,24 Ba	2,67	0,0313
14	39,00 ± 1,12 AB	39,32 ± 0,52 A	39,25 ± 0,64 A	39,73 ± 0,72 A	38,08 ± 0,33 Ba	5,45	0,0003
15	38,78 ± 0,50 A	39,08 ± 0,40 A	39,20 ± 0,29 A	39,23 ± 1,00 A	38,58 ± 0,85 Aa	1,34	0,2523
16	38,76 ± 0,53 B	39,50 ± 0,43 A	39,48 ± 0,49 A	39,13 ± 0,62 AB	37,88 ± 0,26 Ca	7,63	<0,0001
17	38,94 ± 0,36 B	39,72 ± 0,33 A	39,53 ± 0,78 A	39,40 ± 0,53 AB	38,03 ± 0,22 Ca	7,84	<0,0001
18	38,70 ± 0,54 B	39,40 ± 0,44 A	38,50 ± 0,66 B	39,47 ± 0,61 A	38,13 ± 0,70 Ba	6,08	<0,0001
19	38,63 ± 0,51 AB	39,38 ± 0,95 AB	39,03 ± 0,74 AB	39,43 ± 1,00 A	38,53 ± 0,98 Ba	3,27	0,0114
20	38,85 ± 0,33 BC	39,53 ± 0,45 A	39,33 ± 0,32 AB	39,53 ± 0,76 A	38,63 ± 0,53 Ca	3,03	0,0173
21	38,25 ± 0,65 BC	38,95 ± 0,30 AB	39,30 ± 0,35 Ab	39,23 ± 1,66 A	38,08 ± 0,45 Ca	5,95	0,0001
22	37,97 ± 0,45 B	38,58 ± 0,93 AB	39,20 ± 1,05 A	38,73 ± 0,78 A	37,98 ± 0,64 Ba	5,28	0,0003
23	38,73 ± 0,35 CD	39,13 ± 0,54 BC	40,07 ± 0,12 A	39,37 ± 0,80 B	38,38 ± 0,88 Da	7,22	<0,0001
24	38,83 ± 0,67 B	39,20 ± 0,61 AB	39,60 ± 0,26 A	39,17 ± 0,49 AB	37,93 ± 0,26 Ca	6,88	<0,0001
25	39,23 ± 0,61 AB	39,35 ± 0,65 AB	39,63 ± 1,00 A	38,87 ± 0,67 B	37,90 ± 0,50 Ca	7,61	<0,0001
26	38,93 ± 0,31 A	38,33 ± 0,36 B	39,45 ± 1,06 A	39,10 ± 0,44 A	38,18 ± 0,79 Ba	5,03	0,0005
27	38,80 ± 0,40 AB	39,10 ± 1,00 A	39,25 ± 1,06 A	39,35 ± 0,64 AB	38,23 ± 0,95 Ba	2,93	0,0202
28	38,90 ± 0,70 A	38,80 ± 0,90 A	39,30 ± 0,99 A		38,45 ± 0,93 Aa	2,04	0,1077
29	39,90 ± 0,72 A	38,90 ± 0,54 B	39,35 ± 0,35 AB		39,05 ± 0,81 Ba	3,31	0,0198
30	38,85 ± 0,64 A	37,70 ± 0,14 B	38,75 ± 0,49 A		38,03 ± 0,88 Ba	5,78	0,0007
31	39,57 ± 1,03 A	39,00 ± 0,14 A			37,98 ± 0,36 Ba	11,17	<0,0001
32		38,75 ± 0,07 A			37,65 ± 1,17 Ba	10,68	0,0011
Valor de F ⁴	3,00	3,19	3,35	2,41	1,66		
prob. < F ³	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0743		

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t ($p > 0,05$).

2: Valor de F para o desdobramento de Grupos dentro de Período Experimental

3: Probabilidade de Significância para o valor de F

TABELA 2: Resultados das comparações múltiplas do Volume globular dos bezerros do controle (não infectado) e dos grupos inoculados em diferentes vias com 1×10^6 formas infectantes de *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri. Dados transformados em $y = \text{Log}(x+1)$. Goiânia, Goiás, Brasil. Fevereiro, 2017.

Período Experimental (dias)	Grupos Experimentais Infectados / Médias e Desvios Padrões ¹					Análise de Variância	
	T 01: Via intradérmica	T 02: Via subcutânea	T 03: Via intramuscular	T 04: Via endovenosa	T 05: Controle	Valor de F ²	prob. < F ³
1	35,20 ± 4,76 A	35,80 ± 8,29 A	36,40 ± 10,81 A	34,60 ± 4,10 A	37,25 ± 4,86 Aa	0,11	0,9797
2	33,80 ± 5,26 A	38,80 ± 9,26 A	36,20 ± 9,88 A	35,60 ± 8,26 A	37,75 ± 6,85 Aa	0,4	0,8096
3	33,60 ± 4,72 A	38,80 ± 8,76 A	36,20 ± 10,23 A	35,40 ± 8,26 A	37,00 ± 4,08 Aa	0,39	0,8162
4	34,20 ± 5,81 A	39,20 ± 7,69 A	35,20 ± 10,85 A	34,60 ± 8,29 A	37,00 ± 3,56 Aa	0,45	0,7730
5	35,00 ± 6,52 A	40,20 ± 11,01 A	37,00 ± 10,98 A	34,80 ± 8,79 A	39,00 ± 4,69 Aa	0,6	0,6613
6	32,60 ± 6,19 A	38,60 ± 9,37 A	38,00 ± 5,72 A	31,80 ± 8,26 A	35,25 ± 4,11 Aa	0,99	0,4110
7	31,80 ± 5,36 A	36,80 ± 8,41 A	39,50 ± 4,51 A	31,60 ± 9,24 A	36,25 ± 4,19 Aa	1,25	0,2892
8	33,80 ± 6,72 A	38,20 ± 10,62 A	41,25 ± 4,11 A	33,50 ± 2,52 A	38,50 ± 5,00 Aa	1,14	0,3355
9	32,00 ± 6,44 A	37,00 ± 10,42 A	38,25 ± 5,68 A	32,25 ± 2,87 A	37,75 ± 2,22 Aa	1	0,4076
10	28,80 ± 5,22 A	35,20 ± 11,50 A	33,75 ± 5,56 A	35,75 ± 5,91 A	37,00 ± 4,97 Aa	1,07	0,3701
11	28,20 ± 5,81 A	33,60 ± 10,16 A	33,50 ± 5,20 A	27,50 ± 4,80 A	36,50 ± 5,20 Aa	1,58	0,1779
12	27,60 ± 7,13 A	32,60 ± 9,71 A	31,25 ± 3,59 A	27,50 ± 5,80 A	36,75 ± 5,32 Aa	1,56	0,1838
13	28,20 ± 6,98 A	31,40 ± 9,86 A	31,50 ± 5,20 A	25,50 ± 7,33 A	36,75 ± 4,72 Aa	1,86	0,1155
14	26,40 ± 8,14 B	30,60 ± 12,60 AB	30,25 ± 4,35 AB	24,50 ± 9,57 B	38,25 ± 4,35 Aa	2,89	0,0218
15	24,40 ± 7,83 B	28,80 ± 12,03 AB	29,50 ± 3,87 AB	21,25 ± 8,06 B	37,50 ± 4,80 Aa	4,05	0,0030
16	26,60 ± 8,62 B	30,40 ± 12,92 AB	32,25 ± 4,35 AB	23,75 ± 8,46 B	41,00 ± 5,72 Aa	4,55	0,0013
17	23,20 ± 7,43 B	23,60 ± 12,40 B	27,00 ± 3,37 B	22,00 ± 7,00 B	37,25 ± 5,62 Aa	4,06	0,0030
18	26,25 ± 7,63 B	24,20 ± 14,72 B	30,33 ± 4,51 B	22,67 ± 5,77 B	36,25 ± 6,29 Aa	3,07	0,0160
19	23,25 ± 8,22 B	26,75 ± 16,68 B	28,33 ± 5,13 B	23,67 ± 8,08 B	35,75 ± 4,35 Aa	2,69	0,0306
20	25,25 ± 8,54 B	27,75 ± 15,97 B	29,00 ± 2,65 B	20,67 ± 3,21 B	37,75 ± 5,56 Aa	4,12	0,0026
21	24,50 ± 6,86 B	26,00 ± 14,26 B	27,33 ± 4,93 B	20,33 ± 5,03 B	38,25 ± 4,35 Aa	4,69	0,0010
22	24,33 ± 7,23 B	24,50 ± 13,43 B	23,67 ± 5,51 B	18,67 ± 5,13 B	36,50 ± 4,51 Aa	4,56	0,0012
23	24,67 ± 6,81 B	21,75 ± 10,72 BC	22,00 ± 5,57 BC	17,00 ± 5,57 C	40,00 ± 5,10 Aa	8,11	<0,0001
24	26,00 ± 6,00 B	22,50 ± 12,56 BC	21,33 ± 5,13 BC	14,67 ± 6,51 C	38,00 ± 6,48 Aa	7,71	<0,0001
25	27,33 ± 6,66 B	20,75 ± 10,34 BC	20,00 ± 6,00 BC	14,33 ± 4,93 C	37,00 ± 5,60 Aa	7,93	<0,0001
26	26,00 ± 5,29 B	18,50 ± 9,04 C	18,67 ± 4,16 C	11,67 ± 3,51 D	33,75 ± 5,56 Aa	7,39	<0,0001
27	24,33 ± 5,51 B	16,50 ± 5,74 C	18,00 ± 1,41 BC	12,50 ± 2,12 C	34,75 ± 10,24 Aa	7,79	<0,0001
28	22,33 ± 2,52 B	13,50 ± 2,65 C	15,00 ± 1,41 BC		33,25 ± 12,45 Aa	8,46	<0,0001
29	19,33 ± 4,16 B	11,00 ± 1,83 B	13,00 ± 2,83 B		31,00 ± 13,78 Aa	8,53	<0,0001
30	17,00 ± 2,65 B	10,50 ± 0,71 B	13,00 ± 2,83 B		29,50 ± 13,13 Aa	7,43	<0,0001
31	14,00 ± 5,00 B	12,50 ± 3,54 B			28,25 ± 13,77 Aa	7,72	0,0005
32		14,00 ± 1,41 B			28,75 ± 14,80 Aa	11,53	0,0007
Valor de F ¹	2,90	9,08	6,95	6,31	0,97		
prob. < F ³	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5206		

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste t (p>0,05).

2: Valor de F para o desdobramento de Grupos dentro de Período Experimental

3: Probabilidade de Significância para o valor de F

TABELA 3: Período pré-patente (dias pós-inoculação) de *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri em bezerros infectados experimentalmente por diferentes vias com 1×10^6 tripomastigotas.

Via de infecção do grupo	Animal	PPP (dias) / Técnica de cPCR	PPP (dias) / Técnica de Woo	PPP(dias) / Técnica de Brener
Intradérmica	573	3	5	6
	574	3	3	6
	48	5	5	7
	603	4	4	6
	618	4	4	7
	Média	3,8	4,2	6,4
Subcutânea	578	3	6	6
	597	3	4	6
	46	4	5	6
	601	3	4	6
	606	3	4	7
	Média	3,6	4,6	6,2
Intramuscular	595	3	4	7
	605	4	5	7
	27	3	3	5
	610	3	4	6
	612	4	6	6
	Mean	3,4	4,4	6,2
Endovenosa	589	2	3	5
	600	1	4	5
	40	1	3	4
	611	2	3	5
	617	2	3	5
	Mean	1,6	3,2	4,8

TABELA 4: Resultados das comparações múltiplas das quantificações de tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri nos bezerros do controle (não infectado) e dos grupos inoculados em diferentes vias com 1×10^6 formas infectantes do protozoário em questão. Dados transformados em $y = \text{Log}(x+1)$. Goiânia, Goiás, Brasil. Fevereiro, 2017.

Período Experimental (dias)	Grupos Experimentais Infectados / Médias e Desvios Padrões ¹					Análise de Variância	
	T 01: Via intradérmica	T 02: Via subcutânea	T 03: Via intramuscular	T 04: Via endovenosa	T 05: Controle	Valor de F ²	prob. < F ³
0 a 4	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,84 ± 1,87 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,25	0,9081
5	0,00 ± 0,00 ^B	0,00 ± 0,00 ^B	0,84 ± 1,87 ^B	5,31 ± 0,55 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	9,64	<0,0001
6	2,69 ± 2,49 ^B	3,79 ± 2,21 ^B	3,25 ± 3,07 ^B	6,38 ± 0,38 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	9,49	<0,0001
7	4,82 ± 1,12 ^B	6,32 ± 0,39 ^A	5,89 ± 0,61 ^A	6,02 ± 0,73 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	12,61	<0,0001
8	6,29 ± 0,51 ^A	6,59 ± 0,61 ^A	6,76 ± 0,22 ^A	4,57 ± 2,67 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	14,65	<0,0001
9	3,99 ± 2,24 ^B	5,08 ± 0,45 ^{AB}	5,53 ± 0,54 ^A	5,28 ± 0,18 ^{AB}	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	9,57	<0,0001
10	4,52 ± 2,57 ^A	5,88 ± 0,79 ^A	5,75 ± 0,75 ^A	6,15 ± 0,24 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	11,95	<0,0001
11	5,80 ± 0,73 ^A	5,87 ± 0,58 ^A	5,67 ± 0,71 ^A	6,07 ± 0,51 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	12,43	<0,0001
12	6,30 ± 0,30 ^A	6,34 ± 0,52 ^A	6,08 ± 0,34 ^A	6,48 ± 0,36 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	14,41	<0,0001
13	6,64 ± 0,20 ^A	6,67 ± 0,20 ^A	6,47 ± 0,20 ^{AB}	6,26 ± 0,32 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	15,4	<0,0001
14	6,59 ± 0,32 ^A	6,52 ± 0,45 ^A	6,29 ± 0,46 ^A	6,30 ± 0,23 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	14,98	<0,0001
15	6,37 ± 0,68 ^A	6,66 ± 0,28 ^A	6,33 ± 0,15 ^A	5,07 ± 2,84 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	14,17	<0,0001
16	6,48 ± 0,31 ^A	6,62 ± 0,29 ^A	6,48 ± 0,36 ^A	5,22 ± 2,93 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	14,5	<0,0001
17	6,19 ± 0,93 ^A	6,34 ± 0,44 ^A	6,31 ± 0,29 ^A	4,90 ± 2,77 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	13,41	<0,0001
18	6,28 ± 0,33 ^A	6,70 ± 0,31 ^A	6,34 ± 0,15 ^A	3,82 ± 3,50 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	14,48	<0,0001
19	6,40 ± 0,37 ^{AB}	6,82 ± 0,30 ^A	5,00 ± 2,82 ^{AB}	3,89 ± 3,56 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	13,5	<0,0001
20	5,18 ± 2,90 ^A	6,70 ± 0,24 ^A	3,85 ± 3,52 ^A	3,78 ± 3,45 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	11,18	<0,0001
21	3,98 ± 3,64 ^A	5,35 ± 3,00 ^A	4,36 ± 2,49 ^A	0,00 ± 0,00 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	11,75	<0,0001
22	0,00 ± 0,00 ^B	5,36 ± 3,00 ^A	3,46 ± 3,16 ^A	0,00 ± 0,00 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	11,37	<0,0001
23	0,00 ± 0,00 ^B	3,88 ± 3,55 ^A	3,06 ± 2,80 ^A	0,00 ± 0,00 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	6,69	<0,0001
24	2,83 ± 2,59 ^A	3,78 ± 3,46 ^A	3,59 ± 2,01 ^A	3,80 ± 2,13 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	4,72	<0,0001
25	4,22 ± 2,40 ^A	3,56 ± 3,26 ^A	0,00 ± 0,00 ^B	2,83 ± 2,59 ^{AB}	0,00 ± 0,00 ^{Ba}	7,23	<0,0001
26	5,80 ± 0,54 ^A	2,31 ± 3,17 ^{BC}	0,00 ± 0,00 ^C	3,26 ± 2,98 ^{AB}	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	10,76	<0,0001
27	6,33 ± 0,52 ^A	3,53 ± 3,23 ^B	3,91 ± 2,19 ^{AB}		0,00 ± 0,00 ^{Ca}	12,32	<0,0001
28	4,51 ± 2,54 ^A	3,67 ± 3,44 ^A	4,86 ± 2,72 ^A		0,00 ± 0,00 ^{Ba}	9,01	<0,0001
29	5,91 ± 0,33 ^A	3,52 ± 3,36 ^A	4,71 ± 2,64 ^A		0,00 ± 0,00 ^{Ba}	11,78	<0,0001
30	4,19 ± 2,38 ^A	4,62 ± 2,59 ^A	4,04 ± 2,26 ^A		0,00 ± 0,00 ^{Ba}	8,41	<0,0001
31	0,00 ± 0,00 ^B	5,09 ± 2,85 ^A			0,00 ± 0,00 ^{Ba}	15,65	<0,0001
32	0,00 ± 0,00 ^B	5,35 ± 2,99 ^A			0,00 ± 0,00 ^{Ba}	17,27	<0,0001
Valor de F ²	10,84	6,40	8,04	8,36	0,00		
prob. < F ³	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000		

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t ($p \geq 0,05$).

2: Valor de F para o desdobramento de Grupos dentro de Período Experimental

3: Probabilidade de Significância para o valor de F

3: Valor de F para o desdobramento de Período Experimental dentro de Grupo.

TABELA 5: Resultados das comparações múltiplas dos percentuais de parasitemia por *Anaplasma marginale* quantificado nos bovinos dos grupos infectados e controle. Dados transformados em $y = \text{asin}(\sqrt{x/100}) * 180/\pi$. Goiânia, Goiás, Brasil. Fevereiro de 2017.

Período Experimental (dias)	Grupos Experimentais Infectados / Médias e Desvios Padrões ¹					Análise de Variância	
	T 01: Via intradérmica	T 02: Via subcutânea	T 03: Via intramuscular	T 04: Via endovenosa	T 05: Controle	Valor de F ²	prob. < F ³
0 a 4	0,10 ± 0,30 ^A	0,20 ± 0,50 ^A	0,10 ± 0,80 ^A	0,84 ± 1,87 ^A	0,10 ± 0,50 ^{Aa}	0,21	0,9081
5	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,14	0,6541
6	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 2,21 ^A	0,30 ± 1,10 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,21	0,9015
7	4,24 ± 6,28 ^A	0,00 ± 0,39 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,25	0,9312
8	0,00 ± 0,00 ^A	1,56 ± 0,61 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,24	0,9874
9	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,45 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,18	0,9021
10	0,48 ± 1,07 ^A	0,00 ± 0,79 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,22	0,8759
11	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,58 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,24	0,6854
12	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,52 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,23	0,6874
13	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,20 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	1,15 ± 2,30 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,24	0,8457
14	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,45 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,20 ± 0,40 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,28	0,7548
15	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,28 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,24	0,5476
16	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,29 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,2	0,8546
17	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,44 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,10 ± 0,30 ^{Aa}	0,29	0,6784
18	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,31 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,17	0,8457
19	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,30 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,18	0,6475
20	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,24 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,24	0,5784
21	0,30 ± 0,60 ^A	0,00 ± 3,00 ^A	0,47 ± 0,81 ^A	0,67 ± 1,15 ^A	0,00 ± 0,00 ^{Aa}	0,31	0,6587
22	2,03 ± 2,22 ^B	2,31 ± 3,00 ^B	3,13 ± 2,73 ^A	1,53 ± 2,66 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	11,37	0,0854
23	4,67 ± 2,20 ^B	5,57 ± 3,55 ^B	10,93 ± 12,37 ^A	3,77 ± 5,12 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	12,32	<0,0001
24	4,20 ± 4,41 ^B	5,25 ± 3,46 ^B	12,37 ± 16,77 ^A	3,97 ± 4,40 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	14,25	<0,0001
25	3,90 ± 3,90 ^B	9,76 ± 3,26 ^B	23,27 ± 31,88 ^A	11,17 ± 6,17 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	10,85	<0,0001
26	4,13 ± 3,84 ^B	18,94 ± 3,17 ^A	13,35 ± 14,50 ^A	6,27 ± 5,72 ^B	0,00 ± 0,00 ^{Ca}	23,5	<0,0001
27	8,27 ± 7,26 ^B	20,38 ± 3,23 ^A	12,60 ± 10,47 ^A		0,20 ± 0,30 ^{Ca}	12,32	<0,0001
28	6,47 ± 6,60 ^B	20,18 ± 3,44 ^A	7,85 ± 1,63 ^B		0,00 ± 0,00 ^{Ca}	9,01	<0,0001
29	7,83 ± 7,40 ^B	17,22 ± 3,36 ^A	9,50 ± 2,40 ^B		0,00 ± 0,00 ^{Ca}	11,78	<0,0001
30	10,80 ± 9,36 ^A	5,78 ± 2,59 ^{AB}	2,20 ± 3,11 ^B		0,00 ± 0,00 ^{Ca}	8,41	<0,0001
Valor de F ⁴	10,84	6,40	8,04	8,36	0,00		
prob. < F ³	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000		

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t ($p \geq 0,05$).

2: Valor de F para o desdobramento de Grupos dentro de Período Experimental

3: Probabilidade de Significância para o valor de F

3: Valor de F para o desdobramento de Período Experimental dentro de Grupo.

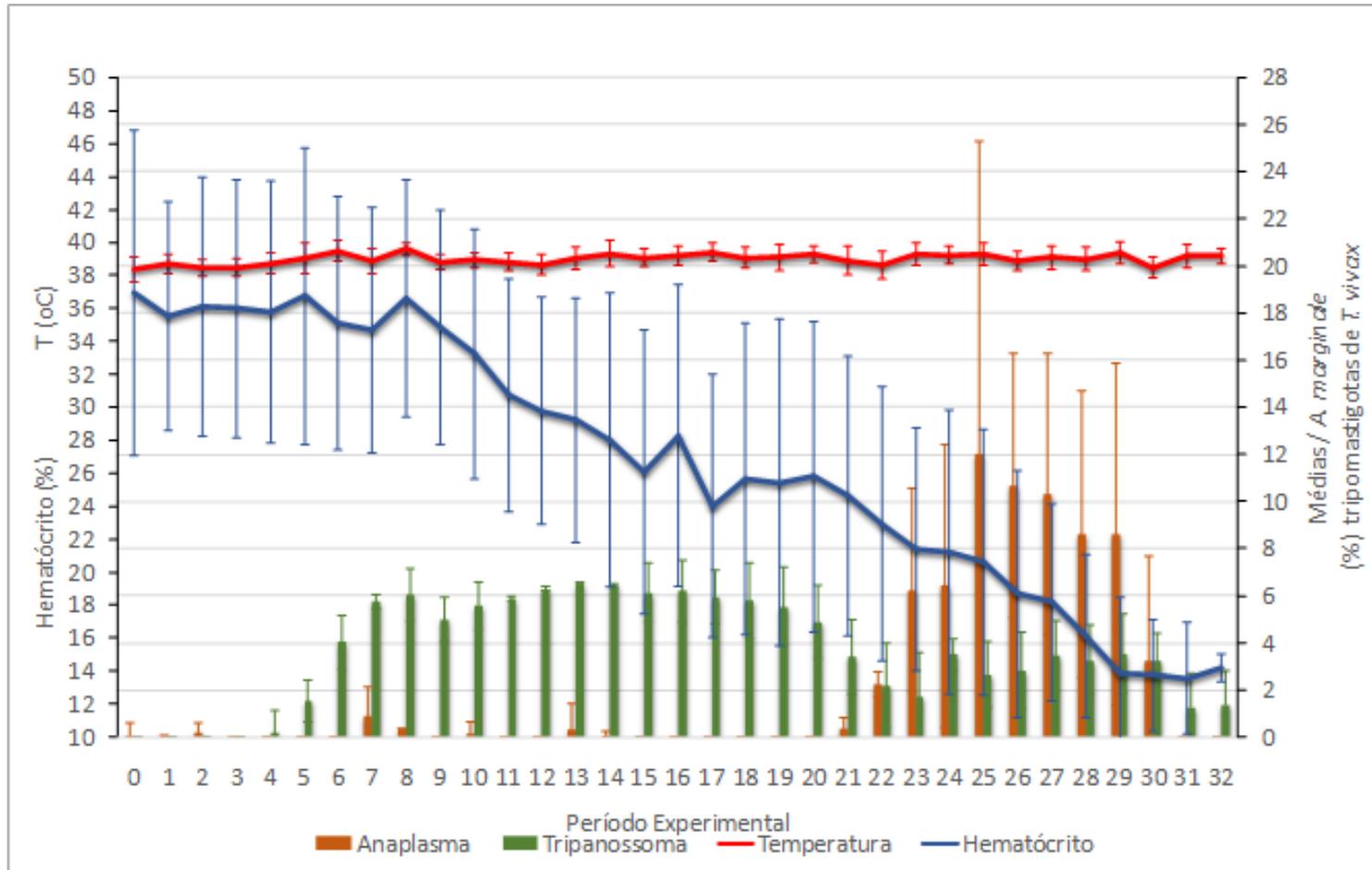
*Laboratórios Biovet S/A

TABELA 6: Achados de necropsia de bezerros com infecção latente por *Anaplasma marginale* e posteriormente infectados com *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri por diferentes vias de inoculação, que foram a óbito durante o estudo.

Número do animal	27	40	611	48	612	606	618	605	589	617	597	601	-	-
Via de inoculação	IM	EV	EV	ID	IM	SC	ID	IM	EV	EV	SC	SC	-	-
Dia da necropsia	6	8	16	19	19	19	22	26	27	27	30	30	-	-
Volume globular (%)	18	17	15	14	23	15	24	14	8	11	10	13	-	-
Temperatura retal (oC)	37	38,4	38,6	38,8	40,6	38,9	38,4	40	39,3	38,9	38,5	39,5	-	-
Achados de necropsia nas carcaças													Total absoluto	Total relativo
Anasarca			+			+						+	3	25,0
Anemia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11	100,0
Caquexia	+	+		+			+						4	33,3
Desidratação	+	+	+	+			+						5	41,7
Esplenomegalia					+			+	+		+	+	5	41,7
Hepatomegalia					+			+	+		+	+	5	41,7
Icterícia								+	+	+	+	+	6	41,7
Lesão cardíaca (petéquias)			+		+	+		+	+			+	6	50,0
Sinais neurológicos					+						+		2	16,7
Pneumonia			+		+	+			+		+	+	6	50,0
Histórico em relação a presença de Trypanosoma vivax e Anapalsma marginale nos bezerros antes do óbito														
Parasitológico direto (esfregaço) pata T. vivax	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0
Trypanosoma vivax(Woo)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	11	91,7
Trypanosoma vivax (Brener)	15000	3000000	2300000	36000	340000	450000	7700000	0	0	8800000	19000	0	9	75,0
A. marginale (parasitemia média % - ultimos 3 dias)	0	0	0	0	0	0	0	39,0	17,6	5,6	8,5	35,5	5	41,7
T. vivax + A. marginale	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	4	33,3

ID= intradérmico; IM= intramuscular; SC= subcutâneo; EV= endovenoso

FIGURA 1: Resultados das quantificações de tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri em bezerros com *Anaplasma marginale* latente, pertencentes ao grupo controle (não infectado) e aos grupos inoculados em diferentes vias com 1×10^6 formas infectantes do protozoário em questão, Goiânia, Goiás, Brasil. Fevereiro, 2017.



CAPÍTULO 4: EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO DIMINAZENE (7MG/KG), IMIDOCARB (4,8MG/KG) E ISOMETAMIDIUM (0,5 E 1,0MG/KG), ADMINISTRADOS EM DIFERENTES PROTOCOLOS, CONTRA *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Thiago Souza Azeredo Bastos^{1*}; Adriana Marques Faria¹; Alliny Souza de Assis Cavalcante¹; Darling Mélyny de Carvalho Madrid¹; Dina Maria Beltrán Zapa¹, João Eduardo Nicaretta¹; Leonardo Bueno Cruvinel¹; Luciana Maffini Heller¹; Luiz Fellipe Monteiro Couto¹; Vando Edésio Soares²; Fabiano Antônio Cadioli³; Welber Daniel Zanetti Lopes⁴.

1-Departamento de Parasitologia Veterinária, Escola de Veterinária e Zootecnia – EVZ, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, GO, Brasil. *E-mail: tsabvet@gmail.com.

2- Universidade Brasil – Campus de Descalvado. São Paulo, SP, Brazil.

3- Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rua Clóvis Pestana 793, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil.

4-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, GO, Brasil.

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia terapêutica do diacetato de diminazene (7mg/kg), dipropionato de imidocarb (4,8mg/kg) e cloreto de isometamidium (0,5 e 1,0mg/kg), administrados em diferentes vias e protocolos de tratamentos, contra *Trypanosoma vivax* parasitando bezerros Girolando experimentalmente infectados. Concomitantemente, de acordo com os critérios estabelecidos neste estudo, no 50º dia pós-tratamento (DPT), os animais que receberam diminazene e isometamidium (1,0mg/kg) foram desafiados novamente com 1×10^6 tripomastigotas de *T. vivax*. Trinta bovinos machos, Girolando, com oito meses de idade, foram estabulados e infectados com aproximadamente 1×10^6 tripanossomatídeos por via endovenosa. No D-1 do estudo os bezerros foram randomizados, de acordo com a carga parasitária de cada animal e localização das baias, formando seis grupos de cinco animais cada, sendo: G1 para animais mantidos como controle (CPOS); G2 para bovinos tratados com diacetato de diminazene 7mg/kg (DIM) no dia 0, via intramuscular; G3 para animais tratados nos dias 0 e +14 com dipropionato de imidocarb 4,8mg/kg (IMI) via subcutânea; G4 para bovinos tratados com cloreto de isometamidium 0,5mg/kg (ISO 0.5) no dia 0, via intramuscular; G5 para bezerros tratados com cloreto de isometamidium 1,0mg/kg (ISO 1.0) no dia 0, via intramuscular; G6 para animais receberam no dia 0 o DIM, e no D+14 ISO 1.0, ambos pela via intramuscular. Durante 180 dias, foram realizadas colheitas de sangue para pesquisa de *T. vivax* pelo método de Woo, Brener e por reação em cadeia da polimerase. Com base nos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que os protocolos de tratamento que continham diminazene (7mg/kg) e/ou isometamidium (0,5 e 1,0mg/kg), foram totalmente efetivos, atingindo 100% de eficácia

terapêutica contra *Trypanosoma vivax* parasitando bovinos experimentalmente infectados. Os grupos que receberam isometamidium mantiveram tais índices de eficácia até D+180. Por outro lado, o imidocarb (4,8mg/kg) apresentou recidivas parasitológicas por *T. vivax* aproximadamente 10 a 14 dias pós-tratamento. Os animais tratados com isometamidium 1,0mg/kg, não demonstraram parasitismo por *T. vivax*, mesmo depois de serem reinfectedos 50 dias após a realização do referido tratamento, diferentemente do que foi observado para o grupo de bovinos tratados no dia 0 com diminazene (7mg/kg) e reinfectedos com o protozoário em questão depois de 50 dias. Entretanto, os animais que receberam isometamidium 1,0mg/kg, demonstraram queda no volume globular, em alguns momentos, se equivalendo estatisticamente ($P \leq 0,05$) aos valores médios de volume globular mensurados nos animais controle. O reaparecimento de *T. vivax* em bovinos de campo no Brasil tratados com diminazene (7mg/kg), possivelmente ocorreu em função do curto período residual deste ativo, e não pelo fato de haver resistência de *T. vivax* ao medicamento.

Palavras-chave: Quimioterapia, Tratamento, Tripanossomose bovina.

1. Introdução

Tripanossomose bovina é uma doença causada por *Trypanosoma vivax*, parasito que localiza-se no plasma sanguíneo de ruminantes e vem assumindo grande importância econômica para bovinos (Gutiérrez et al., 2013), seja pela mortalidade de animais, pela redução do valor estimado do rebanho, ou pela queda do retorno financeiro bruto diário de uma propriedade comercial (Abrão et al., 2009). Para os bovinos, a transmissão deste agente pode ocorrer de forma iatrogênica, por fômites contaminados (Bastos et al., 2017), bem como por vetores hematófagos como tabanídeos, e possivelmente *Stomoxys calcitrans* (Dagnachew e Bezie, 2015) e *Haematobia irritans* (Salas et al., 2017). Animais doentes apresentam sinais clínicos como: febre, anemia, perda de apetite, fraqueza progressiva, decúbito, emagrecimento, edema de barbela, ascite, aborto, repetição de cio, desordens neurológicas em casos graves (como tremores musculares e cegueira), e morte (Silva et al., 1996).

Atualmente, a maneira mais efetiva de controlar esta enfermidade é por meio de medicamentos tripanocidas, à base de diaceturato de diminazene ou cloridrato de isometamidium (Dagnachew e Bezie, 2015). Entretanto, são comuns os relatos à campo de ineficácia do diaceturato de diminazene contra *T. vivax* no Brasil (Paiva et al., 2000; Van den Bossche et al., 2000; Gall et al., 2004; Cadioli et al., 2012; Bastos et al., 2017; Mulandane et al., 2018), bem como a dificuldade de tratamento e prevenção desta enfermidade com o uso de cloreto de isometamidium na África (Mulanthane et al., 2018). Possivelmente isto está relacionado ao desenvolvimento de resistência pelo agente a este último ativo de acordo com os pesquisadores. Outra incógnita relacionada ao controle deste protozoário, por meio do uso de produtos químicos, é o fato dos produtores utilizarem o dipropionato de imidocarb para o

tratamento de bovinos com *T. vivax*, mesmo sem este ativo apresentar indicação terapêutica em bula para o agente em questão (Costa et al., 2016).

Apesar do exposto acima, inexitem na literatura, conhecida por nós, estudos que avaliaram a eficácia terapêutica de todas estas classes de medicamentos citadas anteriormente contra *T. vivax*, em um mesmo delineamento experimental, em bovinos experimentalmente infectados. Por este motivo, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia terapêutica do diaceturato de diminazene, dipropionato de imidocarb e cloreto de isometamidium, administrados em diferentes vias, e protocolos terapêuticos, contra *T. vivax* em bovinos infectados experimentalmente.

2. Material e Métodos

Este projeto foi submetido e aprovado, protocolo n° 032/16, pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1. Histórico dos bovinos, local do estudo, alimentação e período de aclimação

Foram utilizados 30 bovinos machos, Girolando, que após o nascimento, foram criados em *tie stall* em uma fazenda comercial livre de *T. vivax*, no município de Santo Antônio de Goiás, estado de Goiás, distante 13km da cidade de Goiânia. Ao atingirem aproximadamente oito meses de idade (peso médio de 120 ± 34 kg), foram encaminhados para a Universidade Federal de Goiás.

O experimento aconteceu entre abril e setembro de 2017 no Galpão de Experimentação para Animais de Grande Porte e no Centro de Parasitologia Veterinária (CPV), ambos pertencentes à Universidade Federal de Goiás (UFG). Neste galpão, os animais foram alojados em baias de 9m^2 , protegidas com tela de nylon (com 3mm de distância entre fios), para prevenção de ataques por possíveis moscas hematófagas. Em cada baia havia de dois a três animais.

Ao adentrarem nas baias no dia -12 (D-12), todos bezerras receberam medicação preventiva contra helmintos (albendazole 5mg/kg, Valbazen®, Zoetis); pulverização de alfacipermetrina + clorpirifós + ethion (Potenty®, MSD Saúde Animal) contra carrapatos; toltrazuril 15mg/kg (Baycox®, Bayer Saúde Animal) via oral contra *Eimeria* spp. e 7,5mg/kg de enrofloxacina (Kinetomax®, Bayer Saúde Animal) contra *Anaplasma marginale*.

Durante todo período que permaneceram estabulados, os bezerras receberam água e feno de capim tifton *ad libitum*, bem como ração na quantidade de 1,5% de peso do animal por dia. O período de aclimação foi de sete dias (entre D-12 a D-5) e, no primeiro e último dia deste período, sangue foi colhido de todos os animais para confirmar ausência de *Babesia* sp. e *A. marginale*, detectado pela extensão sanguínea (Dagnachew e Bezie, 2015), bem como ausência de infecção por *T. vivax* diagnosticado pelos métodos de Woo (Woo, 1970), extensão sanguínea (Dagnachew e Bezie, 2015) e cPCR (Cortez et al., 2009), antes da administração do inóculo.

2.2. Preparação do inóculo, infecção dos bovinos e alocação dos animais aos grupos

Para preparação do inóculo, foi utilizado o isolado Ipameri (Bastos et al., 2017)), código de acesso Genbank MK392089, que fica criopreservado (com 8% de glicerol) em nitrogênio líquido no CPV/UFG. No D-9 amostras de *T. vivax* deste isolado foram descongelados e inoculados, por via endovenosa, em um bovino (girolando, também com seis meses) mantido como doador, em isolamento, no mesmo local onde o estudo foi realizado. Deste modo, no D-5 foi possível detectar elevada quantidade de tripomastigotas circulantes (aproximadamente 3×10^6) no sangue do animal doador pelo método de Brener (1969). Após quantificação, preparou-se alíquotas de sangue com EDTA contendo aproximadamente 1×10^6 tripanossomatídeos viáveis, que foram inoculadas, no D-5, nos 30 bovinos utilizados neste estudo.

No D-1, após confirmação da infecção por *T. vivax* em todos os 30 animais, pelo método de Brener (1969), os mesmos foram distribuídos em seis grupos, de cinco animais cada, de acordo com a contagem de tripomastigotas do protozoário em questão (Brener 1969). Os bovinos foram divididos em seis blocos de cinco animais cada, e dentro de cada bloco, os animais foram aleatoriamente alocados aos grupos de tratamento. Conjuntos de dois e três blocos subsequentes foram designados a conjuntos de seis baias próximas, respectivamente, e os animais dentro destes agrupamentos de blocos foram alocados ao acaso às baias dentro do conjunto.

2.3. Grupos experimentais e critérios para repetir o tratamento e/ou reinfetar os animais com *T. vivax* após o dia 0 do estudo

O dia 0 do estudo, foi estabelecido como o dia em que os animais receberam o primeiro tratamento específico contra *T. vivax*. Após a randomização dos bovinos aos tratamentos, realizada de acordo com os critérios estabelecidos no item anterior, os grupos

ficaram assim divididos: G1 para animais CPOS; G2 para bovinos tratados com DIM (Ganaseg® Elanco Saúde Animal), via intramuscular no dia 0; G3 para animais tratados nos dias 0 e 14 com IMI (Imizol® MSD Saúde Animal) via subcutânea; G4 para bovinos tratados com cloreto de ISO0.5 (Vivedium® Ceva Saúde Animal), via intramuscular no dia 0; G5 para bezerros tratados com ISO1.0 (Vivedium® Ceva Saúde Animal), via intramuscular no dia 0; e G6 para animais receberam no dia 0 o DIM (Ganaseg® Elanco Saúde Animal), e no D+14 ISO1.0 (Vivedium® Ceva Saúde Animal), ambos pela via intramuscular, conforme descrito na Tabela 1.

Foi estabelecido que os bovinos receberia novo tratamento no 14º dia pós-tratamento (DPT), caso houvesse reaparecimento de parasitemia por *T. vivax* (detectado pelos métodos de Woo e/ou Brener) antes desse período. Também, caso os bovinos dos grupos DIM, IMI e ISO1.0 mantivessem ausência de parasitemia até o 50º DPT, estes seriam reinoculados com 1×10^6 tripomastigotas de *T. vivax* nesta data (Tabela 1).

2.4. Sinais clínicos, temperatura retal e determinação do volume globular dos animais

Para cada animal foi confeccionado uma ficha de identificação e, diariamente, entre D-1 e D+30 todos os bovinos foram avaliados visualmente quanto a possíveis anormalidades dos olhos e dos sistemas músculo-esquelético, tegumentar (pele, pêlos e cascos), gastrintestinal, nervoso, linfático e urinário. Além disso, a redução do apetite e do consumo de alimento, apatia e palidez de mucosas também foram observados.

Na mesma periodicidade, aferiu-se a temperatura retal e volume globular (VG) dos animais. A temperatura retal foi mensurada todos os dias entre 06:00 e 07:00h. Valores igual ou abaixo de 38,2°C foram considerados normais para a categoria (Almeida et al., 2010). Volume globular foi mensurado pela técnica do microhematócrito. Para o VG, 4 mL de sangue foi colhido da veia jugular de cada animal, em tubos contendo anticoagulante (EDTA). No laboratório, as amostras foram homogeneizadas novamente e o sangue foi transferido para tubos “capilar” (tubo de microhematócrito) até o preenchimento de 75% do tubo. Em seguida, cada tubo foi colocado em uma micro-centrífuga (13.000 RCF) e logo após cinco minutos de centrifugação realizou-se a leitura do VG de cada animal, utilizando um cartão específico para microhematócrito (Gomes et al., 2007). Valores igual ou acima de 24% foram considerados normais para a categoria. Entre D+31 e D+90, todos procedimentos supracitados passaram a ser realizados em dias alternados, quando após esta data, uma última avaliação foi realizada no D+180 apenas para os bovinos pertencentes aos grupos ISO0.5; ISO1.0 e DIM+ISO1.0.

2.5. Colheita de sangue para pesquisa de *Trypanosoma vivax* pelos métodos de Woo, Brener e cPCR

Entre D-1 ao D+30, foram colhidos 4mL de sangue de cada animal em tubos com EDTA, da veia jugular para pesquisa de *T. vivax* pelos métodos de Woo (Woo, 1970) e método de Brener (Brener, 1961). Entre D+31 e D+90, todos procedimentos passaram a ser realizados em dias alternados. Entre D+90 ao D+180 as avaliações foram realizadas semanalmente, apenas para os bovinos pertencentes aos grupos ISO0.5; ISO1.0 e DIM+ISO1.0. A técnica da cPCR (Cortez et al., 2009), foi realizada nas amostras colhidas dos 30 bovinos no D-8 e D-1. No D+1, D+7, D+14, D+21, D+28, D+55, D+75 e D+180, as análises foram realizadas apenas nas amostras colhidas dos grupos tratados.

2.6 Percentual de Eficácia e de redução nas contagens de tripomastigotas de *T. vivax*

Utilizando-se as médias aritméticas, foram calculados valores de eficácia e o percentual de redução nas contagens de tripomastigotas de *T. vivax* (Brener, 1969), para cada grupo de tratamento, em cada dia, utilizando as fórmulas descritas a seguir:

Percentual de Eficácia:

$$PE = \frac{MC - MT}{MC} \times 100$$

PE: percentual de eficácia

MC: Média de tripomastigotas de *T. vivax* no grupo controle no dia X

MT: Média de tripomastigotas de *T. vivax* no grupo tratado no dia X

Percentual de redução:

$$PR = \frac{MTD0 - MT}{MTD0} \times 100$$

PR: percentual de redução

MTD0: Média de tripomastigotas de *T. vivax* no grupo tratado no dia 0 (antes do tratamento)

MT: Média de tripomastigotas de *T. vivax* no grupo tratado no dia X

2.7. Análise dos dados

Os dados experimentais de temperatura retal, volume globular e contagens de tripomastigotas de *T. vivax* (Brener, 1969), foram agrupados em intervalos de sete dias para

serem avaliados estatisticamente. Na sequência, foram testados para as prerrogativas de normalidade, homogeneidade de variância e análise de resíduos, o que determinou que as variáveis temperatura retal e valor globular fossem analisados em um esquema fatorial em parcela subdivididas no tempo e suas médias comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. As observações obtidas pela técnica de Brener para os diferentes tratamentos foram confrontadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, método de Simes-Hochberg. Todas as análises foram efetuadas utilizando o software estatístico Statistica, versão 12 (StatSoft, Inc., 2014) ao nível de 95% de confiança ($P \leq 0,05$).

3. Resultados

Este é o primeiro trabalho que testou a eficácia do tratamento com imidocarb, diminazene e isometamidium em bovinos experimentalmente infectados com *T. vivax* no Brasil. Durante o estudo, nenhum efeito adverso ocorreu com os bovinos que receberam DIM e IMI. Entretanto, no grupo de animais que receberam ISO0.5 e ISO1.0, foi possível observar uma reação no local de aplicação, associada por claudicação destes animais após a administração desta formulação nas diferentes doses. Três animais pertencentes ao grupo controle vieram à óbito durante o estudo (12º, 20º e 35º DPT), decorrente da elevada parasitemia por *T. vivax*. Além disso, no 9º DPT, um animal tratado com DIM foi a óbito de maneira súbita, por causa indefinida.

O percentual de eficácia terapêutica e de redução alcançados pelas formulações, administradas em diferentes protocolos de tratamento, estão descritos na Tabela 1. Foi possível verificar que decorridos 24 horas pós-tratamento com as respectivas formulações, 100% de eficácia e redução foi atingido pelo DIM, ISO1.0 e DIM+ISO1.0. Para o IMI e ISO0.5 ainda foi possível diagnosticar tripomastigotas viáveis nos bovinos pertencentes a estes grupos no D+1 (99,9% de eficácia). Do 2º DPT até o final do estudo (180º DPT), as formulações contendo ISO0.5, ISO1.0 e DIM+ISO1.0, demonstraram valores de eficácia máxima (100%). Por outro lado, os animais que receberam IMI apresentaram recidivas de parasitemia por *T. vivax* no 14º DPT (66,9% de eficácia), e pelos critérios pré-estabelecidos neste estudo, receberam novo tratamento com IMI neste dia. Entretanto, estes mesmos bovinos voltaram a demonstrar parasitemia por *T. vivax* no 25º DPT (18,4% de eficácia) e, por este motivo, este grupo foi excluído do experimento. Para o DIM, os valores de eficácia e de redução foram de 100% do 1º ao 50º DPT. No 55º DPT, cinco dias após a reinfecção destes animais, os valores de eficácia e de redução atingidos pelo DIM decresceram para

0,0% e 13,8%, respectivamente, quando este grupo foi excluído do estudo. Já para ISO1.0 e DIM+ISO1.0 os valores de eficácia e de redução obtidos por estes tratamentos, foram de 100%, durante todo estudo, mesmo sendo reinfetados com 1×10^6 tripomastigotas de *T. vivax* 50 dias depois do tratamento com as referidas formulações (Tabela 2).

Os resultados da análise estatística, realizada por meio das contagens de tripomastigotas de *T. vivax* (Brener), reforçam as inferências descritas no parágrafo anterior (Tabela 3). As contagens médias de *T. vivax* dos bovinos tratados com IMI, não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) em relação à carga parasitária média quantificada nos animais controle do 15° ao 28° DPT. Além disso, do 55° ao 59° DPT, as contagens médias de tripomastigotas de *T. vivax* presentes nos animais tratados com DIM foram superiores ($P \leq 0,05$) as dos demais grupos (Tabela 3 e Figura 1). Nos animais tratados com ISO0.5, ISO1.0 e DIM+ISO1.0, a carga parasitária média por *T. vivax* diagnosticada foram inferiores ($P \leq 0,05$) as demonstradas pelos animais mantidos como controle, em todas as ocasiões pós-tratamento em que os bovinos não tratados (controle) demonstram parasitismo por *T. vivax* (59° DPT), pela técnica de Brener (Tabela 3 e Figura 1).

Durante a fase aguda de *T. vivax* (1° ao 28° DPT), foi possível verificar que animais mantidos como controle (CPOS) apresentaram médias de temperatura retal superiores ($P \leq 0,05$) às mensuradas nos grupos tratados com DIM, IMI, ISO0.5, ISO1.0 e DIM+ISO1.0 do 1° ao 28°, 1° ao 7°, 1° ao 28°, 1° ao 7° e 1° ao 14° DPT, respectivamente (Tabela 4). Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) de temperatura retal dentro do mesmo grupo não foram observadas nos animais tratados. Apenas no grupo controle foi observada diferença ($P \leq 0,05$) de temperatura corporal entre o 55° e 65° DPT, quando comparado com o período antecedente (Tabela 4).

Os dados de VG obtidos pelos grupos de animais que receberam tratamento contendo diminazene e/ou isometamidium (DIM; ISO0.5; ISO1.0 e DIM+ISO1.0), verificou-se que não houve diferença estatística nos valores médios de VG entre estes grupos. Entretanto foi possível observar em algumas datas, que apenas os grupos de bovinos que foram tratados com isometamidium 1mg/kg (ISO1.0 e DIM+ISO1.0), demonstraram queda nos valores de volume globular médio equivalentes estatisticamente ($P \leq 0,05$) aos mensurados nos animais infectados e mantidos como controle (Tabela 5 e Figura 2). Resultados semelhantes a estes citados para o ISO1.0, foram também obtidos para o IMI. As contagens médias de VG mensuradas nos bovinos tratados com IMI, não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) as do grupo controle positivo do 8° ao 14° e do 22° ao 28° DPT (Tabela 5).

Os resultados da cPCR expressos na Tabela 6 demonstram que após o tratamento dos animais, ainda foi possível confirmar a presença de *T. vivax* no D+1 em um bovino que recebeu IMI e outro animal tratado com ISO0.5. No 14º e 24º DPT, *T. vivax* foi diagnosticado em dois e um animal, tratados com IMI, respectivamente. Além disso, os quatro bovinos tratados no dia 0 com DIM, e reinfetados no 50º DPT, demonstraram parasitismo por *T. vivax* pela cPCR no 55º DPT. As demais amostras avaliadas foram negativas para *T. vivax* durante todo o período pós-tratamento (Tabela 6).

4. Discussão

No presente trabalho todos os animais se infectaram por *T. vivax* após inoculação, e os sinais clínicos típicos da tripanosomose como caquexia, anemia, decúbito e morte, semelhantes aos descritos em estudos anteriores (Andrade Neto e André, 2015; Cadioli et al., 2012; Pimentel et al., 2012), puderam ser observados nos animais mantidos como controle. O percentual de eficácia e de redução nas contagens de *T. vivax*, alcançados para o DIM e ISO1.0 foi de 100% 24 horas pós-tratamento, em acordo com dados apresentados por outros autores (Paiva et al., 2000; Schillinger et al., 1985). Ainda, foi observado que este resultado manteve-se até D+180 para os grupos de bovinos que receberam isometamidium (ISO0.5; ISO1.0 e DIM+ISO1.0), resultado inédito, não relatado anteriormente.

Testes de eficácia envolvendo diminazene e isometamidium foram realizados anteriormente utilizando metodologias diversas. Paiva et al. (2000) relatam resultados utilizando duas formulações comerciais de diminazene (3,5 mg/kg) contra *T. vivax* em vacas criadas em sistema extensivo e avaliadas 15 dias após a realização do tratamento. Seu estudo indica que diminazene foi eficaz no tratamento de *T. vivax*, mesmo relatando que um animal (dentre 14 analisados), apresentou nova parasitemia no final do estudo. Desquesnes et al. (1995) concluíram que a eficácia do diminazene 7,0mg/kg no controle da tripanosomose bovina foi considerada nula, quando realizaram teste com dois zebuínos infectados com isolado de *T. vivax* obtido durante surto natural ocorrido na Guiana Francesa. Ainda, neste estudo, os autores consideraram que o tratamento com isometamidium foi eficaz, na dose de 0,5 mg/kg, sem detectar o parasito até o dia 113 de estudo. Schönefeld et al. (1987), quando avaliaram a sensibilidade de isolados de *T. vivax* africanos ao isometamidium, relatam que este fármaco não apresentou efeito curativo em bovinos. Segundo os autores, este resultado sugere existência de resistência em função do uso indiscriminado de isometamidium no controle da doença naquela região. A possível justificativa para a diferença dos resultados

encontrados no presente estudo para o isometamidium, em comparação aos resultados relatados por Schonefeld et al em 1987, pode estar relacionada ao fato de que no Brasil, o isometamidium, depois de décadas sem ser utilizado em bovinos, voltou a ser licenciado e comercializado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em 2017. Tal fato, possivelmente fez com que até o momento, não ocorreu exposição de maneira significativa deste ativo ao referido protozoário.

O reaparecimento espontâneo de *T. vivax* pós-tratamento, já foi observado em infecções naturais e experimentais em animais de várias espécies, que receberam diminazene, isometamidium ou outras drogas tripanocidas (Dagnachew e Bezie, 2015). Como primeira hipótese, alguns autores relacionam esta nova parasitemia com o desenvolvimento de resistência do agente ao fármaco (Mulandane et al., 2018); a segunda hipótese seria em função da capacidade de escape que o *Trypanosoma* apresenta às drogas tripanocidas, invadindo tecidos do sistema nervoso (Ardelli e Woo, 2001; Batista et al., 2011) globo ocular (Whitelaw et al., 1988), pele (Capewell et al., 2016) ou tecido adiposo (Trindade et al., 2016), locais onde estes fármacos não atingiriam concentrações suficientes para eliminar o protozoário em questão.

No caso em específico ao reaparecimento de *T. vivax* pós-tratamento com diminazene, em bovinos com infecção natural no Brasil, é importante destacar um aspecto. É comum encontrar relatos publicados (Batista et al., 2008; Bassi et al., 2018; Cadioli et al., 2012), inclusive um reportado por esta mesma equipe de pesquisadores do presente estudo (Bastos et al. 2017), sobre o reaparecimento da parasitemia por *T. vivax*, em casos de surtos clínicos em gado de leite, depois de 15 a 20 dias que os animais recebem diminazene 7mg/kg.

A principal suspeita levantada por estes pesquisadores para este ocorrido, é a presença de resistência do protozoário em questão ao diminazene na dose utilizada. Entretanto, o referido ativo apresenta meia-vida de eliminação igual a 107.5 ± 8.50 horas (aproximadamente 4,5 dias) em bezerros, e 65% da dose administrada, acaba sendo eliminada em até 24 horas após a sua administração (Kaur et al., 2000). Tal fato demonstra que na verdade o diminazene apresenta um curto período residual de ação contra um determinado parasito. Se for levado em consideração os resultados de eficácia obtidos pelo DIM (7mg/kg), no presente estudo, pode-se verificar que este ativo, na dose supracitada, eliminou totalmente as tripomastigotas de *T. vivax*, e os bovinos foram demonstrar nova parasitemia pelo protozoário em questão, apenas porque estes animais foram reinfetados por *T. vivax* 50 dias pós-tratamento.

É importante frisar que, o isolado de *T. vivax* utilizada para infecção dos bovinos, no presente estudo, é a mesma em que foi relatada ser resistente ao diminazene por Bastos et al. (2017), situação muito semelhante a de outros pesquisadores (Batista et al. 2008, Bassi et al. 2018, Cadioli et al. 2012). Na prática, o que aconteceu no estudo publicado por Bastos et al. (2017), e também possivelmente por outros pesquisadores, foi o baixo período residual apresentado pelo diminazene, uma vez que os animais depois de 8 a 10 dias de tratamento, provavelmente se reinfetaram pela via iatrogênica, com uso de ocitocina exógena no rebanho, o que permitiu depois de aproximadamente 15 a 20 dias do tratamento, a ocorrência de nova parasitemia nos animais, ao invés de resistência do parasito ao diminazene administrado na dose de 7mg/kg. Por este motivo, recomenda-se que em situações onde os artigos descrevem resistência de *T. vivax* ao diminazene no Brasil, de maneira semelhante à descrita por Bastos et al. (2017), devem ser revistas.

O efeito de proteção encontrado para os grupos que receberam ISO1.0 no presente estudo, uma vez que estes animais foram reinfetados com 1×10^6 tripomastigotas de *T. vivax* 50 dias após o tratamento com o ativo citado anteriormente, pode ser justificado pelos resultados obtidos por Kinabo e Bogan (1988) e Eisler (1996). Tais autores, descrevem a meia vida de excreção do isometamidium (1,0mg/kg) sendo de 286 horas (aproximadamente 12 dias), podendo chegar a 463 horas, com capacidade de ser detectado no soro do animal por mais de 64 dias.

Para o dipropionato de Imidocarb há apenas um relato encontrado, por nós, citando seu uso no controle de *T. vivax*, durante um surto em vacas de leite no Brasil, onde este ativo, na dose de 2,4mg/kg, não foi eficaz contra *T. vivax* parasitando bovinos (Costa et al., 2016). Além disso, testes em ratos demonstram que o imidocarb também não foi eficaz no tratamento de infecções por outras espécies de *Trypanosoma* (Schafer da Silva et al., 2008), resultados semelhantes observados no presente estudo. De qualquer maneira, este é o primeiro trabalho controlado que relata resultados de teste de eficácia do imidocarb em bovinos experimentalmente infectados.

Com relação à temperatura corporal apresentada pelos animais, pode-se observar que picos de parasitemia que ocorreram nos animais do grupo controle (CPOS), em D+14 e D+24 assim como nos animais tratados com imidocarb e também nos bovinos tratados com DIM depois de serem reinfetados, foram acompanhados por picos de hipertermia, conforme já mencionado por diversos autores (Almeida et al., 2010; Dagnachew e Bezie, 2015; Desquesnes, 2004; Schenk et al., 2001).

Já os resultados de volume globular médio apresentados neste trabalho trazem informações interessantes, principalmente, em relação aos grupos de animais que foram tratados com ISO1.0. Estes bovinos foram os únicos, com exceção daqueles que receberam imidocarb que não foi efetivo contra *T. vivax*, que demonstraram queda no VG médio, em alguns momentos, se equivalendo estatisticamente ($P \leq 0,05$) aos valores médios de VG mensurados nos animais mantidos como controle. Esta observação do presente trabalho se assemelha com os resultados encontrados por Schillinger et al. (1985), quando estes pesquisadores afirmaram ocorrer queda significativa nas concentrações de hematócrito e hemoglobina, para até um terço do valor inicial, em bovinos tratados com isometamidium 1mg/kg. Tal fato destaca a importância em não se utilizar o isometamidium, na dose de 1mg/kg, quando o bovino estiver debilitado.

Com relação aos métodos de diagnóstico utilizados no estudo para detecção de *T. vivax* no presente estudo, animais que receberam diminazene (7mg/kg) ou isometamidium (1mg/kg) não apresentaram tripanossomatídeos no sangue circulante 24 horas pós-tratamento, por todos os métodos de diagnóstico empregados. Esta capacidade de *clearance* também foi observada por outros autores, em cães, ovelhas e bovinos infectados com *T. evansi*, *T. congolense* e *T. vivax*, após tratamento com isometamidium (Schillinger et al., 1985) ou diminazene (Dagnachew e Bezie, 2015).

Com base nos resultados aqui encontrados, podemos concluir que os protocolos de tratamento que continham diminazene (7mg/kg) e/ou isometamidium (0,5 e 1,0mg/kg), foram totalmente efetivos, atingindo 100% de eficácia terapêutica contra *Trypanosoma vivax* parasitando bovinos experimentalmente infectados. Os grupos que receberam isometamidium mantiveram tais índices de eficácia até D+180. Por outro lado, o imidocarb (4,8mg/kg) apresentou recidivas parasitológicas por *T. vivax* aproximadamente 10 a 14 dias pós-tratamento. Os animais tratados com isometamidium 1,0mg/kg, não demonstraram parasitismo por *T. vivax*, mesmo depois de serem reinfectados 50 dias após a realização do referido tratamento, diferentemente do que foi observado para o grupo de bovinos tratados no dia 0 com diminazene (7mg/kg) e reinfectados com o protozoário depois de 50 dias. Entretanto, os animais que receberam isometamidium 1,0mg/kg, demonstraram queda no volume globular, em alguns momentos, se equivalendo estatisticamente ($P \leq 0,05$) aos valores médios de VG mensurados nos animais controle. O reaparecimento de *T. vivax* em bovinos de campo no Brasil tratados com diminazene (7mg/kg), depois de 15 a 20 dias, mencionado em alguns trabalhos publicados, possivelmente ocorreu em função do curto período residual deste ativo, e não pelo fato de haver resistência do *T. vivax* ao diminazene, conforme discutido

neste estudo. Este é o primeiro trabalho que avaliou, em um mesmo delineamento experimental, a eficácia do diminazene, imidocarb e isometamidium contra *T. vivax* em bovinos experimentalmente infectados.

5. Conclusão

Podemos concluir que o tratamento curativo com diminazene (7 mg/kg) e isometamidium (1 mg/kg) apresentaram *clearance* de *T. vivax* no sangue circulante após 24 horas, enquanto que Imidocarb (4,8mg/kg) e isometamidium (0,5 mg/kg) necessitaram de um período maior para isso. Com relação à eficácia, apenas animais que receberam isometamidium foram capazes de permanecer sem nova parasitemia durante os 180 dias de estudo. Diferente do que foi observado com o diminazene, animais que receberam isometamidium na dose de 1,0mg/kg, mesmo sendo desafiados 50 dias após tratamento, não apresentaram reinfeção. Imidocarb não foi eficaz no tratamento da tripanosomose bovina.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Fundo para o Desenvolvimento da Agropecuária em Goiás (FUNDEPEC-GOIÁS), termo de compromisso assinado em 05/05/2016, e também contou com financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Referências

- Abrão, D.C., de Carvalho, A.Ú., Facury Filho, E.J., Bartholomeu, D.C., Ribeiro, M.F.B., 2009. ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DA INFECÇÃO NATURAL EM BOVINOS LEITEIROS POR *Trypanosoma vivax* EM MINAS GERAIS, BRASIL. *Ciência Animal Brasileira* 1, 666-671.
- Almeida, K.S., Freitas, F.L.C., Tebaldi, J.H., Alessi, A.C., Machado, R.Z., Nascimento, A.A., 2010. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. *Ciência Animal Brasileira* 11, 669-676.
- Almeida GLP, Pandorfi H, Guiselini C, Almeida GAP, Morri WBB. Investimento em climatização na pré-ordenha de vacas girolando e seus efeitos na produção de leite. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, v. 14, n. 12, 2010.
- Andrade Neto, A.Q.A., J.A.B.; Mendonça, C.L.; Souto, R.J.C.; André, M.R.M., R.Z., 2015. Surto de tripanossomíase em bovinos leiteiros no agreste dos estados de Pernambuco e Alagoas. *O biológico*, supl. 2 77, 143.
- Ardelli, B.F., Woo, P.T.K., 2001. The in vitro effects of isometamidium chloride (Samorin) on the piscine hemoflagellate *Cryptobia salmositica* (Kinetoplastida, Bodonina). *Journal of Parasitology* 87, 194-202.

- Bastos, T.S.A., Faria, A.M., Madrid, D.M.d.C., Bessa, L.C.d., Linhares, G.F.C., Fidelis Junior, O.L., Sampaio, P.H., Cruz, B.C., Cruvinel, L.B., Nicaretta, J.E., 2017. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 0-0.
- Batista, J.S., Rodrigues, C.M.F., García, H.A., Bezerra, F.S.B., Olinda, R.G., Teixeira, M.M.G., Soto-Blanco, B., 2011. Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. *Veterinary research* 42, 63.
- Brener, Z., 1961. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas. Belo Horizonte,. Tese de Livre Docência-Faculdade de Odontologia da UFMG.
- Cadioli, F.A., Barnabé, P.d.A., Machado, R.Z., Teixeira, M.C.A., André, M.R., Sampaio, P.H., Fidélis Junior, O.L., Teixeira, M.M.G., Marques, L.C., 2012. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 21, 118-124.
- Capewell, P., Cren-Travaillé, C., Marchesi, F., Johnston, P., Clucas, C., Benson, R.A., Gorman, T.-A., Calvo-Alvarez, E., Crouzols, A., Jouvion, G., 2016. The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. *Elife* 5, e17716.
- Cortez, A.P., Rodrigues, A.C., Garcia, H.A., Neves, L., Batista, J.S., Bengaly, Z., Paiva, F., Teixeira, M.M.G., 2009. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America—characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular probes* 23, 44-51.
- Costa, R.V.C., Abreu, A.P.M., Machado, M.N., Thomé, S.M.G., Massard, C.L., Santos, H.A., Brito, M.F., 2016. Tripanossomíase em bovinos no estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36, 161-163.
- Dagnachew S, Bezie M, 2015. Review on *Trypanosoma vivax*. *Afr J Basic Appl Sci* 7, 41-64.
- Desquesnes, M., 2004. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America.
- Desquesnes, M., Rocque, S., Peregrine, A.S., 1995. French Guyanan stock of *Trypanosoma vivax* resistant to diminazene aceturate but sensitive to isometamidium chloride.
- Eisler, M.C., 1996. Pharmacokinetics of the chemoprophylactic and chemotherapeutic trypanocidal drug isometamidium chloride (Samorin) in cattle. *Drug metabolism and disposition* 24, 1355-1361.
- Gomes K, Santos MGC, Franco DF, Pires RB, Silva MG, Neves MF, Bassani-Silva S. Avaliação do hematócrito e da proteína plasmática em sangues hemodiluídos. *Revista eletrônica de Medicina Veterinária*. Ano III, n. 7, 2007.
- Gutiérrez, C., González-Martín, M., Corbera, J.A., Junco, M., 2013. Chemotherapeutic agents against pathogenic animal trypanosomes. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Méndez-Vilas A, editor. Spain: Formatex Research Center, 1564-1573.
- Kaur, G., Chaudhary, R.K., Srivastava, A.K., 2000. Pharmacokinetics, urinary excretion and dosage regimen of diminazene in crossbred calves. *Acta Veterinaria Hungarica* 48, 187-192.
- Kinabo, L.D.B., Bogan, T.L.J., 1988. The pharmacology of isometamidium. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 11, 233-245.
- Mulandane, F.C., Fafetine, J., Van Den Abbeele, J., Clausen, P.-H., Hoppenheit, A., Cecchi, G., Oosthuizen, M., Delespaux, V., Neves, L., 2018. Resistance to trypanocidal drugs in cattle populations of Zambezia Province, Mozambique. *Parasitology research* 117, 429-436.
- Paiva, F., Lemos, R.A.A.d., Nakasato, L., Mori, A.E., Brum, K.B., Bernardo, K.C., 2000. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil:

- I.-Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 9, 135-141.
- Pimentel, D.d.S., do Nascimento Ramos, C.A., do Nascimento Ramos, R.A., de Araújo, F.R., Borba, M.L., da Gloria Faustino, M.A., Alves, L.C., 2012. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. *Veterinary parasitology* 185, 286-289.
- Salas, R.Z., Zuluaga, E.A.C., Vélez, J.R., Chávez, O.T., García, V.H.P., Osorio, L.A.R., Rosales, R.B., Echeverry, D.P., 2017. Tripanosomiasis bovina en ganadería lechera de trópico alto: primer informe de *Haematobia irritans* como principal vector de *T. vivax* y *T. evansi* en Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 21-34.
- Schafer da Silva, A., Tochetto, C., Zanette, R.A., Pierezan, F., Rissi, D.R., Morais Santurio, J., Gonzalez Monteiro, S., 2008. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. *Ciência Rural* 38.
- Schenk, M.A.M., Mendonça, C.L., Madruga, C.R., Kohayagawa, A., Araújo, F.R., 2001. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 157-161.
- Schillinger, D., Maloo, S.H., Röttcher, D., 1985. The toxic effect of intravenous application of the trypanocide isometamidium (Samorin®). *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A* 32, 234-239.
- Schönefeld, A., Röttcher, D., Moloo, S.K., 1987. The sensitivity to trypanocidal drugs of *Trypanosoma vivax* isolated in Kenya and Somalia. *Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)* 38, 177-180.
- Silva, R.A.M.S., Silva, J.A.d., Schneider, R.C., Freitas, J.d., Mesquita, D., Mesquita, T., Ramirez, L., Dávila, A.M.R., Pereira, M.E.B., 1996. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 561-562.
- Trindade, S., Rijo-Ferreira, F., Carvalho, T., Pinto-Neves, D., Guegan, F., Aresta-Branco, F., Bento, F., Young, S.A., Pinto, A., Van Den Abbeele, J., 2016. *Trypanosoma brucei* parasites occupy and functionally adapt to the adipose tissue in mice. *Cell host & microbe* 19, 837-848.
- Whitelaw, D.D., Gardiner, P.R., Murray, M., 1988. 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* 97, 51-61.
- Woo, P.T.K., 1970. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta tropica* 27, 384-386

FIGURA 1: Volume globular médio dos grupos de bezerros experimentalmente infectados com *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri e posteriormente tratados com diferentes formulações ou mantidos como controle. CPOS= Controle positivo; ISO0.5= tratamento com Isometamidium (0,5mg/kg) no dia 0; ISO1.0= tratamento com Isometamidium (1mg/kg) no dia 0; DIM+ISO1.0= tratamento com Diminazene (7mg/kg) no dia 0 e Isometamidium 1.0 (1,0mg/kg) no dia 14.

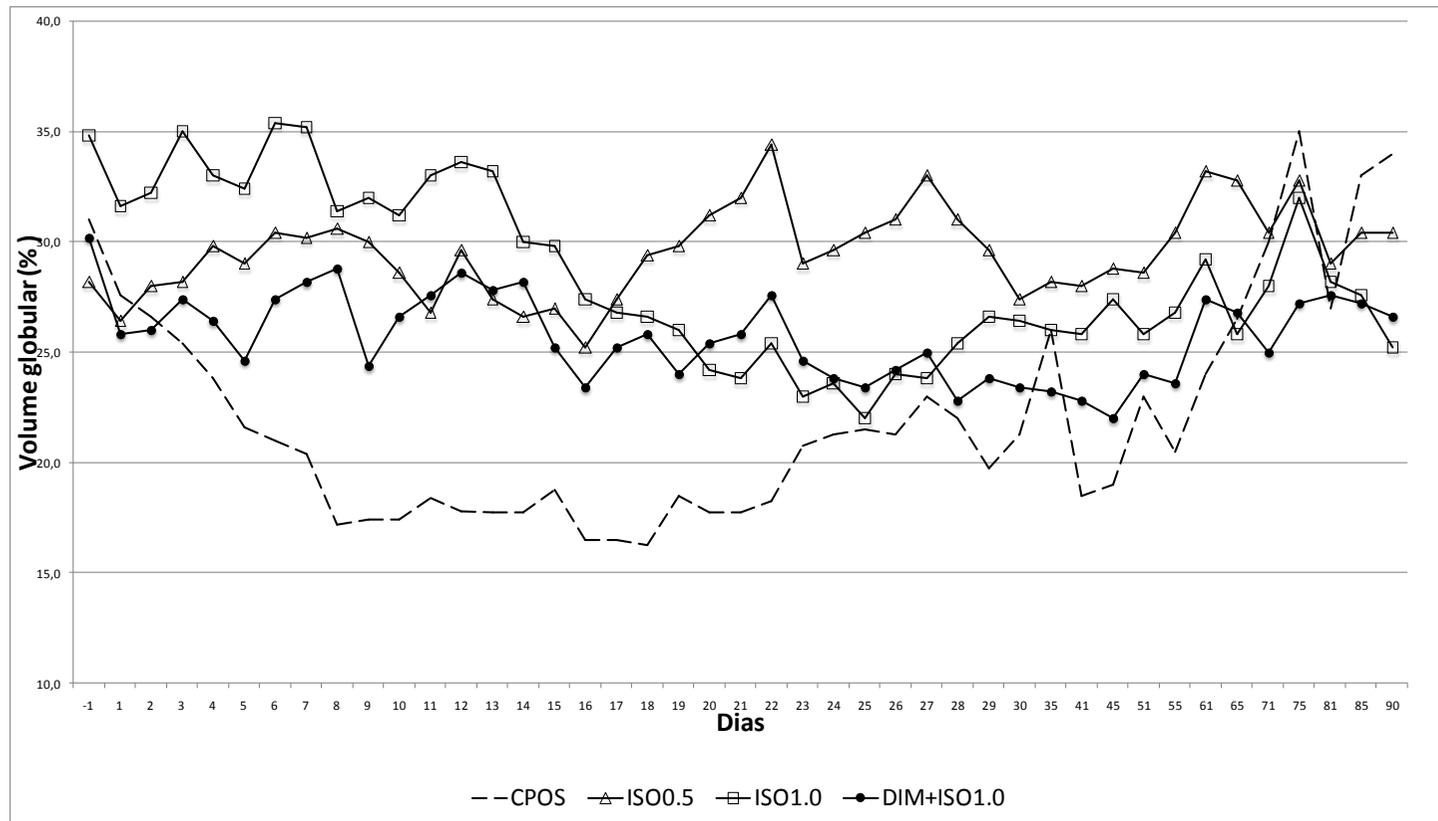


FIGURA 2: Valores médios de parasitemia em bezerros experimentalmente infectados com *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri e posteriormente tratados com diferentes formulações ou mantidos como controle. CPOS= Controle positivo; DIM= tratamento com aceturato de diminazene (7 mg/kg) no dia 0; IMI= tratamento com dipropionato de imidocarb (4,8mg/kg) nos dias 0 e 14; ISO0.5= tratamento com isometamidium (0,5mg/kg) no dia 0; ISO1.0= tratamento com Isometamidium (1mg/kg) no dia 0; DIM+ISO1.0= tratamento com Diminazene (7mg/kg) no dia 0 e Isometamidium 1.0 (1,0mg/kg) no dia 14.

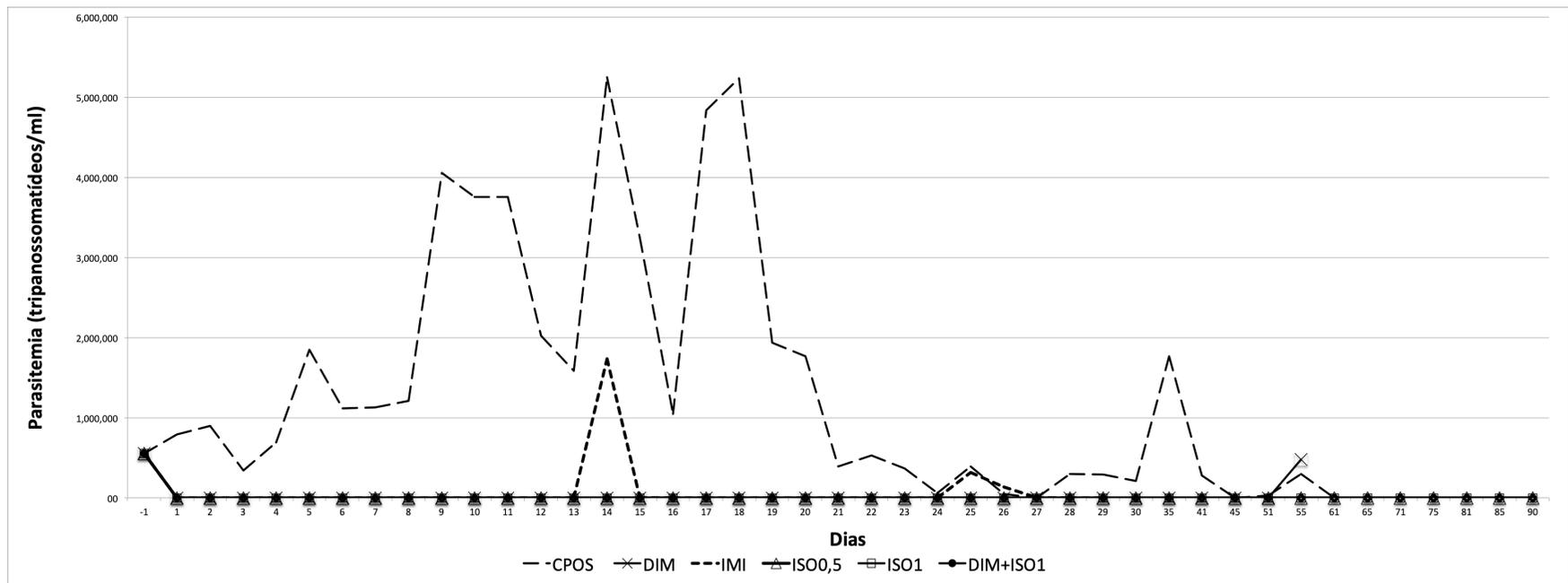


TABELA 1: Grupos experimentais, produtos utilizados, dose, via de inoculação, regime de tratamentos e desafio pós-tratamento dos bezerros infectados experimentalmente com *T. vivax* isolado Ipameri.

Tratamentos	Grupos	Dose	Via de inoculação de <i>Trypanosoma vivax</i>	Regime de tratamento	Dia da re-infecção pós-tratamento
CPOS	Controle (solução salina 0,9%)	10mL	Intramuscular profunda	D0	----
DIM	Diminazene	7 mg/kg	Intramuscular profunda	D 0	D+50
IMI	Imidocarb	4,8mg/Kg	Subcutânea	D0 e D+14	----
ISO0.5	Isometamidium	0,5mg/kg	Intramuscular profunda	D0	----
ISO1.0	Isometamidium	1mg/kg	Intramuscular profunda	D0	D+50
DIM+ISO1.0	Diminazene + Isometamidium	7 mg/kg + 1mg/kg	Intramuscular profunda	D0 e D+14	D+50

TABELA 2: Percentuais de eficácia e de redução nas contagens de tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri em bovinos experimentalmente infectados com 1×10^6 tripomastigotas, e posteriormente tratados com diferentes formulações ou mantidos como controle.

Dia do estudo	Grupos experimentais / Número médio de Tripomastigotas de <i>T. vivax</i>						% EFICÁCIA					% REDUÇÃO				
	T01: Controle positivo	T02: Diminazene 7mg/kg dia 0	T03: Imidocarb (4,8mg/kg) dias 0 e 14	T04: isometamidium (0,5mg/kg) dia 0	T05: isometamidium (1,0mg/kg) dia 0	T 06: diminazene (7mg/kg) dia 0 e isometamidium (1,0mg/kg) dia 14	DIM	IMI	ISO0,5	ISO1,0	DIM+ISO1,0	DIM	IMI	ISO0,5	ISO1,0	DIM+ISO1,0
-1	555600.0	555600.0	551600.0	553600.0	553600.0	553600.0										
1	792000.0	0.0	4.0	4.0	0.0	0.0	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0
2	897600.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
3	340004.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
4	695204.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
5	1846008.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
6	1115208.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
7	1127600.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
8	1210004.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
9	4054120.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
10	3755200.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
11	3755200.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
12	2025000.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
13	1585015.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
14	5250030.0	0.0	1735200.0	0.0	0.0	0.0	100.0	66.9	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	100.0	100.0	100.0
15	3250020.0	0.0	7604.0	0.0	0.0	0.0	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	98.6	100.0	100.0	100.0
16	1050015.0	0.0	72.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
17	4834500.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
18	5237500.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
19	1934515.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
20	1766833.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
21	390000.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
22	530000.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
23	366746.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
24	63366.7	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
25	392006.7	0.0	320000.0	0.0	0.0	0.0	100.0	18.4	100.0	100.0	100.0	100.0	42.0	100.0	100.0	100.0
26	50673.3	0.0	NR	0.0	0.0	0.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0
27	93.3	0.0	NR	0.0	0.0	0.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0
28	300266.7	0.0	NR	0.0	0.0	0.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0
29	290053.3	0.0	NR	0.0	0.0	0.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0
30	213353.3	0.0	NR	0.0	0.0	0.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0
35	1765000.0	0.0	NR	0.0	0.0	0.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0
41	280000.0	0.0	NR	0.0	0.0	0.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0
45	10.0	0.0	NR	0.0	0.0	0.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0
51	32030.0	0.0	NR	0.0	0.0	0.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0	100.0	NR	100.0	100.0	100.0
55	60.0	479010.0	NR	0.0	0.0	0.0	0.0	NR	100.0	100.0	100.0	100.0	13.8	NR	100.0	100.0
61	0.0	NR	NR	0.0	0.0	0.0	NR	NR	NA	NA	NA	NR	NR	100.0	100.0	100.0
65	0.0	NR	NR	0.0	0.0	0.0	NR	NR	NA	NA	NA	NR	NR	100.0	100.0	100.0
71	0.0	NR	NR	0.0	0.0	0.0	NR	NR	NA	NA	NA	NR	NR	100.0	100.0	100.0
75	0.0	NR	NR	0.0	0.0	0.0	NR	NR	NA	NA	NA	NR	NR	100.0	100.0	100.0
81	0.0	NR	NR	0.0	0.0	0.0	NR	NR	NA	NA	NA	NR	NR	100.0	100.0	100.0
85	0.0	NR	NR	0.0	0.0	0.0	NR	NR	NA	NA	NA	NR	NR	100.0	100.0	100.0
90	0.0	NR	NR	0.0	0.0	0.0	NR	NR	NA	NA	NA	NR	NR	100.0	100.0	100.0
97 a 180	NR	NR	NR	0.0	0.0	0.0	NR	NR	NA	NA	NA	NR	NR	100.0	100.0	100.0

NR= Não realizado. Grupo foi excluído do estudo em função da baixa eficácia

NA= Não aplicado em função das contagens de tripomastigotas de *T. vivax* presentes no grupo controle

TABELA 3: Parasitemia por tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri, diagnosticada pela técnica de Brener, em bovinos experimentalmente infectados com 1×10^6 tripomastigotas do protozoário em questão, e posteriormente tratados com diferentes formulações, ou mantidos como controle.

Período Experimental (dias)	Grupos Experimentais / Médias e Desvios Padrões*											
	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
0	555600 ±	592998 Aab	555600 ±	390956 Aa	551600 ±	613989 Aa	553600 ±	612531 Aa	553600 ±	355591 Aa	553600 ±	923334 Aa
1 a 7	973375 ±	1287947 Aab	0 ±	0 Bb	1 ±	1 Bb	1 ±	1 Bb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb
8 a 14	3090653 ±	2006711 Aa	0 ±	0 Bb	247886 ±	548240 Bb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb
15 a 21	2637626 ±	2700325 Aab	0 ±	0 Bb	1097 ±	2450 ABb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb
22 a 28	243308 ±	194064 Aabc	0 ±	0 Bb	53155 ±	118858 ABb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb
29 a 35	583901 ±	192509 Aa	0 ±	0 Bb			0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb
37 a 41	301683 ±	53031 Aab	0 ±	0 Bb			0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb
43 a 47	36693 ±	25923 Abcd	0 ±	0 Bb			0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb
49 a 53	282010 ±	163113 Aab	0 ±	0 Bb			0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb
55 a 59	20 ±	14 Bcd	479010 ±	696078 Aa			0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb	0 ±	0 Bb
61 a 65	0 ±	0 Ad					0 ±	0 Ab	0 ±	0 Ab	0 ±	0 Ab
67 a 71	0 ±	0 Ad					0 ±	0 Ab	0 ±	0 Ab	0 ±	0 Ab
73 a 77							0 ±	0 Ab	0 ±	0 Ab	0 ±	0 Ab
79 a 90							0 ±	0 Ab	0 ±	0 Ab	0 ±	0 Ab

*: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis ($p \geq 0,05$)

T1: Controle positivo

T2: Diminazene 7mg/kg (Dia 0) - IM

T3: Imidocarb (4,8mg/kg) Dias 0 e 14 - SC

T4: Isometamidium 0,5mg/kg - IM

T5: Isometamidium 1mg/kg - IM

T6: Diminazene 7mg/kg D0 e Isometamidium 1mg/kg D+14

TABELA 4: Valores médios de temperatura retal mensuradas em bovinos experimentalmente infectados com 1×10^6 tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri e posteriormente tratados com diferentes formulações, ou mantidos como controle.

Período Experimental (dias)	Grupos Experimentais / Médias e Desvios Padrões Temperatura retal (°C)*											
	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
0	38,60 ±	0,90 Aabc	38,16 ±	0,61 Aa	38,14 ±	0,46 Aa	38,50 ±	0,33 Aa	38,22 ±	0,69 Aa	37,86 ±	0,47 Aabc
1 a 7	39,56 ±	0,79 Aa	37,59 ±	0,37 Ba	37,83 ±	0,33 Ba	37,86 ±	0,14 Ba	37,99 ±	0,65 Ba	37,93 ±	0,53 Babc
8 a 14	38,88 ±	0,42 Aab	37,90 ±	0,21 Ba	38,10 ±	0,66 ABa	37,86 ±	0,39 Ba	38,44 ±	0,42 ABa	38,16 ±	0,50 Bab
15 a 21	38,66 ±	0,19 Aabc	37,81 ±	0,22 BCa	38,34 ±	0,33 ABa	37,63 ±	0,53 Ca	38,39 ±	0,39 ABa	38,23 ±	0,21 ABCab
22 a 28	39,09 ±	0,54 Aab	38,28 ±	0,23 Ba	38,33 ±	0,27 ABa	37,71 ±	0,41 Ba	38,42 ±	0,59 ABa	38,25 ±	0,28 ABab
29 a 35	38,23 ±	0,34 Abc	37,67 ±	0,30 Aa			37,84 ±	0,22 Aa	37,97 ±	0,35 Aa	37,68 ±	0,33 Aabc
37 a 41	38,64 ±	0,12 Aabc	37,75 ±	0,55 Ba			37,91 ±	0,24 ABa	38,31 ±	0,70 ABa	37,89 ±	0,28 ABabc
43 a 47	38,24 ±	0,31 Abc	37,68 ±	0,11 Ba			37,82 ±	0,21 ABa	37,78 ±	0,30 Ba	37,71 ±	0,14 Babc
49 a 53	38,49 ±	0,22 Abc	37,68 ±	0,29 Ba			37,92 ±	0,37 ABa	37,91 ±	0,45 AB	37,61 ±	0,37 Bbc
55 a 59	36,99 ±	0,22 Ad					37,69 ±	0,55 Aa	37,54 ±	0,59 Aa	37,33 ±	0,13 Ac
61 a 65	36,97 ±	0,24 Ad					37,71 ±	0,54 Aa	37,69 ±	0,54 Aa	37,66 ±	0,26 Aabc
67 a 71	37,87 ±	0,42 Acd					38,08 ±	0,71 Aa	37,96 ±	0,58 Aa	37,84 ±	0,18 Aabc
73 a 77							37,75 ±	0,69 Aa	37,81 ±	0,74 Aa	37,89 ±	0,35 Aabc
79 a 90							38,17 ±	0,35 Aa	38,61 ±	0,65 Aa	38,42 ±	0,46 Aa

*: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer ($p \leq 0,05$)

T1: Controle positivo

T2: Diminazene 7mg/kg (Dia 0) - IM

T3: Imidocarb (4,8mg/kg) Dias 0 e 14 - SC

T4: Isometamidium 0,5mg/kg - IM

T5: Isometamidium 1mg/kg - IM

T6: Diminazene 7mg/kg D0 e Isometamidium 1mg/kg D+14

TABELA 5: Valores médios de volume globular aferido de bovinos experimentalmente infectados com 1×10^6 tripomastigotas de *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri e posteriormente tratados com diferentes formulações, ou mantidos como controle.

Período Experimental (dias)	Grupos Experimentais / Médias e Desvios Padrões do VG*											
	T1		T2		T3		T4		T5		T6	
0	31,00 ±	9,06 Aa	33,00 ±	4,36 Aa	26,40 ±	9,48 Aa	28,20 ±	3,42 Aa	34,80 ±	8,93 Aa	30,20 ±	6,65 Aa
1 a 7	23,77 ±	9,01 Aa	30,11 ±	4,70 Aab	24,94 ±	7,32 Aa	28,86 ±	3,32 Aa	33,54 ±	8,49 Aa	26,54 ±	3,87 Aa
8 a 14	17,67 ±	4,97 Ba	27,61 ±	2,22 Aabc	27,14 ±	4,90 ABa	28,51 ±	3,69 Aa	32,06 ±	8,47 Aa	27,43 ±	2,48 Aa
15 a 21	17,43 ±	5,01 Ba	26,46 ±	2,51 Abc	25,86 ±	4,58 Aa	28,86 ±	6,03 Aa	26,37 ±	3,63 Aa	24,97 ±	3,06 ABa
22 a 28	21,14 ±	5,21 Ba	25,57 ±	1,27 Abc	27,06 ±	3,35 ABa	31,20 ±	4,02 Aa	23,89 ±	8,31 ABa	24,49 ±	3,08 ABa
29 a 35	22,32 ±	4,21 Aa	23,50 ±	0,92 Ac			27,37 ±	1,59 Aa	26,03 ±	5,55 Aa	23,00 ±	3,88 Aa
37 a 41	21,91 ±	0,76 Aa	25,83 ±	2,88 Abc			27,47 ±	2,02 Aa	26,80 ±	9,08 Aa	24,87 ±	4,46 Aa
43 a 47	19,00 ±	6,59 Ba	25,33 ±	3,05 Abc			28,13 ±	2,59 Aa	27,60 ±	6,43 ABa	24,60 ±	3,00 ABa
49 a 53	20,80 ±	7,16 Aa	26,67 ±	2,20 Abc			28,07 ±	2,64 Aa	26,73 ±	8,79 Aa	24,60 ±	4,06 Aa
55 a 59	19,77 ±	6,11 Ba					30,73 ±	4,37 Aa	28,00 ±	7,34 ABa	25,53 ±	4,78 ABa
61 a 65	22,60 ±	6,86 Aa					32,53 ±	4,37 Aa	28,00 ±	7,86 Aa	27,00 ±	4,73 Aa
67 a 71	20,75 ±	5,59 Aa					31,53 ±	6,93 Aa	30,00 ±	9,29 Aa	26,60 ±	3,48 Aa
73 a 77							31,53 ±	6,70 Aa	30,60 ±	8,12 Aa	27,60 ±	2,84 Aa
79 a 90							29,93 ±	4,09 Aa	27,00 ±	6,58 Aa	27,13 ±	1,82 Aa

*: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer ($p \geq 0,05$)

T1: Controle positivo

T2: Diminazene 7mg/kg (Dia 0) - IM

T3: Imidocarb (4,8mg/kg) Dias 0 e 14 - SC

T4: Isometamidium 0,5mg/kg - IM

T5: Isometamidium 1mg/kg - IM

T6: Diminazene 7mg/kg D0 e Isometamidium 1mg/kg D+14

TABELA 6: Resultados dos exames de diagnóstico para *Trypanosoma vivax* isolado Ipameri realizados nos bovinos previamente infectados com 1×10^6 tripomastigotas e posteriormente tratados com diferentes formulações, ou mantidos como controle.

Tratamento	Número do bovino	Dias pós inoculação/Técnica de diagnóstico utilizada																														
		-8			-1			1			7			14			24			28			55			75			180			
		Wo	Bre	PCR	Wo	Bre	PCR	Wo	Bre	PCR	Wo	Bre	PCR	Wo	Bre	PCR	Wo	Bre	PCR	Wo	Bre	PCR	Wo	Bre	PCR	Wo	Bre	PCR	Wo	Bre	PCR	
Controle positivo	107	-	-	-	+	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR														
	582	-	-	-	+	+	+	+	+	NR	+	+	NR	+	+	NR	-	NR	NR	NR	NR											
	602	-	-	-	+	+	+	+	+	NR	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR														
	604	-	-	-	+	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR													
	620	-	-	-	+	+	+	+	+	NR	+	-	NR	-	-	NR	-	-	NR	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
Total		0	0	0	5	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Diminazene 7mg/kg no dia 0	4	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	18	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	20	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	21	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	651	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR												
Total		0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	-	-	-	-	-	-	
Imidocarb 4,8mg/kg nos dias 0 e 14	9	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
	12	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
	48	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	112	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	594	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Total		0	0	0	5	5	5	1	1	1	0	0	0	2	2	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Isometamidium 0,5mg/kg no dia 0	9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	12	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	48	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	112	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	CHI	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Total		0	0	0	5	5	5	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Isometamidium 1,0mg/kg no dia 0	577	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	591	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	596	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	619	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	643	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Total		0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Diminazene 7mg/kg no dia 0 e isometamidium 1,0mg/kg no dia 14	5	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	15	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	17	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	576	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Total		0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

- Diagnóstico negativo (ausência) para *T. vivax*; + Diagnóstico positivo (presença) para *T. vivax*; NR=Não realizado.

CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo relata que no estado de Goiás os surtos de tripanosomose bovina causada por *T. vivax* foram diagnosticados apenas em animais da raça Girolando com aptidão leiteira, em propriedades localizadas basicamente nas regiões Central e Sul do referido estado, onde a aquisição de novos animais portadores de *T. vivax*, aliado à conduta de administração da ocitocina nas vacas em cada ordenha, utilizando-se a mesma seringa e agulhas entre vários animais, foram os principais fatores de risco para ocorrer a disseminação deste hemoparasito. Após a constatação dos surtos, houve um decréscimo de 39,62% na produção média diária de litros de leite das vacas e, além disso, em três propriedades em que os produtores acreditavam que o problema seria *T. vivax*, foram encontrados animais com elevado grau de parasitismo por *A. marginale*. A presença de tabanídeos, *S. calcitrans* e *H. irritans* não apresentaram-se como fator de risco para ocorrência deste protozoário.

Foi demonstrado que *T. vivax* é capaz de infectar e desenvolver a doença em bezerros, independente da via de inoculação: intradérmica, subcutânea, intramuscular ou endovenosa. Os animais doentes apresentaram correlação positiva entre *T. vivax* e temperatura retal, e correlação negativa entre este protozoário e volume globular. A presença de *Anaplasma marginale* latente nos bezerros infectados com *T. vivax* atuou como co-infecção, interferindo diretamente no percentual de mortalidade dos animais. Devido a sua manifestação clínica, *T. vivax* deve ser incluído ao complexo denominado “Tristeza Parasitária Bovina”, que, atualmente, englobam apenas *Anaplasma* e *Babesia*.

Com relação à eficácia, foi observado que apenas animais que receberam isometamidium foram capazes de permanecer sem nova parasitemia durante os 180 dias de estudo. O tratamento curativo com diminazene (7 mg/kg) e isometamidium (1 mg/kg) apresentaram *clearance* de *T. vivax* no sangue circulante após 24 horas, enquanto que Imidocarb (4,8mg/kg) e isometamidium (0,5 mg/kg) necessitaram de um período maior para isso. Diferente do que foi observado com o diminazene, animais que receberam isometamidium na dose de 1,0mg/kg, mesmo sendo desafiados 50 dias após tratamento, não apresentaram reinfecção. Além disso, imidocarb não foi eficaz no tratamento da tripanosomose bovina.

Futuros estudos são necessários para compreender se moscas hematófagas realmente são capazes de transmitir *T. vivax*, ou se há outras formas de transmissão. Estudo comparativo entre os métodos de diagnóstico precisam ser realizados durante a fase aguda e

crônica da doença, e também a avaliação de tripanotolerância em bovinos brasileiros precisa ser investigada.

Por ultimo, este é o primeiro trabalho que descreve a presença de *T. vivax*, bem como sua epidemiologia no estado de Goiás, avaliou a capacidade de infecção deste parasito por diferentes vias, os sinais clínicos, e métodos de diagnóstico e, também avaliou a eficácia do tratamento com imidocarb, diminazene e isometamidium em bovinos experimentalmente infectados com *T. vivax* no Brasil.

ANEXOS

ANEXO A. QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO APLICADO NO ESTUDO DESENVOLVIDO NO CAPÍTULO 2.

TRIPANOSOMOSE BOVINA: Estudo epidemiológico

PARTE I: QUESTIONÁRIO:

01-Identificação Município: _____ Região: _____ Proprietário: _____ Propriedade: _____	02- Data da visita e colheita ____/____/____ 03- Coordenadas Lat: _____ Lon: _____ Altitude: _____
---	---

04 – Tipo de exploração: () corte () leite () mista

05- Tipo de criação: () confinado () semi-confinado () extensivo

06 – Raça predominante: () zebu () europeu de leite () europeu de corte () mestiço () outras raças

07- Bovinos existentes								
Machos castrados	Machos inteiros (meses)				Fêmeas (meses)			
	0-6	6-12	12-24	>24	0-6	6-12	12-24	>24
Total:								

08- Outras espécies na propriedade: () ovinos/caprinos () equídeos () suínos () aves () cão () gato

09- Espécies silvestres em vida livre na propriedade: () não tem () cervídeos () capivaras () outras: _____

10 - Usa inseminação artificial? () não () usa inseminação artificial e touro () usa só inseminação artificial

11- N- de ordenhas por dia (apenas leite e mista): () 1 ordenha () 2 ordenhas () 3 ordenhas () não ordenha

12- Tipo de ordenha (apenas leite e mista): () manual () mecânica ao pé () mecânica na sala de ordenha () não ordenha

13- A propriedade faz uso da ocitocina durante o manejo pré-ordenha? () sim () não

Se SIM, é utilizada uma agulha para cada animal? () sim () não

14- Produção de leite (apenas leite e mista):

a) Número de vacas em lactação: _____

b) Produção diária de leite na fazenda: _____

15- Houve compra fêmeas ou machos nos últimos 90 dias? () sim () não

Onde/de quem: () em exposição () em leilão/feira () de comerciante de gado () diretamente de outras fazendas

Qual o local de origem? _____

16- Houve venda de fêmeas ou machos nos últimos 90 dias? () sim () não

Onde/de quem: () em exposição () em leilão/feira () de comerciante de gado () diretamente de outras fazendas

Qual o local de destino? _____

17- Houve surto de doença(s) nos bovinos ou ovinos nos últimos 90 dias? () sim () não

18- Houve morte? () sim () não

Se SIM, a quanto tempo se iniciaram as mortes? _____

quantos animais morreram? _____

quantos estavam em lactação? _____

quais os sinais observados? _____

qual a suspeita clínica? _____

se houve tentativa de tratar os animais, qual foi droga utilizada? _____

19- Houve impacto na produção de leite diária? () sim () não

Qual era a produção anterior ao início do surto? _____

Qual é a produção atual? _____

20- Antes de morrer, o animal apresentou dificuldade de locomover? () sim () não

21- Alguma vaca abortou nos últimos 12 meses? () sim () não

22- Tem nascido bezerros fracos, que morrem em aproximadamente 1 ou 2 dias após o parto? () sim () não

23- Tem conhecimento do que é a Tripanossomose bovina? () sim () não

ANEXO B. DESCRIÇÃO DETALHADA DOS ENSAIOS DE PCR, SEGUNDO CORTEZ (2009).

Para os ensaios de PCR, visando as ampliações de fragmentos do gen *CatL-Like* de *T. vivax*, foi extraído DNA a partir de 200 µl de sangue de cada amostra utilizando-se o Kit de Extração de DNA Mini Spin® (Kasvi®), conforme as recomendações do fabricante.

O DNA obtido foi amplificado pela técnica da PCR, utilizando-se os seguintes iniciadores TviCatL [5'GCCATCGCCAAGTACCTCGCCGA3'] e DT0155 [5'TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA3'] (Invitrogen®), que amplificam um fragmento específico de 177 pares de base (pb) do gene da região domínio catalítico *CatL-Like*, que codifica a enzima Cathepsina L-Like (*CatL*) de *T. vivax*.

As ampliações foram conduzidas em 50 µl de mistura de reação contendo 5 µl de tampão 10X; 2 µl (1,5 mM) de MgCl₂; 1 µl dos quatro dNTP's (200 mM de cada); 1 µl (100 pmol) de cada iniciador; 3,75 µl (7,5% da reação) de dimetil sulfóxido (DMSO); 1 µl (0,1 mg/mL) de soro albumina bovina (BSA); 0,25 µl (2,5 unidades) de Taq DNA polimerase; e 1 µl de DNA (aproximadamente 25 ng/µl).

As reações foram efetuadas em um termociclador Mastercycler DNA Engine da Eppendorf por 35 ciclos. Cada ciclo consistiu de um passo de desnaturação (94°C por 1 minuto), um passo de anelamento (65°C por 1 minuto), um passo de extensão (72°C por 1 minuto), seguido de 10 minutos de extensão final a 72°C. Para certificar-se de que não houve contaminação da PCR, como controle branco foi adicionada água ao invés de DNA, executando-se o mesmo procedimento.

DNA extraído do sangue de bovino infectado experimentalmente com *T. vivax* (depois de confirmado por sequenciamento), com parasitemia de 6×10^6 tripanosomas/ml de sangue, foi utilizado como controle positivo da reação. Como controle negativo, foi usado o DNA extraído do sangue de bezerros provenientes da EVZ/UFG, área livre de tripanosomose em bovinos.

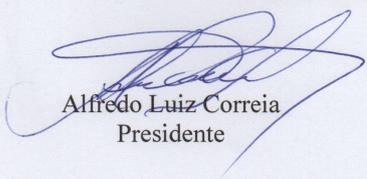
Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, o gel corado com brometo de etídio em tampão TBE pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA) e examinado em luz ultravioleta para verificar o tamanho dos fragmentos amplificados por comparação com marcadores de pesos moleculares de 100-pb DNA Ladder (Invitrogen).

ANEXO C. TERMO DE COMPROMISSO E APOIO FINANCEIRO

**TERMO DE COMPROMISSO**

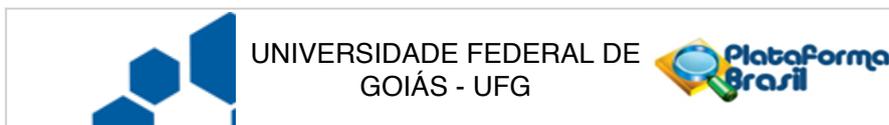
O Fundo para o Desenvolvimento da Pecuária em Goiás – FUNDEPEC- Goiás declara que em 28/03/2016, com aprovação unanime em reunião do Conselho de Administração, onde ficou definido que irá fornecer apoio financeiro na quantia de R\$ 62.682,00 ao projeto intitulado “ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E GENÉTICO DA TRIPANOSSOMOSE BOVINA POR *Trypanosoma vivax* NO ESTADO DE GOIÁS”.

Goiânia, 05 de maio de 2016



Alfredo Luiz Correia
Presidente

ANEXO D. PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E GENÉTICO DA TRIPANOSSOMOSE BOVINA POR *Trypanosoma vivax* NO ESTADO DE GOIÁS

Pesquisador: THIAGO SOUZA AZEREDO BASTOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55835516.9.0000.5083

Instituição Proponente: Escola de Veterinária e Zootecnia

Patrocinador Principal: FUNDO PARA O DESENVOLVIMENTO DA PECUARIA EM GOIÁS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.581.898

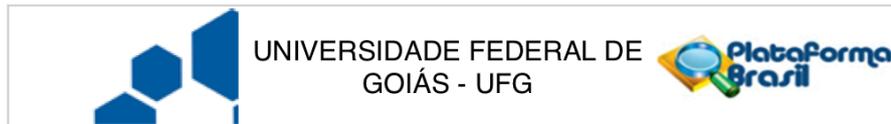
Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado que versa sobre a investigação da infecção pelo tripanossoma em bovinos. Tripanossomose bovina é uma doença causada por um protozoário que localiza-se no sangue de ruminantes e vem assumindo grande importância econômica no Brasil. Aqui no Brasil não existe o vetor biológico de *Trypanosoma vivax*, a transmissão do agente entre bovinos é atribuída a insetos como mutucas e mosca dos estábulos, além da transmissão pelo uso de equipamentos contaminados, como seringas e agulhas. Desde que foi detectada no Brasil, a tripanossomose bovina continua se disseminando pelo território nacional. Contudo, ainda não está esclarecido o comportamento do parasito nos rebanhos goianos e, apesar de haver algumas suspeitas, ainda não está esclarecida sua procedência. Por isso, torna-se fundamental a obtenção de informações sobre os aspectos clínico-epidemiológico deste parasito no estado e, na tentativa de buscar a fonte de infecção dos animais de Goiás, fazer a caracterização molecular dos isolados.

Objetivo da Pesquisa:

Realizar investigação epidemiológica em surtos de Tripanossomose bovina que for registrado no estado de Goiás, comparando diferentes métodos de diagnóstico e caracterizando molecularmente os isolados obtidos. Analisar os fatores de risco associado à infecção por *T. vivax*, bem como determinar o período de reaparecimento da parasitemia em bovinos, após estes serem tratados

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.581.898

com dose única Diaceturato de diminazene e com Cloridrato de cloruro de isometamidium.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No trabalho proposto será aplicado um questionário aos participantes. Esse questionário é relativamente simples e não muito longo, mas pode causar algum constrangimento, além de tomar tempo dos participantes. Esses fatores estão apontados nos riscos do projeto, bem como no TCLE.

Com relação aos benefícios, pretende -se desenvolver uma Tese de doutorado, bem como produzir artigos destinados à publicação em meio científico. As conclusões do trabalho serão divulgadas para os produtores rurais (participantes ou não do estudo) por meio de jornais e diários, o que poderá servir para orientá-los quanto aos riscos que este parasito traz ao rebanho, caso não sejam adotadas medidas de controle adequadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto esta bem apresentado e foi submetido a este CEP por causa do questionário que será aplicado aos participantes. O TCLE esta bem explicativo e com linguagem adequada e preconiza os itens necessários que devem estar contidos no mesmo. Com relação ao envolvimento animal, o projeto foi submetido ao CEUA .

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos necessários foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

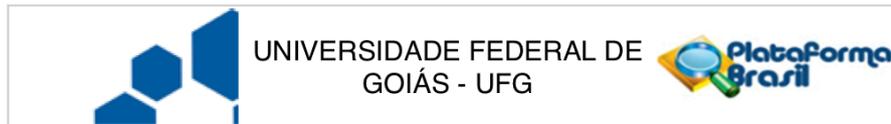
Após análise dos documentos postados, somos favoráveis à aprovação do presente protocolo de pesquisa, smj deste comitê

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para dezembro de 2017.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.581.898

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_704750.pdf	05/05/2016 18:02:22		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2_PROJETO_THIAGO_SOUZA.pdf	05/05/2016 18:01:40	THIAGO SOUZA AZEREDO BASTOS	Aceito
Folha de Rosto	1_Folha_de_rosto.pdf	05/05/2016 18:00:05	THIAGO SOUZA AZEREDO BASTOS	Aceito
Outros	6_Protocolo_CEUA.pdf	05/05/2016 17:56:33	THIAGO SOUZA AZEREDO BASTOS	Aceito
Outros	5_Questionario_Thiago.pdf	05/05/2016 17:55:19	THIAGO SOUZA AZEREDO BASTOS	Aceito
Declaração do Patrocinador	7_termo_de_financiamento.pdf	05/05/2016 17:53:16	THIAGO SOUZA AZEREDO BASTOS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	4_1_Termo_compromisso.pdf	05/05/2016 17:53:00	THIAGO SOUZA AZEREDO BASTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_TCLE_Ciencias_da_Saude_e_Biologicas.doc	05/05/2016 17:42:08	THIAGO SOUZA AZEREDO BASTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 09 de Junho de 2016

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com

ANEXO E. PARECER CEUA/UFG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 27 de junho de 2016.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 032/16

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino): Pesquisa - Doutorado

II - Identificação:

Título do projeto: "ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO E GENÉTICO DA TRIPANOSSOMOSE BOVINA POR *Trypanosoma vivax* NO ESTADO DE GOIÁS."

Pesquisador Responsável/ Unidade:

Nome completo	MARIA AUXILIADORA ANDRADE
Instituição	UFG / ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Departamento	Medicina Veterinária Preventiva
Vínculo com a Instituição	Professora Doutora
Telefone/-email	3521 15 27/maa@ufg.br
Currículo <i>lattes</i> (endereço)	http://lattes.cnpq.br/9441751521255467
Experiência prévia com a área da pesquisa (anos)	Orientação na área de Sanidade animal a çais de 10 anos
Função na Pesquisa	Orientação

Pesquisadores Participantes:

Nome/Endereço do Currículo Lattes	Instituição	Formação Básica	Titulação Mais Recente	Função na Pesquisa
THIAGO SOUZA AZEREDO BASTOS http://lattes.cnpq.br/2996614490112819	EVZ/UFG	Médico Veterinário	Aluno de Pós-Graduação (Doutorado)	Responsável pela execução do projeto
DARLING MELANY DE CARVALHO MADRID http://lattes.cnpq.br/9764670414124827	EVZ/UFG	Médica Veterinária	Aluno de Pós-Graduação (mestrado)	Colheita e processamento das amostras.
WELBER DANIEL ZANETTI LOPES http://lattes.cnpq.br/4480577038117234	EVZ/UFG	Médico Veterinário	Doutor	Colaborador

☐ **Unidade onde será realizado:** Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO.

☐ **Data de apresentação a CEUA:** 27/04/2016

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Objetivo:

"Realizar investigação epidemiológica em surtos de Tripanossomose bovina que for registrado no estado de Goiás, comparando diferentes métodos de diagnóstico e caracterizando molecularmente os isolados obtidos. Analisar os fatores de risco associado à infecção por *T. vivax*, bem como determinar o período de reaparecimento da parasitemia em bovinos, após estes serem tratados com dose única Diaceturato de diminazene e com Cloridrato de cloruro de isometamidium."

Objetivos específicos

"- Obter dados epidemiológicos de surtos de Tripanossomose bovina que forem registrados no Estado de Goiás.

- Diagnosticar o parasito a partir de métodos de diagnóstico parasitológico direto (Métodos de Woo, Método da gota espessa e pesquisa direta em extensão sanguínea corada com Giemsa) e, também, por métodos moleculares (PCR).

- Caracterizar molecularmente os isolados através de seqüenciamento genético.

- Avaliar a capacidade de o parasito causar doença depois de inoculado por via endovenosa, intramuscular, subcutânea e intradérmica, bem como os fatores de risco de infecção.

- Determinar o período de reaparecimento da parasitemia em bovinos tratados com 3,5 mg/kg Diaceturato de diminazene e com 0,5 mg/kg Cloridrato de cloruro de isometamidium.

- Dos dados obtidos, extrair inferências sobre a importância da adoção de medidas de prevenção e controle da tripanossomose em bovinos no estado de Goiás."

Justificativa:

"Tripanossomose bovina é uma doença causada pelo *Trypanosoma vivax*, um protozoário que localiza-se no plasma sanguíneo de ruminantes e vem assumindo grande importância econômica no Brasil. Em Goiás, o primeiro relato de detecção desta doença foi divulgado em maio de 2015.

Deste modo, por tratar-se de uma doença emergente em Goiás, ainda não se conhece os aspectos clínicos e epidemiológicos da enfermidade em questão nos rebanhos goianos. Por isso, pretende-se com este trabalho realizar investigação dos aspectos epidemiológicos e clínicos para melhor compreender o comportamento deste agente em Goiás, comparar diferentes métodos de diagnóstico, caracterizar molecularmente os isolados, bem como avaliar os fatores de risco associados à infecção por *T. vivax*. Concomitantemente, o presente estudo determinará o período de reaparecimento da parasitemia dos isolados goianos após tratamento com Diaceturato de diminazene e com Cloridrato de cloruro de isometamidium."

IV - Sumário do projeto:

☐ **Discussão sobre a não utilização de métodos alternativos e necessidade do número de animais:**

"Para melhor compreender o parasito, foram realizadas tentativas de cultura in vitro. Diferentemente de outros tripanossomatídeos, observou-se que para *T. vivax*, apesar de possível em alguns casos, está técnica não foi efetiva. De mesma forma, foram frustradas as tentativas de cultura in vivo, quando realizadas em ratos e coelhos. Portanto, o método que continua sendo adotado baseia-se no uso de bovinos."

☐ **Grau de Invasividade:** GI 1

VI - Parecer da CEUA:

Após apreciação dos documentos apresentados para atendimento das pendências listadas pela CEUA-UFG, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o *Relatório Final* baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até 30 de Março de 2017.

VII - Data da reunião: 27/06/2016

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

ANEXO F. PRIMEIRAS PÁGINAS DO DOCUMENTO CONTENDO AS NORMAS DA REVISTA "VETERINARY PARASITOLOGY"



VETERINARY PARASITOLOGY

An international scientific journal and the Official Organ of the [American Association of Veterinary Parasitologists \(AAVP\)](#), the [European Veterinary Parasitology College \(EVPC\)](#) and the [World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology \(WAAVP\)](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0304-4017

DESCRIPTION

The journal *Veterinary Parasitology* has an open access mirror journal, [Veterinary Parasitology: X](#), sharing the same aims and scope, editorial team, submission system and rigorous peer review.

This journal is concerned with those aspects of **helminthology**, **protozoology** and **entomology** which are of interest to **animal health** investigators, veterinary practitioners and others with a special interest in **parasitology**. Papers of the highest quality dealing with all aspects of disease prevention, pathology, treatment, epidemiology, and control of parasites in all domesticated animals, fall within the scope of the journal. Papers of geographically limited (local) interest which are not of interest to an international audience will not be accepted. Authors who **submit** papers based on local data will need to indicate why their paper is relevant to a broader readership.

Parasitological studies on **laboratory animals** fall within the scope of the journal only if they provide a reasonably close model of a disease of **domestic animals**. Additionally the journal will consider papers relating to **wildlife** species where they may act as disease reservoirs to domestic animals, or as a zoonotic reservoir. Case studies considered to be unique or of specific interest to the journal, will also be considered on occasions at the **Editors'** discretion. Papers dealing exclusively with the taxonomy of parasites do not fall within the scope of the journal.

Studies on rickettsial disease organisms (*Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Eperythrozoon*) will be considered for publication in *Veterinary Parasitology*, but only if the paper deals with vector transmission of these organisms to domesticated animals, or if zoonotic. Studies on *Rickettsia* per se will not be accepted.

Studies dealing with **parasite control** by means of natural products, both *in vivo* and *in vitro*, fall within the scope of the journal, but only if well documented and with therapeutically relevant minimum inhibitory concentrations of the active compound(s) being clearly demonstrated.

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for International Organizations of Medical Sciences. (Obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o W.H.O., Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland.)

AUDIENCE

Research Workers and Practitioners in veterinary medicine, Animal Health Investigators and others with a special interest in parasitology, veterinary pharmaceutical industry.

IMPACT FACTOR

2017: 2.422 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Elsevier BIOBASE
Helminthological Abstracts
MEDLINE®
Index Catalog of Medical and Veterinary Zoology
Index Veterinarius
Protozoological Abstracts
Veterinary Bulletin
Scopus
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
Referativnyi Zhurnal VINTI-RAN (Russian Academy of Sciences)

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

T de Waal, University College Dublin, Dublin, Ireland
A. Greer, Lincoln University NZ, Christchurch, New Zealand
M.K. Nielsen, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA
M.P. Reichel, City University of Hong Kong, Kowloon, Hong Kong

Book Review Editors

G. Baneth, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel
E. Papadopoulos, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

Editorial Advisory Board

Rodney Brown Besier, Albany, Western Australia, Australia
Frederic Beugnet, Lyon, France
Dwight Bowman, Ithaca, New York, USA
Luis Cardoso, Vila Real, Portugal
Edwin Claerebout, Merelbeke, Belgium
Matthew James Denwood, Copenhagen, Denmark
Philippe Dorchies, Toulouse, France
Pierre Dorny, Antwerpen, Belgium
Geoffrey Fosgate, Pretoria, South Africa
Caroline Frey, Saskatoon, Saskatchewan, Canada
Stanny Geerts, Antwerp, Belgium
Claudio Genchi, Milan, Italy
John Gilleard, Calgary, Alberta, Canada
Patricia Holman, College Station, Texas, USA
Dan Howe, Lexington, Kentucky, USA
Ikuo Igarashi, Obihiro, Japan
Anja Joachim, Vienna, Austria
Pikka Jokelainen, Copenhagen, Denmark
Ray Kaplan, Athens, Georgia, USA
Thomas Kennedy, Phoenix, AZ, USA
Andrew Kotze, St. Lucia, Queensland, Australia
David Lindsay, Blacksburg, Virginia, USA
Alan A. Marchiondo, Santa Fe, NM, USA
Marcelo Molento, Curitiba, Brazil
Jorge Morales-Montor, Mexico City, Mexico
Vinny Naidoo, Pretoria, South Africa