



Trypanosoma evansi e
Trypanosoma vivax

**Biologia, Diagnóstico e
Controle**

República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Bonifácio Hideyuki Nakasu
Dante Daniel Giacomelli Scolari
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Pantanal

Emiko Kawakami de Resende
Chefe-Geral

José Anibal Comastri Filho
Chefe-Adjunto de Administração

Aiesca Oliveira Pellegrin
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Robson Bezerra Sereno
Gerente da Área de Comunicação e Negócios

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pantanal
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Trypanosoma evansi e Trypanosoma vivax

Biologia, Diagnóstico e Controle

Roberto Aguilar Machado Santos Silva
Andrew Seidl
Laura Ramirez
Alberto Martín Rivera Dávila

**Corumbá, MS
2002**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pantanal

Rua 21 de Setembro, 1880, CEP 79320-900, Corumbá, MS

Caixa Postal 109

Fone: (67) 233-2430

Fax: (67) 233-1011

Home page: www.cpap.embrapa.br

Email: sac@cpap.embrapa.br

Comitê de Publicações:

Presidente: Aiesca Oliveira Pellegrin

Secretário Executivo: Marco Aurélio Rotta

Membros: Balbina Maria Araújo Soriano

Evaldo Luis Cardoso

José Robson Bezerra Sereno

Secretária: Regina Célia Rachel dos Santos

Supervisor editorial: Marco Aurélio Rotta

Revisora de texto: Mirane dos Santos Costa

Normalização Bibliográfica: Romero de Amorim

Tratamento de ilustrações: Regina Célia R. dos Santos

Foto da capa: Robeto Aguilar M.S. Silva

Editoração eletrônica: Regina Célia R. dos Santos

1ª edição

1ª impressão (2002): formato digital

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Catálogo na Publicação (CIP)

Embrapa Pantanal

Trypanosoma evansi e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle / Roberto Aguilar Machado Santos Silva ... [et al.]. – Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.

141 p. : il. ; 22 cm.

ISBN:?

1. *Trypanosoma evansi* - Biologia - Diagnóstico. 2. *Trypanosoma vivax* – Biologia - Diagnóstico. I. Silva, Roberto Aguilar Machado Santos. II. Seidl, Andrew. III. Ramirez, Laura. IV. Dávila, Alberto Martin Rivera. V. Título.

636.086962 (21 ed)

© Embrapa 2002

Autores

Roberto Aguilar Machado Santos Silva

Médico Veterinário, M.Sc. em Patologia Animal
Pesquisador da Embrapa Pantanal,
Rua 21 de setembro, 1880, Caixa Postal 109
CEP 79320-900, Corumbá, MS
Telefone (67) 233-2430
rsilva@cpap.embrapa.br

Andrew Seidl

Department of Agricultural and Resources Economics
Colorado State University
Fort Collins, Colorado 80523-1172
Estados Unidos da América

Laura Ramirez

Bióloga
Alameda Cordolina, 571 -
79333-082 Corumbá, MS

Alberto Martín Rivera Dávila

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz
Av. Brasil 4365
Rio de Janeiro, RJ
CEP 21045-900
Internet: <http://www.darwin.fiocruz.br>
Email: davila@fiocruz.br

Os autores agradecem a Eliney Gaertner pela confecção dos desenhos dos tripanosomas. Também agradecemos o auxílio de Ernande Ravaglia e Maria Davina dos Santos.

Apresentação

A tripanosomose animal constitui um sério problema sanitário na maioria dos países tropicais onde ela ocorre sendo muitas vezes necessário a utilização de drogas para o seu controle. Na América do Sul, Central e Caribe ela causa significativa prejuízo a indústria pecuária. A tripanosomose eqüina, causada pelo protozoário *Trypanosoma evansi* é uma doença secularmente conhecida como Mal de Cadeiras no Pantanal Matogrossense e outras áreas inundáveis do Brasil e América Latina. Este protozoário teve sua origem no continente africano e foi introduzida nas Américas pelos primeiros colonizadores europeus. Desde então tem causado inúmeros surtos com muitas mortes de eqüinos, resultando em elevados prejuízos aos sistemas pecuários extensivos que dependem do cavalo para o seu manejo. A tripanosomose bovina, causada pelo *Trypanosoma vivax*, também de origem africana, foi introduzida nas Américas no século 19 por colonizadores europeus. Sua introdução gerou muita preocupação dos produtores e defesa sanitária animal em diversos países do continente Sul Americano e ilhas do Caribe. O impacto econômico de sua ocorrência ainda esta em estudo, bem como sobre a sua epizootiologia.

Esta publicação veio suprir uma lacuna representada pela falta de informações, principalmente relacionada a epizootiologia das tripanosomoses bovina e eqüina, no Pantanal e áreas úmidas da Bolívia. Esta obra resultou do esforço de varias instituições que dedicaram-se ao estudos desses parasitas.

Esperamos que esse trabalho venha colaborar para que nossas pesquisas e métodos de controle venham contribuir para reduzir as perdas econômicas decorrentes destas enfermidades.

Emiko Kawakami de Resende
Chefe Geral da Embrapa Pantanal

Prefácio

Esta publicação representa o trabalho de pesquisa de mais dez anos, milhares de contatos com pesquisadores do Brasil e exterior, duas conferências internacionais virtuais e muitas viagens de investigação pelo interior do Pantanal e da Bolívia. Muitas das informações contidas não são encontradas em livros convencionais, pois elas resultaram das experiências vivenciadas pelos autores e de inúmeras trocas de correspondências e discussões via internet com especialistas no assunto. Esta publicação procurou fornecer informações sobre a biologia, epizootiologia e controle das tripanosomoses bovinas e eqüinas no Pantanal brasileiro e áreas úmidas da Bolívia levantadas pelos autores e outros que também desenvolveram pesquisas na região.

Agradecemos a todos aqueles que contribuíram na obtenção das informações no campo e no laboratório em especial a Ernandes Ravaglia, Maria Davina dos Santos e Francisco Rodrigues (“Chiquinho”). Aos colegas veterinários Dr. Carlos Sahib, Mario S. J. Ferreira e Eduardo (Agropan) pelos inúmeros surtos que ajudaram a investigar; aos colegas bolivianos do Colégio de Médico Veterinários de Santa Cruz de la Sierra, a Federación de Ganaderos de Santa Cruz de la Sierra (FEGASACRUZ) e do Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario (LIDIVET). Também expressamos o nosso reconhecimento e gratidão as colegas Dra Aiesca Pellegrin pelo incentivo nas horas mais difíceis, a Regina Célia Raquel pela infundável paciência na organização do manuscrito e da publicação, a Eliney Gaertner pelas ilustrações e ao Dr. Roy Melendez pelos esfregaços de *T. vivax* que deram origem à ilustração da capa.

Por fim somos muito gratos aos Diretores e Colegas da Embrapa Pantanal que pela amizade e carinho com que me receberam e me ensinaram ter amor por essa terra.

Roberto Aguilar Machado Santos Silva
Pesquisador

Sumário

Introdução	19
Objetivo	22
1. Tripanosomoses	22
2. Taxonomia	23
3. Morfologia.....	24
4. Ciclo vital.....	24
5. Terminologia utilizada para os tripanosomas baseada no <i>Trypanosoma brucei</i>	28
6. Manutenção dos Tripanosomas	31
7. Variação molecular em Tripanosomas	39
8. Ecologia e sociologia da variação antigênica.....	44
9. Genética de populações de Tripanosomas.....	47
10. Diagnóstico.....	50
11. Caracterização molecular.....	71
12. Métodos de controle.....	88
13. Resistência à drogas.....	93
14. Avaliação do uso do tratamento profilático estratégico ou curativo.....	96
15. Quimioterapia da Tripanosomose por <i>Trypanosoma evansi</i> (tratamento curativo).....	97
16. Quimioterapia da Tripanosomose por <i>Trypanosoma vivax</i> (tratamento curativo).....	99
17. Controle estratégico do <i>Trypanosoma evansi</i> através do uso de drogas tripanocidas.....	100
18. Controle estratégico do <i>Trypanosoma vivax</i> através do uso de drogas tripanocidas.....	100
19. Comparação do Isometamidium e Brometo de Homidium como droga profilática.....	101
20. Mecanismos experimentais de liberação lenta contendo Brometo de Homidium e Isometamidium.....	101
21. Análise econômica	107
22. Controle dos vetores.....	114
23. Controle através do uso de inseticidas	116
24. Piretroides	118
25. Utilização de armadilhas impregnadas com inseticidas.....	122
Referências bibliográficas	123
Anexos	137

Lista de Figuras

1. Principais organelas do tripanosoma. C: Cinetoplasto; N:Núcleo; F: Flagelo. (*Trypanosoma vivax*) 25
2. Multiplicação na corrente circulatória de tripanosomas..... 25
3. Medidas dos tripanosomas. L: Comprimento total (incluindo o flagelo livre); PK: Distância do final da extremidade posterior ao cinetoplasto; KN: do cinetoplasto ao meio do núcleo; PN: do final da extremidade posterior ao meio do núcleo; NA: do meio do núcleo ao final da extremidade anterior; F: comprimento do flagelo livre; K: Cinetoplasto. Baseado em Hoare (1972). *Trypanosoma vivax* : forma tripomastigota em sangue de bovino (surto ocorrido no Pantanal do Poconé, 1995)..... 50
4. *Trypanosoma vivax* encontrado no sangue de bovinos naturalmente infectados no Pantanal de Poconé, MT, Brasil..... 52
5. *Trypanosoma evansi* encontrado no sangue de cavalos naturalmente infectados no Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil..... 52
6. Distribuição estacional de tabanídeos coletados em cavalos no Pantanal, Brasil, de junho/92 a maio/93 78
7. Bovinos do departamento de Santa Cruz de la Sierra encontrados infectados com *Trypanosoma vivax* em 1996..... 84
8. Localização dos surtos de *Trypanosoma vivax* na Bolívia (Mapa 1 e 2) no departamento de Santa Cruz de la Sierra (Mapa 3). 1: Províncias de Nuflo de Chavez e Guarayos; 2: Província de Velasco; 3. Província de Chiquitos; 4. Província de Herman Bush 86
9. Localização dos surtos de *Trypanosoma vivax* no Pantanal. Mapa 1: Localização do Estado do Mato Grosso do Sul; Mapa 2: Sub-regiões do Pantanal e localização dos surtos..... 87

Lista de Tabelas

1. Medidas biométricas (μm) do <i>Trypanosoma vivax</i> encontrado na América Latina	53
2. Medidas biométricas (μm) do <i>Trypanosoma evansi</i> encontrado na América do Sul e Índia	55
3. Iniciadores específicos para a detecção de tripanosomas <i>Salivaria</i>	66
4. Compostos quimioterapêuticos e quimioprolifáticos existentes no mercado internacional, usados para a tripanosomose animal (Peregrine, 1994)	90
5. Produtos usados no tratamento das tripanosomoses por <i>Trypanosoma evansi</i> e <i>Trypanosoma vivax</i> disponíveis no mercado brasileiro	91
6. Dosagem recomendada pelo fabricante para a aplicação do Trypamidum.....	103
7. Dosagem recomendada pelo fabricante para a aplicação do Cymelarsan®.	105
8. Dosagem recomendada pelo fabricante para a aplicação do Novidium ®	106
9. Dosagem recomendada pelo fabricante para a aplicação do Ethidium®	107
10. Características da fazenda usada no exemplo	109
11. Taxa anual esperada de infecção e perdas de animais	109
12. Custo anual esperado do tratamento (em R\$).	111
13. Custo anual esperado das alternativas estratégicas sob risco variável	112
14. Investimento anual esperado para a razão do retorno da alternativa estratégica	113

Lista de Anexos

I. Soluções.....	137
II. Lista dos fornecedores de drogas contra a Tripanosomose	139

Introdução

As doenças parasitárias têm atormentado o homem e seus animais domésticos desde os tempos mais remotos. Hoje no mundo muitas nações têm controlado essas doenças dentro de suas fronteiras, porém os mesmos parasitas continuam causando mortes entre os países menos desenvolvidos. Frequentemente um ciclo vicioso é estabelecido: uma economia deficiente impede que se produza educação e medidas sanitárias eficientes e isto torna um povo continuamente susceptível a infecções parasitárias. A morbidade e a mortalidade resultante das doenças causadas por protozoários representam ainda hoje um formidável desafio à pesquisa científica e aos programas de saúde pública e animal.

A imensa biodiversidade do planeta não é igualmente distribuída em sua superfície. Sabe-se que cerca de 60% de toda a biodiversidade biológica se encontra em apenas 1,44% da superfície da terra, e nessa pequena área se encontram 44% das espécies de plantas vasculares e 35% dos vertebrados não peixes. Os trópicos representam hoje as maiores reservas mundiais de biodiversidade. A biodiversidade além de representar um recurso genético de valor inestimável, também contribui para a ocorrência de grande número de doenças. Os ambientes tropicais, onde geralmente o calor e a umidade são elevados, propiciam meios ideais ao desenvolvimento de microorganismos patogênicos e seus vetores.

Segundo Perry et al (2002), as doenças de animais continuam afetando a produção pecuária, desenvolvimento agropecuário, o bem estar humano e a luta contra a pobreza de diferentes maneiras em muitas regiões dos países em desenvolvimento. Algumas dessas doenças afetam as regiões mais pobres, afetando a população humana, ocasionando mortes e inclusive incapacidade e sofrimento, criando assim uma barreira para o escape da pobreza. Segundo os mesmos autores, as tripanosomoses se encontram localizadas na lista das 20 doenças mais importantes de acordo com seu impacto na pobreza. Febre aftosa, antrax, ectoparasitas, fasciolosis entre outras doenças se encontram incluídas na mesma lista. Adicionalmente as tripanosomoses se encontram entre as 10 zoonoses mais importantes junto

com o antrax, tuberculose bovina, bruceloses, cisticercose, leptospirose, entre outros.

As tripanosomoses são causadas por espécies do gênero *Trypanosoma* que pertencem ao filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida. Por sua vez, esta ordem se encontra dividida em 2 sub-ordens: Bodonina e Trypanosomatina. A característica principal destes protozoários é a presença da organela chamada “cinetoplasto” localizada na base do flagelo, que contém o DNA mitocondrial (Vickerman 1976). Existem ainda outras duas características únicas encontradas nos Kinetoplastida examinados até agora: a compartimentalização da glicólise dentro de um microcorpo chamado “glicosoma” (Michels & Hannaert 1994), e o “trans-splicing” de uma seqüência curta e conservada de RNA chamada “spliced leader” ou “mini-exon”.

A subordem Trypanosomatina contém uma única família, Trypanosomatidae, que por sua vez contém oito gêneros (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Phytomonas*).

Os tripanosomas patogênicos de importância pecuária se encontram todos localizados na seção Salivaria, dos quais apenas *Trypanosoma vivax*, *T. equiperdum* e *T. evansi* podem ser encontrados na América do Sul.

Enquanto a taxonomia destes protozoários flagelados tem sido cada vez mais acurada nos últimos tempos, a origem e evolução dos mesmos são ainda pouco conhecidas. Na falta de registros fósseis, a evolução dos Kinetoplastida tem sido bastante especulativa. Entretanto, com o uso das ferramentas modernas e informações genéticas, atualmente está se começando a inferir quais poderiam ter sido seus ancestrais.

Um dos primeiros a especular sobre as relações filogenéticas dos tripanosomas foi Leger (1904), sugerindo que seus ancestrais teriam sido parasitas monogenéticos de insetos não hematófagos. Quase sessenta anos mais tarde, Baker (1963) sugeriu uma filogenia na qual um tripanosomatídeo ancestral deu origem a dois grupos: o primeiro contendo linhagens transmitidas por insetos (tripanosomas de crocodilos, aves e mamíferos, excluindo o grupo dos “Salivaria”), e o segundo contendo espécies transmitidas por sanguessugas (tripanosomas de peixes, anfíbios e répteis aquáticos). Os tripanosomas africanos teriam então divergido da linhagem dos vertebrados aquáticos transmitidos pela

sanguessuga. Esta hipótese foi compartilhada por Woo (1970). Adicionalmente, Hoare (1972) propôs que a seção *Salivaria* teria originado recentemente a partir dos tripanosomas *Stercoraria*.

Uma segunda hipótese para a origem dos Kinetoplastida foi proposta originalmente por Minchin (1908), que sugeriu que os ancestrais dos tripanosomatídeos teriam parasitado inicialmente o intestino de antigos vertebrados aquáticos. O sangue teria sido invadido logo após e subsequentemente, estes tripanosomatídeos teriam passado para as sanguessugas e insetos hematófagos. Estes, por sua vez, teriam espalhado os parasitas nos diferentes grupos de vertebrados, terrestres e aquáticos. Esta hipótese recebeu mais tarde apoio de diferentes grupos (Lavier 1943, Wallace 1966, Lainson & Shaw 1987)

Análises preliminares da filogenia molecular dos Kinetoplastida, usando genes ribossomais (rDNA) sugeriram que a origem dos tripanosomas era parafilética (Marche et al. 1995, Berchthold et al. 1994). Por outro lado, as comparações dos aminoácidos dos genes de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Wiemer et al., 1995) ou seqüências que codificam para outras proteínas (Hashimoto et al. 1995, Alvarez et al. 1996, Haag et al. 1998) sugeriram monofilia das seções *Salivaria* e *Stercoraria*.

Recentemente, um estudo completo envolvendo um maior número de gêneros dos Kinetoplastida concordou com a monofilia dos tripanosomas (Stevens & Gibson 1999, Wright et al. 1999). As estimativas da divergência dos *Salivaria* são de 335 (Haag et al. 1998) e 100 milhões de anos (Stevens & Gibson 1999), o que colocaria a origem destes tripanosomas na época em que os continentes estavam juntos (Pangea) ou na época em que a África se separou dos outros continentes, respectivamente. Finalmente, Overath et al. (2001) sugeriram que os *Salivaria* apareceram originalmente em répteis, os vertebrados dominantes na época em que estes tripanosomas divergiram. A transferência de répteis para mamíferos teria acontecido quando as moscas tsé-tsé ou seus ancestrais surgiram.

Objetivo

A escassez de informações sobre as tripanosomoses de importância econômica nas Américas é preocupante pois com a globalização da economia e a formação de blocos econômicos como o Mercosul a tendência é ocorrer uma maior comercialização de animais entre os países sul-americanos e com isso uma maior expansão dessas enfermidades. Esta publicação tem por objetivo suprir a ausência de livros técnicos-científicos sobre tripanosomose animal no mercado editorial de língua portuguesa.

1. Tripanosomoses

Segundo Finelle (1974) a tripanosomose conduz a uma considerável sub-exploração dos recursos naturais e um baixo nível de produção animal. O mesmo autor apontou conseqüências diretas e indiretas da tripanosomose animal. As diretas são representadas por : 1- Perdas econômicas, que compreendem a mortalidade e a doença a qual se manifesta por emaciação, retardo do crescimento, aborto, esterilidade temporária e lesões orgânicas; 2- Gastos com o seu controle devido a custos de diagnósticos, tratamento de animais infectados, profilaxia e pesquisa sobre o controle da doença. As conseqüências indiretas afetam: 1- A saúde humana pela diminuição na produção de carne e leite que causam deficiências protéicas, as quais são particularmente danosas às crianças; 2- A agricultura devido a perda de animais de tração; 3- A produção pecuária pois a tripanosomose limita a possibilidade da introdução de reprodutores de raças exóticas nas áreas de produção pecuária e também impedem que algumas áreas sejam utilizadas o ano todo devido às variações sazonais na incidência da doença; e 4- A economia, por causa do déficit na produção de carne e leite que fazem com que as regiões ou os países sejam obrigados a importar esses produtos.

2. Taxonomia

Todos os hemoflagelados pertencem a família *Trypanosomatidae*. Baseado no modo de transmissão, Hoare (1972) e Losos (1986) concordaram na divisão do gênero *Trypanosoma* em duas seções: "*Salivaria*" e "*Stercoraria*". Os tripanosomas da seção *Salivaria* são aqueles transmitidos através das glândulas salivares (inoculativa), e os *Stercoraria* aqueles que são transmitidos por meio das fezes dos insetos vetores (contaminativa). Nessas revisões, esses autores concordaram também na divisão da seção *Salivaria* em quatro subgêneros (*Duttonella*, *Pycnomonas*, *Nannomonas* e *Trypanozoon*) e a seção *Stercoraria* em três subgêneros (*Herpetosoma*, *Megatrypanum* e *Schizotrypanum*). Losos (1986) sugere uma classificação prática dos tripanosomas de importância médica e veterinária, como se segue:

Salivaria

Subgênero *Duttonella*

Espécie: *Trypanosoma vivax*

Subgênero *Nannomonas*

Espécies: *Trypanosoma congolense*, *T. simiae*

Subgênero *Trypanozoon*

Espécies: *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense*, *T. gambiense*, *T. evansi* e *T. equiperdum*

Subgênero: *Pycnomonas*

Espécie: *Trypanosoma suis*

Stercoraria

Subgênero *Schizotrypanum*

Espécie: *Trypanosoma cruzi*

3. Morfologia

3.1. Aparência Externa

As formas tripomastigotas encontradas na corrente sanguínea são basicamente lancetadas, o corpo é alongado e achatado. Ao corte transversal apresenta-se elíptico ou oval e suas extremidades são afiladas. A extremidade pela qual avança durante a locomoção é costumeiramente descrita como anterior final. Ela tipicamente termina em um fino ponto, enquanto que o final da extremidade posterior varia na forma, mas geralmente é mais larga, afinando mais abruptamente ou terminando em uma forma rombuda ou ainda apresentando a ponta arredondada.

3.2. Citologia

As principais organelas de um tripanosoma são o núcleo, o cinetoplasto, o sistema mastigonte representado pelo corpo basal e o flagelo.

3. 2.1. Multiplicação

Em todos os casos a divisão dos tripanosomas se processa em uma seqüência definitiva envolvendo sucessivamente o corpo basal, flagelo, cinetoplasto e núcleo, culminando na clivagem do citoplasma.

4. Ciclo vital

Membros do gênero *Trypanosoma* são parasitas digenéticos, aqueles cujo ciclo vital envolve dois hospedeiros. Um destes, um animal vertebrado é o hospedeiro final, enquanto diversos invertebrados hematófagos representam os hospedeiros intermediários ou vetores, os quais transmitem a infecção para novos hospedeiros vertebrados. Na literatura, alguns autores preferem usar o termo “inoculadores mecânicos” em vez de “vetores” para se referir a transmissão mecânica de tripanosomas.

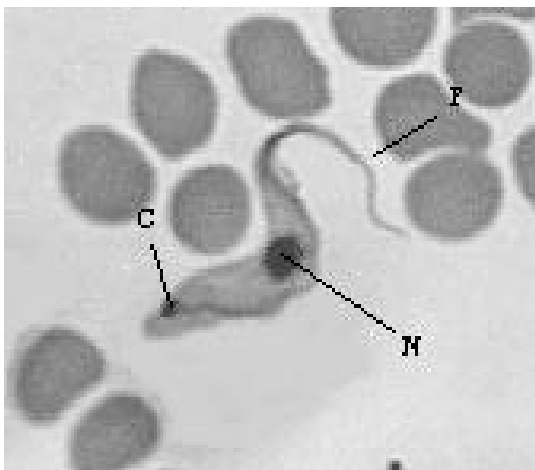


Fig. 1. Principais organelas do tripanosoma. C: Cinetoplasto; N: Núcleo; F: Flagelo. (*Trypanosoma vivax*).

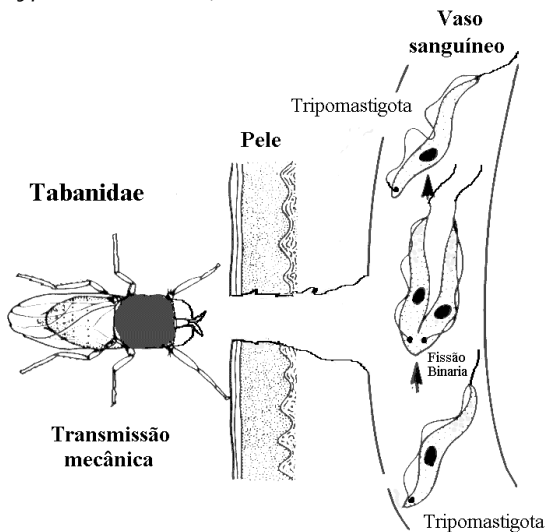


Fig. 2. Multiplicação na corrente circulatória de tripanosomas.

No caso de tripanosomas de mamíferos os vetores mais conhecidos são insetos hematófagos, embora outros invertebrados hematófagos podem também atuar como vetores. As formas sanguíneas dos tripanosomas são tomadas pelo inseto durante repasto sanguíneo. Após, então, os tripanosomas empreendem um ciclo de desenvolvimento no hospedeiro intermediário, culminando na produção de formas infectivas especiais, conhecidas como tripanosomas metacíclicos ou metatripanosomas. Os tripanosomas metacíclicos são transmitidos para um novo hospedeiro por vários métodos, de acordo com a sua localização no vetor.

O sucesso na transmissão pode normalmente ser efetuada somente após o parasita ter completado seu ciclo de desenvolvimento no hospedeiro intermediário e produzido os metatripanosomas. Os estágios intermediários no vetor não são infectivos para o hospedeiro vertebrado. No caso da transmissão mecânica, as formas sanguíneas dos tripanosomas são transferidas diretamente de um mamífero, para outro, por insetos hematófagos (p.ex. espécies de *Tabanidae* e *Somoxydae*) (Fig. 2) ou artificialmente por agulhas contaminadas com sangue infectado. No caso da transmissão mecânica com agulhas, pode-se dizer também que é uma infecção com ação de veículo. Em contraste com a transmissão cíclica, que pode ser tão longa quanto for a vida do vetor, a habilidade para transmitir os tripanosomas mecanicamente é de curta duração (geralmente mensuradas em minutos), dependendo da sobrevivência dos parasitas nas peças bucais do inseto.

4.1. Estágios de Desenvolvimento

No curso de seu ciclo vital digenético os tripanosomas passam por vários estágios de desenvolvimento, os quais têm sido definidos por termos derivados do gênero dos *Trypanosomatidae* dos quais eles representam as formas mais típicas.

A principal característica distinguindo os estágios morfológicos dos *Trypanosomatidae* é a disposição do flagelo no corpo, como determinado pelo seu ponto de partida (indicado pela posição do Cinetoplasto), seu curso e ponto de emergência de sua porção distal livre. Desde então esta característica "flagelar" serviu como base para a classificação do estágio em questão. A raiz - mastigota é um termo grego que significa chicote.

A terminologia abaixo citada é utilizada por Hoare (1972) e mundialmente aceita :

- (a) AMASTIGOTA. Estágio "Leishmanial", representado por formas arredondadas ou alongada, sem flagelo livre.
- (b) ESFEROMASTIGOTA. Arredondada ("Leishmanial") possuindo um flagelo livre; representando um estágio transitório entre as formas amastigota e mastigotas.
- (c) PROMASTIGOTA. Estágio "Leptomonada", representado por formas alongadas com um cinetoplasto antenuclear. Flagelo aparecendo próximo ao cinetoplasto e emergindo no final da extremidade anterior do corpo.
- (d) OPISTOMASTIGOTA. Estágio "Tripanomórfico", representado (somente no gênero *Herpetomonas*) por formas alongadas com cinetoplasto pós-nuclear. Flagelo aparecendo próximo ao cinetoplasto, então passando através do corpo e emergindo no final da extremidade anterior.
- (e) EPIMASTIGOTA. Estágio "Critidial", representado por formas alongadas com cinetoplasto justanuclear. O flagelo aparece próximo ao cinetoplasto e emerge ao longo do corpo para correr ao longo da sua superfície ou ao longo da membrana ondulante.
- (f) TRIPOMASTIGOTA. Verdadeiro estágio "Trypanosoma", representado por formas alongadas com cinetoplasto pós-nuclear. O flagelo surge próximo ao cinetoplasto e emerge ao lado do corpo para correr ao longo da sua superfície ou membrana ondulante.
- (g) COANOMASTIGOTA. Estágio peculiar, geralmente com cinetoplasto antenuclear. O flagelo surgindo de um reservatório com formato de funil e emergindo no final da extremidade anterior do corpo (restrito ao gênero *Crithidia*).

4.2. Ciclo no Mamífero

O desenvolvimento dos tripanosomas nos hospedeiros mamíferos é relativamente simples. É iniciado pela introdução de metatripanosomas pelo inseto hospedeiro, ou passivamente pela contaminação de membranas mucosas do hospedeiro mamífero ou pele (no caso de espécies *Stercoraria* como o *T. cruzi*) ou ativamente pela inoculação

através de uma picada (no caso de espécies *Salivaria*, como por exemplo *T. evansi* e *T. vivax*).

4.3. Seção *Salivaria*

A reprodução desta seção normalmente toma lugar na corrente circulatória por fissão binária no estágio tripomastigota.

Os tripanosomas da seção *Salivaria* também são capazes de invadir tecidos dos seus hospedeiros, sendo regular a ocorrência de amastigotas e outros estágios.

4.4. Ciclo No Inseto

Os tripanosomas *Salivaria T. evansi* e *T. vivax* encontrados na América do Sul são apenas transmitidos mecanicamente. Devido a perda da habilidade de se desenvolver ciclicamente, *T. evansi* é também transmitido mecanicamente na África. O *T. vivax* africano é transmitido ciclicamente pelas moscas tse-tse. As formas sanguíneas de tripanosomas do hospedeiro infectado são ingeridas pela tse-tse e localizadas no esôfago e faringe (Moloo & Gray, 1989) onde se transformam em formas epimastigotas. Depois de 24 horas as formas epimastigotas migram em direção ao canal alimentar onde se multiplicam intensivamente e se localizam nas paredes do labro. As formas epimastigotas migram depois em direção à hipofaringe onde se transformam em formas tripomastigotas, e depois em formas infectantes, também chamadas "metatripanosomas".

5. Terminologia utilizada para os tripanosomas baseada no *Trypanosoma brucei* (Who, 1986)

5.1 Termos associados à Taxa

Espécies - Um conjunto de organismos que podem ser distinguidos de outras espécies por um ou mais caracteres morfológicos estáveis e/ou descontínuos.

Sub-espécies - Conjuntos de organismos dentro de uma espécie que não podem ser separados um do outro por caracteres morfológicos, mas sim por outros caracteres estáveis. Nota: Quando o material é definido ao nível de sub-espécie, um tipo de material vivo poderia ser depositado numa chamada coleção estabilizada para futura referência.

5.2 Termos sem implicações na caracterização

Os seguintes termos não estão implicados na caracterização, porém alguns deles podem também ser usados para denotar alguns materiais caracterizados.

Clone - Os tripanosomas derivados de um único indivíduo. Nota: Não pode se esperar conservação da uniformidade genética de um clone por contínuas passagens *in vitro* ou *in vivo*.

Linha - Um derivado de laboratório de um estoque mantido em diferentes condições físicas ou em diferentes localidades geográficas. Nota: A expressão "condições físicas diferentes" abrange diferentes espécies animais bem como diferentes meios de cultura.

População - Grupo de tripanosomas presentes em um dado momento em uma cultura ou hospedeiro determinado. Nota: (1) Pode consistir de uma mistura de várias espécies e sub-espécies. (2) O termo pode ser qualificado por um adjetivo se é requerida uma descrição adicional.

Isolado Primário - Organismos viáveis presentes (a) em uma cultura ou em um animal experimental após inoculação de uma amostra ou parte dela obtida de um hospedeiro naturalmente infectado ou (b) em um estabilizado obtido também a partir de um hospedeiro naturalmente infectado. Nota: Pode consistir de uma mistura de várias espécies e sub-espécies.

Amostra - A parte de uma população de tripanosomas coletada em uma única ocasião.

Estabilizado - Uma amostra criopreservada de tripanosomas viáveis.

Stock (estoque) - População derivada por passagens seriadas *in vivo* e/ou *in vitro* a partir de um isolado primário, sem qualquer implicação de homogeneidade ou caracterização. Nota: Estoques derivados em diferentes momentos a partir de um único isolado primário podem ser diferentes.

5.3. Termos que implicam caracterização

Dema - População de tripanosomas que diferem de outras da mesma espécie ou sub-espécie em relação a uma propriedade específica ou um grupo de propriedades. Notas: Os prefixos podem ser acrescentados a esse termo para designar qualidades similares, exemplo: serodema, zimodema, esquizodema, nosodema.

Esquizodema - Todas as populações de tripanosomas tendo padrões de restrição de DNA similares.

Serodema - Todas as populações de tripanosomas expressando repertórios de VATs similares.

Nosodema - Todas as populações de tripanosomas causando padrões clínicos de doença similares.

Zimodema - Todas as populações de tripanosomas mostrando padrões de isoenzimas similares.

Tipo Antigênico Variável (VAT) - A identidade de um único tripanosoma metacíclico ou sangüíneo como determinado pela sua glicoproteína variável de superfície (VSG).

VAT de formas sangüíneas (bVAT) - VAT expressado por um tripanosoma no hospedeiro mamífero.

VAT predominante - bVAT que tende a surgir em um estágio precoce da infecção. Nota: VATs inoculados por seringa ou por mosca tse-tse se desenvolveram primeiro, independente de se eles serão predominantes ou não.

VAT de referência - Um VAT caracterizado e criopreservado usado como ponto de referência.

VAT repertório - Todos os VATs que podem ser expressados por um clone. Notas: (1) mVATs e bVATs predominantes são as principais partes características do repertório. (2) VATs repertórios similares são ditos pertencerem ao mesmo serodema.

VAT metacíclico (mVAT) - VAT expressado por um tripanosoma metacíclico.

Hetero-VAT - VAT heterólogo que surge dentro de um clone expandido.

Homo-VAT - VAT específico da maioria dos tripanosomas em um clone, sendo idêntico aquele do organismo único original.

6. Manutenção dos Tripanosomas

6.1 Cultura

6.1.1. Cultura do *T. evansi*

O *T. evansi* pode ser mantido em cultura contendo “feeder cells” ou culturas axênicas.

Método usado por C.A. Ross e A.M. Taylor para adaptação do T. evansi à cultura celular (CTVM, 1991):

Introduz-se pequenas quantidades (< 10 µl) de sangue de camundongo infectado diretamente nas culturas de fibroblastos de embrião de *Microtus montanus* em microplacas com 24 poços. Esse procedimento minimiza o tempo que os parasitas gastariam fora de um meio nutricionalmente adverso. Isto e outros aperfeiçoamentos que possam ser adicionados ao meio contribuem para o sucesso do estabelecimento de isolados in vitro e também na redução do tempo tomado por esses isolados para serem mantidos axenicamente sem feeder cells de mamíferos. Tripanosomas em divisão cultivados em microplacas contendo feeder cells podem ser subcultivados alguns dias após a sua coleta do camundongo em meio axênico. A adaptação dos parasitas para cultura em ambos meios com feeder cells e axênico pode ser realizada simultaneamente. Nem todos os estoques se adaptam bem à cultura.

•Algumas melhorias que podem auxiliar no estabelecimento das culturas:

- Adição do agente redutor monotioglicerol, para proteger os tripanosomas da lise oxidativa.
- Adição do aminoácido L-cisteína que é rapidamente ingerido pelos tripanosomas e atua na síntese de proteínas.
- Desde que a cisteína é rapidamente oxidada rotineiramente na cultura é necessária a adição de sulfanato de batocuproína.

- A adição destes três compostos suporta o crescimento da maioria dos estoques a uma densidade superior a 1×10^6 tripanosomas/ml.

- A adição de glicose a concentração de 0,1% ao meio é importante porque as formas sanguíneas usam a glicose quase que exclusivamente como fonte de energia.

Os tripanosomas crescem em meios de cultura padrão como o MEM Eagle suplementado com 10 a 15% de soro de equino, aminoácidos não essenciais $100\mu\text{M}$ de tioglicerol, $100\mu\text{M}$ de L-cisteína, $100\mu\text{M}$ de BCS e 0,1% de glicose. O meio deve ser trocado 3 vezes por semana.

6.1.1.2. Método de cultura simples

De acordo com Zywegarth et al (1989) um método simples e rápido para iniciar culturas com formas sanguíneas de *T. evansi* é como segue:

I. Meio de cultura

- a) RPMI suplementado com bicarbonato de sódio com a concentração final de 8,9 mM.
- b) soro inativado de equino..... 20%
- c) meio Leibovitz L-15.....10%
- d) Mercaptoetanol.....0,2mM
- e) Penicilina.....100 UI/ml
- Estreptomicina.....100 μg /ml
- Hhipoxantina..... 0,1 mM

II. As placas de cultura são colocadas em estufas de CO_2

Deve ser trocado 1/3 do meio por dia. As culturas podem ser mantidas por 30 dias.

III. Os tripanosomas

Podem ser somente detectados através do teste do microhematócrito e não por exame direto entre lâmina e lamínula.

IV. As culturas

Somente têm sucesso quando se utilizam menos de 1000 tripanosomas por poço nas microplacas.

6.1.2. Cultura do *T. vivax*

O *Trypanosoma vivax* é mais difícil de cultivar que o *T. evansi*, sabendo que alguns estoques não infectam realmente animais de laboratório.

Técnica de cultura usada pelo Dr. Erich Zweygarth do Onderstepoort Veterinary Institute (OVI) - África do Sul:

I. Médio de cultura

- A. Meio mínimo essencial de Eagle (MEM)..... 1% (v/v)
MEM aminoácidos não essenciais;
- B. Soro bovino aquecido-inativado.. 20% (v/v)
- C. L-glutamina..... 2 mM
 Piruvato de sódio..... 1 mM
 Penicilina..... 100 IU/ml
 Streptomina..... 100 µg
 Hipoxantina..... 0.2 µg
 Sulfanato de batocuproina..... 20 microM
 L-cisteína..... 1 mM
 2-mercaptoetanol..... 0.1 mM

*Em A: pode ser substituído pelo meio de Iscove, ou por uma mistura de 1 + 1 de meio Iscove e RPMI 1640; em B: Tem-se sucesso no uso do soro bovino, porém, após o sangramento, os soros de cada um dos bovinos devem ser testados, até se identificar um bom soro (contudo, quando se acredita que isso está ótimo, depois de poucas semanas, o mesmo animal sangrado pode apresentar um soro não muito bom para tal efeito).

II. Células “Feeder layer”

Usam-se células endoteliais da aorta de bovinos (células fibroblastóides também podem ser usadas; assim como fibroblastos embrionários de *Microtus montanus*).

III. Cultura de tripanosomas

A. Formas sanguíneas de *T. vivax* são obtidas da veia jugular de um bovino infectado e com parasitemia razoavelmente alta, em tubos contendo heparina como anticoagulante;

- B. Os tripanosomas são então separados das células sangüíneas por centrifugação diferencial, onde o pellet é ressuspensionado com meio de cultura;
- C. Adicionar diferentes números de tripanosomas nos poços das placas de cultura (24 wells), por exemplo: 10 000, 50 000 ou 100 000 ou mais;
- D. Outra abordagem pode ser utilizada para isto, usando uma gota de sangue parasitado;
- E. A gota é transferida dentro de um poço da placa de cultura contendo feeder cells;
- F. O volume de sangue é depositado até a superfície do poço;
- G. O meio é trocado diariamente substituindo 350-500 µl do sobrenadante da cultura por meio fresco;
- H. As placas têm que ser incubadas a 35 °C degree e a 4% de atmosfera de CO₂.

6.2. Passagens em animais de laboratório

Geralmente as passagens são realizadas por via intraperitoneal. Os roedores de laboratório (coelhos, cobaias, ratos e camundongos) têm se mostrado sensíveis nas infecções experimentais com *T. evansi*. No caso do *T. vivax* tem sido mais difícil a manutenção deste parasita em animais de laboratório desde que geralmente não são infectivos para estes animais. Alguns autores têm mencionado que as formas de *T. vivax* encontradas durante a fase inicial da infecção em bovinos poderiam infectar roedores de laboratório. Também tem se obtido algum sucesso na adaptação deste parasita, imunosuprimindo ou irradiando camundongos e ratos e inclusive através de passagens rápidas, logo após o aparecimento de alguns parasitas na corrente sangüínea.

6.2.1. Recomendações na manutenção de tripanosomas em animais de laboratório

Tem-se discutido muito sobre a representatividade das cepas mantidas em laboratório quando comparadas com os isolados de campo (Deane et

al., 1984). Aparentemente existe uma adaptação do parasita na troca de hospedeiro. Sabe-se que um isolado de campo pode estar constituído por uma população heterogênea de tripanosomas. Assim, um número determinado de clones expressando diferentes VATs podem ser obtidos mediante clonagem de uma cepa ou isolado.

Temos encontrado variações na infectividade das cepas de *T. evansi*. Estas se mostram pouco infectivas em animais de laboratório quando recém isoladas do hospedeiro natural, apresentando um período prepatente de 12 a 43 dias e baixa parasitemia. Após algumas passagens, elas se mostram mais infectivas com um período prepatente de 2 a 4 dias e uma parasitemia mais alta. Inclusive tem-se observado significantes variações biométricas deste parasita nas passagens. Verificou-se que este parasita sofre alterações morfométricas durante as passagens como conseqüência da adaptação ao novo hospedeiro ou seleção de algumas sub-populações. O mais importante é que as características biométricas das passagens foram sempre maiores que as do isolado primário (Dávila et al., 1997a).

Baseados nestas observações é recomendável criopreservar as amostras isoladas diretamente do campo: "isolado", "isolado primário" ou "isolado de campo", fazendo o menor número de passagens em animais de laboratório como uma tentativa de estudar as propriedades destes parasitas como expressadas na natureza.

6.3 Criopreservação

Existem vários métodos para criopreservação, entre eles poderíamos citar os usados por :

Dr. Anthony G. Luckins (Centre for Tropical Veterinary Medicine University of Edinburgh, Escócia):

Os camundongos são os melhores hospedeiros para o isolamento do *T. evansi*. Para obter uma alta parasitemia são necessárias várias passagens em camundongos. Quando uma alta parasitemia é alcançada, então é possível congelar a cepa.

I. Coletar sangue de camundongo, geralmente um camundongo será suficiente, e adicionar glicerol resfriado no gelo até uma concentração final de 7,5%;

Misturar cuidadosamente e guardar a mistura a + 4°C (geladeira) e preencher aproximadamente 1/3 de tubos capilares;

III. Selar ambas as extremidades dos tubos com uma chama. Colocar os capilares em tubos plásticos e lentamente resfriar a -196 °C;

IV. Guardar os capilares em tubos no nitrogênio líquido. Alternativamente, guardar a -76°C em refrigerador de CO₂ sólido.

Para o controle das parasitemias nos camundongos deve-se fazer esfregaço do sangue da cauda. Para a passagem, somente dois animais são necessários. A frequência das passagens dependerá da virulência da cepa, uma vez adaptada para os camundongos, estes desenvolverão rapidamente a doença e morrerão. Deve-se fazer esforços para guardar todos os isolados como material crioperservado.

Dr. Carlos M. Monzón (CEDIVEF, Formosa-Argentina):

I. Infecta-se ratos por via intraperitoneal (o tempo das passagens dependerá da quantidade do inóculo e da virulência da cepa);

II. Como anticoagulante, utilizar citrato de sódio ao 3.8% em água destilada ou EDTA;

III. Depois de 2 ou 3 passagens, coletar o sangue de vários ratos;

IV. Para coletar o sangue destes animais, deverão ser anestesiados com éter sulfúrico num frasco com tampa, logo após realiza-se um corte no plexo axilar e coleta-se o sangue com o anticoagulante;

V. Misturar o sangue com 7% de dimetilsulfoxido (DMSO). Colocar 1ml de sangue na geladeira de 4-8 °C durante uma hora, depois mais uma hora no freezer a -20 °C, uma hora no vapor de nitrogênio líquido e finalmente colocar no nitrogênio líquido.

Para descongelar, colocar os frascos de criopreservação a 35 °C durante 2-3 min. Misturar o sangue com buffer 7,0 , glicose a 1% , e 20% de soro bovino. Depois deste procedimento se poderá inocular novamente em ratos. Não usar tubos de vidro na criopreservação, pois podem quebrar-se no descongelamento.

Dr. Roberto Aguilar M. S. Silva (EMBRAPA/CPA-Pantanal, Corumbá-MS)

- I. Coleta de sangue infectado em tubos com heparina ou EDTA (de preferência os tubos com anticoagulante deverão estar a baixa temperatura, rodeado com gelo ou água gelada);
- II. Misturar o sangue dos tubos com 7-10% de glicerol;
- III. Homogeneizar;
- IV. Colocar o sangue homogeneizado com glicerol em frascos de criopreservação preenchendo no máximo 75% do volume do recipiente;
- V. Colocar os frascos de criopreservação contendo o sangue no vapor de nitrogênio líquido (num isopor contendo um pouco de nitrogênio líquido) durante 20 min.;
- VI. Depois deste procedimento se poderá armazenar no botijão de nitrogênio líquido a -196 °C.

Para o descongelamento, retirar os frascos a serem descongelados do nitrogênio líquido e colocá-los em banho Maria a 37 °C durante 5-7 min. Depois deste procedimento poderá se conferir no microscópio a viabilidade e motilidade destes parasitas.

Dr. Peter Stevenson (ODA/KETRI *Trypanosomiasis Research Project*, Nairobi, Quênia):

A criopreservação é um processo onde uma população de tripanosomas é preservada viva como um estabilizado em nitrogênio líquido. Isso tem uma vantagem comparado com a passagem in vivo, pois a manutenção pelo último método mencionado tem problemas logísticos e também a criopreservação elimina mudanças no caráter biológico da população através de seleção artificial sob condições especiais de passagens. As desvantagens são a vulnerabilidade de interrupção de suplementos refrigerantes (no caso de armazenamento em nitrogênio líquido) ou falhas na energia (freezer de muito baixa temperatura), em cada caso o material poderia ser perdido.

- I. Obtêm-se uma quantidade de sangue heparinizado de um animal doador infectado (concentração final de heparina 5-10 unidades/ml de sangue);

- II. Adicionar gotas de glicerol, agitando continuamente até atingir a concentração de 10% de glicerol;
- III. Deixar durante 15 min. para equilibrar;
- IV. Com uma pipeta pasteur passar o sangue com glicerol aos capilares, preenchendo só a metade de cada um deles (aproximadamente 70 µl / tubo);
- V. Deixar um espaço no final de cada tubo, usar plastilina ou outro composto similar para selar os lados finais de cada tubo;
- VI. Transferir ao tubo plástico de 75 x 12 mm., junto uma etiqueta apropriada a resistir baixas temperaturas. Usando um comprimento necessário, furar cada final dos tubos para o ingresso do nitrogênio líquido; - Inserir o tubo de capilares;
- VII. Suspender em vapor de nitrogênio líquido e deixar para esfriar durante 2 horas;
- VIII. Depois do esfriamento, transferir imediatamente os tubos com capilares da fase de esfriamento no nitrogênio líquido para a fase de armazenamento no mesmo botijão. A verificação do estabilizado pode ser feita quebrando um capilar e examinando o conteúdo conferindo a motilidade e viabilidade.

6.4. Clonagem

Segundo Tudor W. Jones da Universidade de Edimburgo (comunicação pessoal) seriam feitos os seguintes procedimentos:

- I. Pequenas gotas de suspensão de tripanosomas são examinadas ao microscópio para determinar a presença de um único tripanosoma, o qual é injetado em um camundongo. Isto é usualmente repetido três vezes para garantir que eles são propriamente clones.
- II. Para esta rotina usam-se normalmente camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida (300 mg/Kg) aproximadamente 2 horas antes da injeção. Assim são feitas passagens de rotina no máximo cada 3 dias em outro camundongo imunossuprimido.

III. Se o segundo camundongo não apresenta parasitemia pelo método do microhematócrito, essa linha é descartada.

IV. Quaisquer tripanosoma que se desenvolva nos camundongos imunossuprimidos são inoculados em outros até atingir uma parasitemia suficiente para criopreservação.

V. A pureza dos clones pode ser verificada por ensaios de isoenzimas e/ou DNA - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) , RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), etc.

Deve-se notar que a imunossupressão é usada unicamente se a intenção é prevenir a variação antigênica a qual pode tomar lugar na produção de populações de VATs. Se a intenção é apenas obter massa de parasitas então os estoques de *T. evansi* poderão ser clonados facilmente sem a necessidade da ciclofosfamida, a qual é muito tóxica.

7. Variação molecular em Tripanosomas

Os tripanosomas estão entre os mais primitivos dos eucariótos e, devido a sua linhagem ancestral não é surpreendente que apresentem propriedades biológicas não usuais. Eles estão entre os primeiros eucariontes por terem mitocôndria e uma de suas mais marcáveis características é seu DNA mitocôndrial, conhecido como DNA cinetoplástico (kDNA). Contrário a qualquer outro DNA na natureza, o kDNA está organizado dentro de uma rede contendo vários milhares de círculos de DNA interligados topologicamente. Os círculos são de dois tipos. Há vários milhares de pequenos minicírculos e de uma a poucas dúzias de maxicírculos. Cada célula contém uma única rede dentro da matriz de sua única mitocôndria (Englund et al., 1996).

Várias espécies do gênero *Trypanosoma* causam doenças parasitárias de considerável importância médica e veterinária em todas as partes da África, Ásia e as Américas. Estes parasitas exibem considerável diversidade genética intraespecífica, variação que tem complicado sua classificação taxonômica. Esta diversidade e variação podem ser definidas em ambos níveis : do genoma e genes individuais. O genoma nuclear mostra uma considerável plasticidade inter e intra-espécies em termos de número de cromossomas e tamanho (cariótipo molecular). O genoma mitocôndrial (kDNA) também varia consideravelmente entre

espécies, especialmente em termos de tamanho de minicírculos e organização. Há também uma considerável diversidade de seqüência intra-específica nos minicírculos e dentro da região variável dos maxicírculos. Análises de enzimas de restrição desta diversidade têm liderança no conceito de esquizodemas. No nível genético, análises de isoenzimas têm demonstrado muita utilidade na identificação de cepas e isolados, com a classificação dentro de vários zimodemas. Uma considerável diversidade antigênica tem sido também identificada em *T. cruzi* e *T. brucei*, com o desenvolvimento de serodemas, ultimamente. Em adição a esta diversidade inter-cépa, os tripanosomas africanos (*T. brucei*, *T. congolense* e *T. vivax*) exibem o fenômeno da variação antigênica, onde parasitas individuais são capazes de expressar qualquer uma das centenas de diferentes cópias da Glicoproteína Variável de Superfície (VSG) em qualquer momento em particular. Os mecanismos moleculares que definem a variação antigênica são agora conhecidos em considerável detalhe (Myler, 1993).

7.1. Estrutura, organização, replicação e função do kDNA

Estrutura

Todos os membros da ordem Kinetoplastida são caracterizados pela presença do kDNA, o qual é organizado em uma complexa rede de dois tipos de moléculas circulares concatenadas. Esta rede compreende 50 cópias de maxicírculos, os quais variam de aproximadamente 20 kb (*Trypanosoma brucei*) à 40 kb (*Crithidia fasciculata*) e 5000 a 10000 minicírculos, que variam de 0,5 kb (*T. vivax*) à 2,5 kb (*C. fasciculata*) dependendo da espécie (Lun & Desser, 1995; Chen et al., 1995).

Organização

O kDNA mais intensivamente estudado é o pertencente à *C. fasciculata*. Embora este parasita infecte somente insetos, as informações obtidas podem perfeitamente ser estendidas a outros membros da família *Trypanosomatidae*. Segundo Englund et al. (1996) a rede do kDNA da *C. fasciculata* tem aproximadamente 10 µm x 15 µm, sendo portanto maior que a própria célula do qual ele é derivado e este fato apresenta uma

importante questão de como ele é condensado dentro da matriz mitocondrial. Através da microscopia eletrônica ou microscopia confocal utilizando-se como corante a acridina laranja observa-se que esta rede é compactada em um disco de 1 μm de diâmetro por 0,4 μm de espessura. A espessura do disco compactado é de aproximadamente metade da circunferência de um minicírculo. Cada minicírculo tem um segmento curvo da hélice, o qual facilita a compactação. Na células, com as redes empreendendo replicação, o disco do cinetoplasto é guarnecido por dois complexos de proteínas que estão envolvidos na replicação do DNA. Estes complexos medem aproximadamente 0,4 μm e estão situados nos lados opostos do disco. Os complexos são constituídos por uma topoisomerase II, uma DNA polimerase e provavelmente por outras enzimas envolvidas na replicação do DNA.

Replicação

Em contraste com a replicação do DNA mitocondrial das células de mamíferos, o qual ocorre durante todo o ciclo celular, o kDNA ocorre durante a fase S coincidente com a do núcleo. Durante a fase S há replicação de cada minicírculo e maxicírculo individualmente. A progênie dos círculos distribuem-se em duas redes filhas as quais segregam-se em células filhas no momento da divisão celular (Englund et al., 1996).

Função

Os maxicírculos de todos os tripanosomatídeos têm uma função genética similar ao DNA mitocondrial de outros organismos, bem como a característica não usual de edição do RNA. Os minicírculos codificam a maioria dos guias do RNA para a edição do RNA. Para o sucesso na transformação morfológica dos tripanosomatídeos no vetor ou em cultura os tripanosomas precisam ter um cinetoplasto funcional, o qual contém enzimas e citocromos para a execução da fosforilação oxidativa mitocondrial. Evidências de que o cinetoplasto é fundamental para o desenvolvimento cíclico no vetor foram obtidos em experimentos onde mosca tse-tse foram infectadas com *T. b. gambiense* contendo formas acinetoplásticas e formas com cinetoplasto. Porém somente as formas contendo cinetoplasto sobreviveram. Em outro experimento uma cepa acinetoplástica de *T. brucei*, induzida por acriflavina, desenvolveu-se no

hospedeiro mamífero, porém não se desenvolveu no vetor (Lun & Desser, 1995).

7.2. Importância do kDNA e sua influência na distribuição dos tripanosomas

As formas alongadas ("slender") de tripanosomas africanos não apresentam enzimas do citocromo e têm um ciclo de Krebs funcional, quando elas estão no hospedeiro mamífero. Embora o *T. evansi* não apresente os maxicirculos, ele ainda assim consegue desenvolver-se no hospedeiro mamífero porque as formas sangüíneas não requerem um sistema respiratório gerando ATP. Contudo os tripanosomas que têm um cinetoplasto funcional precisam empreender uma série de transformações morfológicas e bioquímicas após a sua ingestão pelo vetor. Assim a distribuição geográfica destes tripanosomas depende da distribuição de seus vetores. Como resultado da perda dos maxicirculos e ausência de transformações morfológicas no vetor, a transmissão do *T. evansi* não depende da distribuição de um vetor e por esta razão vários insetos hematófagos têm potencial de transmiti-lo de um hospedeiro mamífero para outro. Embora o *T. brucei* possa ocasionalmente ser transmitido mecanicamente ele usualmente requer a ingestão do sangue infectado por uma mosca tsé-tsé. Após a ingestão pela mosca o *T. brucei* rapidamente perde a capacidade de infectar o hospedeiro mamífero e dentro do tubo digestivo da mosca ele empreende uma série de complexas alterações morfológicas e bioquímicas. A forma metacíclica tripomastigota é o único estágio no inseto que é infeccioso para os mamíferos. Embora o número de hospedeiros mamíferos do *T. brucei* seja tão amplo quando o do *T. evansi* ele somente ocorre na África tropical entre as latitudes 15° N e 25°S que coincidem com a distribuição da mosca tse-tse (Lun & Desser, 1995).

7.3. Perda dos maxicirculos do kDNA pelo *Trypanosoma evansi*

Segundo Lun & Desser (1995) a hipótese mais provável para a ausência dos maxicirculos em *T. evansi* é a seguinte. O *T. evansi* originou-se de um mutante do *T. brucei* o qual primeiro perdeu os seus maxicirculos durante o processo de replicação. Isto deve ter ocorrido quando um

minicirculo que se liberou da rede de DNA (vide processo de replicação dos minicirculos). Porém, diferentemente de outros minicirculos, ele não se religou à rede e durante o processo subsequente da divisão celular, uma parte da rede em divisão continha ambos maxi e minicirculos e a outra continha apenas os minicirculos. Esta cepa mutante contendo somente minicirculos espalhou-se pela África e outras partes do mundo em função da migração animal. Todos os isolados de *T. evansi* teriam portanto uma única origem. Este fato pode ser suportado por dados de isoenzimas de *T. evansi* de várias partes do mundo (vide isoenzimas). Ou pelas análises dos minicirculos feitas por Borst et al. (1987). Recentemente, Brun et al. (1998) revisaram as evidencias biológicas, clínicas, morfológicas e moleculares sugerindo que o *T. evansi* provavelmente evoluiu a partir de um clone de formas sanguíneas do *T. equiperdum*, que perdeu seus maxicirculos num mecanismo parecido ao descrito por Lun e Desser (1995).

7.4. Homogeneidade do cinetoplasto e DNA nuclear em isolados de *Trypanosoma evansi*

Segundo Bajyana Songa et al. (1990) o kDNA dos maxicirculos parecem ser homogêneos dentro de um organismo e contém genes mitocondriais estruturais homólogos aqueles encontrados em outros microorganismos, bem como vários ainda não identificados ORF (open reading frames). Os minicirculos, são homogêneos em algumas seqüências em algumas espécies tais como *T. equiperdum* ou *T. evansi*, embora em outras eles demonstrem considerável heterogeneidade. A organização deles mostra uma pequena região conservada e uma grande região variável. A região conservada de 130 bp dos minicirculos do *T. brucei* demonstrou ser muito similar à do *T. equiperdum*. Borst et al. (1987) encontraram que 5 de 6 cepas de *T. evansi* da África do leste e oeste e América do Sul continham minicirculos que diferiam em menos de 4% em suas seqüências. Estudos moleculares realizados por Bajyana Songa et al. (1990) avaliando os minicirculos de 13 estoques de *T. evansi*, bem como o polimorfismo nuclear de 9 desses estoques. Fragmentos restritos de kDNA de alguns desses estoques foram clonados nos vetores M13 ou PUC 18 e seqüenciados. Os resultados obtidos demonstraram que todos os estoques analisados eram membros de um grupo muito homogêneo. A análise do sequenciamento demonstrou que os minicirculos do *T.*

evansi contém a mesma região conservada que está presente nos minicírculos do *T. brucei* e *T. equiperdum*.

O *T. evansi* não pode ser confiavelmente diferenciado do *T. brucei*. No presente, o único método para distinguir *T. evansi* de *T. brucei* a ser visto é: (1) alguns testes de genes de antígenos (Massamba & Williams, 1984) e (2) a perda dos maxicírculos no kDNA do *T. evansi* (Borst et al., 1987). De acordo com Mathieu-Daudé & Tibayrenc (1994) o *T. evansi* parece ser um limitado arranjo de clones de *T. brucei* bem sucedidos, tendo sofrido adaptação à específica transmissão cíclica em áreas ausentes da mosca tsé-tsé. Seu estado, como uma espécie distinta do *T. brucei*, não é corroborada por qualquer base filogenética clara, mas seria contudo mantida com consideração para características específicas epidemiológicas.

8. Ecologia e sociologia da variação antigênica

O entendimento da variação antigênica requer informações sobre a dinâmica e a ecologia dos tipos antigênicos variáveis (VAT, do inglês Variable Antigenic Type).

O aparecimento de VATs é causado pela expressão de diferentes camadas de superfície. A camada de superfície é composta por uma glicoproteína principal, a glicoproteína variável de superfície (VSG). Como consequência, a sucessão de diferentes VATs está associada à expressão consecutiva de VSGs antigenicamente diferentes (Vickerman, 1978; Cross, 1975; Barbet & McGuire, 1982). Quando expressados na membrana de parasitas vivos, as diferentes moléculas de VSG não têm reação-cruzada. Porém, quando purificada uma determinante de reação-cruzada é detectada (Barbet & McGuire 1978; Barbet et al., 1981) a qual é localizada dentro do carboidratocarboxílico terminal, estrutura das moléculas solúveis de VSG (Cardoso de Almeida & Turner 1983).

O sinal que induz a ativação de VSG não é totalmente conhecido. Variantes antigênicas aparecem em populações de tripanosomas cultivadas in vitro, indicando que a presença de anticorpos não é requerida para induzir a variação (Doyle et al., 1980). Porém o sistema imune do hospedeiro tem um papel crucial no estabelecimento no modelo de onda da parasitemia e em definir a ordem de expressão da variante. A variação antigênica não é um processo aleatório, e novas

variantes aparecem em uma ordem imprecisa (Miller & Turner 1980). Modelos matemáticos têm mostrado que essa ordem não pode ser simulada nas bases da geração aleatória e seleção por razão de crescimento (Kosinsky, 1980).

Os tripanosomas expressam normalmente um único gene VSG, mas a simultânea expressão de dois genes resultando no aparecimento de uma camada superficial mista tem sido reportado (Baltz et al, 1986). Estas formas podem representar formas intermediárias no processo da ativação da camada de superfície. Os parasitas metacíclicos nas glândulas salivárias são antigenicamente heterogêneos, mas expressam um número limitado de VATs (Le Ray et al., 1978; Hajduk and Vickerman, 1981; Turner et al., 1988). Porém, o repertório metacíclico é instável: um estudo de isolados de um foco de enfermidade do sono no Leste da África tem mostrado mudanças graduais nos VATs expressados pelas formas metacíclicas por mais de um período de 20 anos (Barry et al., 1983).

De acordo com Gray (1966) diferentes isolados da mesma espécie obtidos em diferentes localizações geográficas frequentemente expressam diferentes repertórios de variantes. Van Meirvenne et al. (1977) observaram que tripanosomas derivados de diferentes isolados de campo da mesma espécie animal ou de espécies diferentes apresentavam reações cruzadas ao testes de imunólise e imunofluorescência. Tem-se observado que VATs pertencentes a tripanosomas que circulam na mesma região tendem a serem similares. Gill (1965) relatou a presença de antígenos solúveis no plasma de ratos infectados com *T. evansi* e observou que a imunização de camundongos com o plasma de ratos infectados produziu alguma proteção contra a reinfeção com tripanosomas da mesma cepa. Um isolado de campo pode consistir de um número de diferentes VATs quando há um único genótipo circulando em uma área.

Bovinos que tenham sido infectados com estoques de *T. vivax* e apresentaram cura espontânea resistem ao desafio com estoque homólogo ou podem resistir com estoque de uma região geográfica diferente demonstrando que identidade entre o serodema dos dois estoques (Vos e Gardiner, 1989). Dar et al. (1973) demonstraram reação cruzada entre populações de *T. vivax* do Quênia e Uganda. Soros de bovinos da Zâmbia demonstraram possuir baixos títulos de anticorpos líticos para 4 estoques da Nigéria e um estoque do leste da África

naturalmente infectados (Murray e Clarkson, 1982). Soros de bovinos do Quênia naturalmente infectados lisaram parasitas de um estoque da Nigéria (Barry, 1986). Estes resultados levaram Dar et al. (1973) a crer que o número de tipos antigênicos de *T. vivax* na África seja reduzido. De acordo com Barriga (1994) somente 12 VATs são conhecidos existir em tripanosomas injetados por tsé-tsé

Existem indícios de que animais que vivem em uma determinada região geográfica desenvolvem imunidade para os VATs circulantes na região. A entrada de animais reservatórios vindos de outras regiões podem introduzir tripanosomas portadores de VATs diferentes dos existentes no local e com isto provocarem novos surtos de tripanosomose. No presente, a epizootiologia da infecção com *T. vivax* é pouco conhecida. Assim, a habilidade para diferenciar entre estoques morfologicamente similares o qual exibe qualidades de interesse epidemiológico, como abrangência de hospedeiros, abrangência geográfica e patogenicidade, sobre as bases dos repertórios de VATs, poderiam ser de considerável importância em estudos epidemiológicos. Adicionalmente, como a resposta imune protetora do hospedeiro é VAT específica, um estudo do número e distribuição de VAT-serodemas na natureza poderia fornecer informação sobre o papel da imunidade contra os VATs no controle da doença (Jones & McKinnell, 1984).

Segundo Seed et al. (1984) em adição aos estudos de biologia molecular será necessário definir claramente as diferenças nas curvas de crescimento de populações variantes e o papel da competição entre essas variantes em um único lugar anatômico. Se os linfócitos produzem linfocinas com diferentes propriedades biológicas e estas podem recrutar outras células para funções específicas, os tripanosomas produziram fatores análogos os quais poderiam ser chamados de tripanosinas. Atualmente sabe-se que as comunidades das células se comportam como as comunidades de outras classes de indivíduos. As células necessitam se comunicar umas com as outras, por exemplo para satisfazer funções biológicas se não forem sociais. Estudos recentes no ILRI (International Livestock Research Institute) têm confirmado que os tripanosomas usam moléculas bioquímicas mensageiras para se comunicar uns com os outros e também com as células do seu animal hospedeiro. Uma dessas moléculas encontradas é a Ciclofilina (Cyclophilin), uma enzima que foi identificada como um alvo potencial na intervenção terapêutica (ILRI, 1996).

9. Genética de populações de Tripanosomas

Várias espécies do gênero *Trypanosoma* causam doenças parasitárias de considerável importância médica e veterinária em todas partes da África, Ásia e as Américas. Estes parasitas exibem considerável diversidade genética de intraespécies e variação a qual tem complicado sua classificação taxonômica. Esta diversidade e variação pode ser definida em ambos níveis : do genoma e genes individuais. O genoma nuclear mostra uma considerável plasticidade de inter e intra-espécies em termos de número de cromossomos e tamanho (cariótipo molecular). O genoma mitocondrial (kDNA) também varia consideravelmente entre espécies, especialmente em termos de tamanho de minicírculos e organização. Há também uma considerável diversidade de seqüência intra-específica nos minicírculos e dentro da região variável dos maxicírculos. Análises de enzimas de restrição de esta diversidade têm liderança no conceito de esquizodemas. No nível genético, análises de isoenzimas têm demonstrado muita utilidade na identificação de cepas e isolados, com a classificação dentro de vários zimodemas. Uma considerável diversidade antigênica tem sido também identificada em *T. cruzi* e *T. brucei*, com o desenvolvimento de serodemas, ultimamente. Em adição a esta diversidade inter-cépa, os tripanosomas africanos (*T. brucei*, *T. congolense* e *T. vivax*) exibem o fenômeno da variação antigênica, onde parasitas individuais são capazes de expressar qualquer uma das centenas de diferentes cópias da Glicoproteína Variável de Superfície (VSG) em qualquer momento em particular. Os mecanismos moleculares que definem a variação antigênica são agora conhecidos em considerável detalhe (Myler, 1993).

9.1. Teoria da clonalidade

Termos genéticos:

. **Reprodução clonal** - Reprodução sexual envolvendo mitose, com a consequência que as células filhas são geneticamente idênticas umas as outras. Formas de reprodução que produzem indivíduos geneticamente idênticos um o outro têm as mesmas consequências de genética de populações como reprodução clonal (ainda que a meiose, sem recombinação genética, pode tomar lugar). Uma espécie é clonal quando a progênie é geneticamente idêntica ao indivíduo em reprodução.

. **Clonet** - Um termo criado pelos autores para designar, em uma espécie clonal, todos os isolados que parecem ser geneticamente idênticos a outro, sobre as bases de um particular arranjo de marcadores.

. **Heterozigosidade fixada** - Quando todos os indivíduos amostrados são heterozigotos (em um ou mais loci); isto é inconsistente com a segregação meiótica e, portanto, uma indicação de propagação clonal.

. **Equilíbrio Hardy-Weinberg** - As frequências do genótipo (dadas pela expansão quadrada) esperada quando a recombinação é aleatória. Se as frequências de dois alelos, a e b , são p e q ($p + q = 1$), as frequências de equilíbrio são p^2 (homozigotos aa), q^2 (homozigotos bb) e $2pq$ (heterozigotos ab).

. **Linkage disequilibrium** - Associação não aleatória entre alelos ou genótipos em diferentes loci. Com o linkage equilibrium, a frequência esperada de um genótipo multilocus é o produto das frequências de um genótipo com um único locus. Quando há disequilibrium, a presença de um genótipo particular em um locus polimórfico faz isso mais provável que certos genótipos particulares ocorreriam em outro loci polimórfico. Assim, em *T. cruzi*, sabendo que o genótipo no locus *Gpi* faz possível a predição com uma alta probabilidade o genótipo que um dado estoque terá em qualquer um dos outros 14 loci. O linkage disequilibrium pode aparecer em organismos outbreeding reproduzindo-se sexualmente como uma consequência da seleção natural e aleatoriedade à deriva, mas ocorre dentro de organismos cruzando-se unicamente em níveis baixos se não for em tudo.

Contrariamente, em populações de *T. cruzi*, o nível observado de linkage disequilibrium aborda o máximo teórico, o qual é uma forte evidência contra o “interbreeding”.

. **Panmixia** - Cruzamento entre indivíduos (e, portanto, a associação entre os alelos em um locus) ocorre em forma aleatória.

As duas conseqüências importantes da reprodução sexual são a segregação dos alelos em um locus e sua recombinação entre os loci. As evidências destes dois processos são raras ou ausentes enquanto a evidência da reprodução sexual é rara ou ausente na natureza. O critério amplia os dois clássicos estatísticos usados em genética de populações para averiguar o cruzamento aleatório e a livre recombinação genética: freqüências de equilíbrio de Hardy-Weinberg e linkage disequilibrium. Quando alelos particulares não podem ser percebidos, ou o organismo é haplóide, ou a ploidia é desconhecida, só os testes recombinantes são aplicáveis.

Outro ponto a ser considerado é que o modelo clonal não implica que a recombinação genética é totalmente ausente, mas embora que a recombinação é rara numa escala evolucionária, persistem as conseqüências da genética de populações de um modo clonal de reprodução. Por exemplo, resultados preliminares (Tibayrenc & Ayala, 1991) sugerem que a diversidade do genótipo do *T. brucei* é elevada em mamíferos silvestres ou moscas tsé-tsé quando comparado com humanos ou o gado.

O modelo clonal proposto por Tibayrenc & Ayala (1991) tem aplicação no desenvolvimento de drogas curativas, vacinas, estudos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento de pacientes.

Segundo Mathieu-Daudé & Tibayrenc (1994) se os clones são tomados como unidades taxonômicas em lugar de subespécies e grupos, dois problemas aparecem: primeiro, o número de clones que compõem uma espécie dada é potencialmente ilimitado; segundo, a variabilidade clonal registrada num determinado estudo depende do nível de resolução dos marcadores genéticos utilizados.

10. Diagnóstico

10.1 caracteres Diagnósticos

A característica mais importante é a estrutura geral das formas sanguíneas reveladas em preparações coradas e examinadas através da microscopia ótica. Várias espécies de tripanosoma podem diferir no tamanho e forma do corpo, na posição do núcleo e cinetoplasto, bem como no grau do desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo.

Alguns índices são úteis para definir a posição do núcleo e do cinetoplasto. Um desses índices é o índice nuclear (N.I.). O NI representa a razão da distância do final da extremidade posterior para o núcleo e do núcleo para o final da extremidade anterior (PN/NA). Quando o NI = 1 o núcleo está no meio do corpo. Quando é < 1, está na metade posterior e quando é > 1 está na metade anterior. O índice cinetoplástico (K.I.) se obtém dividindo a distancia desde o final da extremidade posterior ao núcleo (PN) por a distancia desde o cinetoplasto ao núcleo (KN). Se o KI é menor que 2, o cinetoplasto está no meio dos dois, e se é maior que 2 o cinetoplasto está próximo ao núcleo (Hoare, 1972) (Fig. 3).

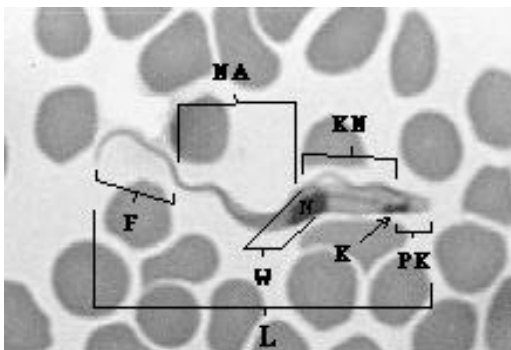


Fig. 3. Medidas dos tripanosomas. L: Comprimento total (incluindo o flagelo livre); PK: Distância do final da extremidade posterior ao cinetoplasto; KN: do cinetoplasto ao meio do núcleo; PN: do final da extremidade posterior ao meio do núcleo; NA: do meio do núcleo ao final da extremidade anterior; F: comprimento do flagelo livre; K: Cinetoplasto. Baseado em Hoare (1972). *Trypanosoma vivax*: forma tripomastigota em sangue de bovino (surto ocorrido no Pantanal do Poconé, 1995).

No Pantanal, MS um isolado de *T. evansi* de cão (Ramirez et al., 1997) e na Bolívia um isolado de *T. vivax* (Dávila et al., 1997a; 1997b) têm sido descritos com um comprimento total inferior aos descritos por Hoare (1972). As medidas biométricas do *T. evansi* e do *T. vivax* são mostradas na Tabela 1 e 2, respectivamente.

10.2 Métodos de diagnósticos parasitológicos

Método do “aspirado” do linfonodo

O linfonodo mais fácil de manipular em bovinos é o pré-escapular. Utiliza-se uma seringa de 2ml com uma agulha N° 21 G X de 1 ½ polegadas, contendo 1 ml. de soro fisiológico estéril. Localiza-se o linfonodo pré-escapular e se desinfecta a zona com álcool ou com iodo, deixa-se secar. Fixar o linfonodo entre os dedos índice e polegar e com a mão livre pegar o sistema seringa-agulha e introduzir a agulha no linfonodo até a metade do seu comprimento. Injetar o soro contido na seringa. Logo após, segurando ainda o linfonodo retira-se o soro injetado, obtêm-se um líquido misturado com sangue, mas nunca se obtêm 100 % do volume injetado. Com o líquido obtido preparam-se esfregaços grossos, os quais serão corados pelo método de Giemsa após fixação com álcool metílico.

Técnica do esfregaço

Coloca-se uma gota do sangue numa lâmina a uma distância de aproximadamente 2-3 cm. de um lado final. O gota é espalhada até o lado final oposto, isto é feito empurrando a gota com outra lâmina num ângulo de 45 °. São recomendáveis esfregaços de camada fina, pois facilitam a leitura ao apresentarem as células mais dispersas.

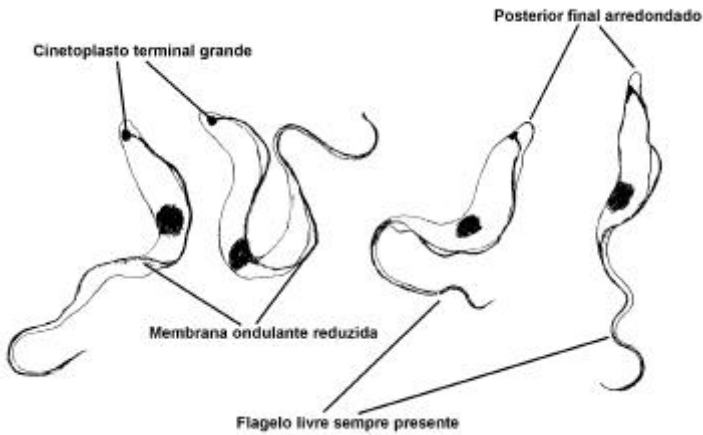


Fig. 4. *Trypanosoma vivax* encontrado no sangue de bovinos naturalmente infectados no Pantanal de Poconé, MT, Brasil.

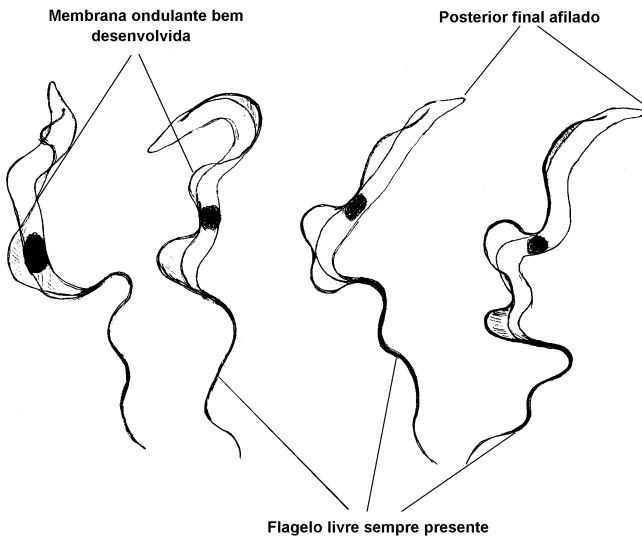


Fig. 5. *Trypanosoma evansi* encontrado no sangue de cavalos naturalmente infectados no Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil.

Tabela 1. Medidas biométricas (μm) do *Trypanosoma vivax* encontrado na América Latina.

	L	PK	KN	PN	NA	F	PN/KN (KI)	PN/NA (NI)
Hoare, 1972	18-31					3-6		
Bolívia, Santa Cruz (Silva et al., 1997a)	15.86 (2.23)	0.54 (0.51)	5.05 (1.07)	5.59 (1.15)	5.90 (0.76)	4.35 (1.26)	1.10	0.96 (0.24)
Brasil, Pará (Shaw & Lainson, 1972)	22.77 (1.38)	0.65 (0.25)	6.16 (0.57)	7.60 (0.57)	8.22 (1.08)	6.92 (1.03)	1.23	0.94 (0.24)
Brasil, Mato Grosso (Silva et al., 1996a)	18.73 (3.8)	1.02 (1.16)	6.10 (1.29)	7.18 (1.18)	5.40 (1.63)	6.15 (2.38)	1.17	1.50 (0.72)
Brasil, Mato Grosso do Sul (Silva et al., 1997 dados não publicados)	18.1 (2.04)	0.30 (0.53)	7.46 (1.56)	7.76 (1.59)	6.03 (1.18)	4.3 (0.87)	1.04	1.34 (0.37)
Colômbia (Plata, 1931)	21.00							
Guiana Francesa (Leger & Vienne, 1919)	22-23	0.80	5.50	6.3	7.20	6.00	1.14	0.87
Guiana Francesa (Desquesnes, 1996) **	20.3 (0.55)	1.10 (0.17)	6.00 (0.22)	7.1 (0.16)	5.70 (0.37)	7.50 (0.40)	1.18 (0.04)	1.24 (0.08)
Panamá (Johnson, 1941)	21.38							
Venezuela (Desquesnes, 1996) **	21.52	0.82	6.02	6.83	7.83	6.86	1.13	0.87

(Kubes, 1994)	(1.17) 22.00	(0.19)	(0.47)	(0.54)	(1.03)	(1.32)	(0.06)	(0.14)
Suriname								
(Nieschulz & Frickers, 1938)	21.00 21.50							
(Nieschulz, 1939)								

PK = distância do final da extremidade posterior ao cinetoplasto; KN = do cinetoplasto ao meio do núcleo; PN = do final da extremidade posterior ao meio do núcleo; NA = do meio do núcleo ao final da extremidade anterior; F = comprimento do flagelo livre; L = comprimento total incluindo o flagelo livre; KI = índice cinetoplástico; NI = índice nuclear. Os valores entre parêntesis representam o desvio padrão. ** Comunicação pessoal.

Tabela 2. Medidas biométricas (μm) do *Trypanosoma evansi* encontrado na América do Sul e Índia.

	PK	KN	PN	NA	F	L	PN/NA
Hoare (1972)						15 - 34	
Brasil (Ramirez et al., 1997)							
cavalo*	-	-	6.46 \pm 0.56	5.07 \pm 1.2	5.63 \pm 1.32	17.16 \pm 1.61	1.35 \pm 0.37
coati*	-	-	9.19 \pm 2.21	7.48 \pm 1.82	8.01 \pm 2.3	24.69 \pm 3.64	1.29 \pm 0.45
cão 1*	-	-	11.33 \pm 2.74	9.33 \pm 3.22	5.33 \pm 1.30	25.75 \pm 3.35	1.33 \pm 0.41
cão 2*	-	-	5.32 \pm 1.77	5.45 \pm 1.02	3.98 \pm 1.35	13.35 \pm 4.90	1.05 \pm 0.30
Suriname (Desquesnes, 1996)							
cão*	2.17 \pm 0.22	7.67 \pm 0.48	9.83 \pm 0.50	10 \pm 0.22	7.67 \pm 0.46	27.5 \pm 0.58	
** Venezuela (Desquesnes, 1996)							
cão*	2.72 \pm 0.31	6.87 \pm 0.52	9.58 \pm 0.72	8.41 \pm 1.09	8.5 \pm 1.17	26.5 \pm 1.52	
Índia (John et al., 1992)							
Búfalo	2.16 \pm 0.05	6.00 \pm 0.18			5.66 \pm 0.14	21.61 \pm 0.37	
Bovino	1.95 \pm 0.04	5.87 \pm 0.16			5.40 \pm 0.13	20.60 \pm 0.32	
Cão	1.91 \pm 0.04	5.37 \pm 0.11			4.64 \pm 0.10	17.65 \pm 0.22	

PK= distância do final da extremidade posterior ao cinetoplasto; KN= do cinetoplasto ao meio do núcleo; PN= do final da extremidade posterior ao meio do núcleo; NA= do meio do núcleo ao final da extremidade anterior; F= comprimento do flagelo livre; L= comprimento total incluindo o flagelo livre; \pm = desvio padrão; * Isolados primários; ** Medidas biométricas cedidas gentilmente pelo Dr. Marc Desquesnes, comunicação pessoal.

Técnica Woo (1970) do Microhematócrito e Buffy Coat

Preenche-se aproximadamente 2/3 do volume de cada capilar com o sangue a ser testado. É recomendável montar dois capilares por cada amostra de sangue. Sela-se com chama ou com plastilina numa das extremidades. Centrifuga-se e logo se realiza a leitura. Para o Buffy Coat pode se montar uma lâmina, quebrando cada capilar na parte onde se divide a parte líquida com a parte celular, colocando assim uma ou duas gotas deste material numa lâmina e fazendo logo o esfregaço.

Inoculação em camundongo

A inoculação em camundongo se faz geralmente por via intraperitoneal mas também pode ser feita por via intramuscular. O inóculo de sangue infectado é de aproximadamente 0,20 ml. Os camundongos mais usados são os de linhagem Swiss (suiços) e Balb/C.

NOTA: Os métodos diagnósticos parasitológicos mais freqüentemente utilizados são os esfregaços corados pelo Giemsa (GSS), esfregaços sangüíneos úmidos (WBF), método de concentração de Strout (SCM), método do microhematócrito ou método de Woo (HCT), método "Buffy Coat" (BCM) e inoculação em camundongos (Monzón et al., 1990). O método da inoculação em camundongo dá uma sensibilidade de 88,2%, HCT 71.1%, BCM 63,4%, WBF 53.8%, SCM 46,1% e GSS 45.6%.

Segundo os mesmos autores os métodos HCT, inoculação em camundongo e esfregaço corados com o Giemsa foram propostos como a combinação mais efetiva.

10.3 Métodos de diagnósticos sorológicos

Os métodos sorológicos têm limitações na sua utilização como diagnóstico da tripanosomose causada pelo *T. evansi* pelos seguintes motivos:

Após o tratamento os anticorpos permanecem por mais de um ano, o que dificulta saber se trata-se de uma nova infecção ou são anticorpos residuais de uma infecção passada e já curada.

Conforme recomendações do Dr. A.G. Luckins da Universidade de Edimburgo, Escócia (comunicação pessoal) na infecção com *T. evansi* deve-se diagnosticar os animais com infecções produtivas e tratá-los individualmente.

Os métodos diagnósticos sorológicos mais comumente utilizados são:

10.3.1. Imunofluorescência indireta

Materiais:

Lâminas
Laminulas 24x50
Glicerina Tamponada
Imunoglobulina conjugada
Microplacas (96 poços)
Pipeta multicanal
Pipeta automática (0,5 µl - 100 µl)
Azul de evans (10mg%)
Solução tampão fosfato 0,15M.

Preparação do antígeno:

1. Origem dos parasitas

a) Parasitas em cultura.

b) Parasitas no sangue. Isto acontece quando os parasitas são mantidos em animais de laboratório. Deve infectar-se 1 ou mais ratos (os mais usados são os de linhagem Wistar) e esperá-los apresentar alta parasitemia. Deve coletar-se o sangue com anticoagulante preferencialmente com heparina, tomando cuidado de colocar os tubos com o sangue coletado num recipiente com gelo, diminuindo assim o metabolismo dos parasitas e prolongando o seu tempo de vida fora do hospedeiro.

Após passar o sangue contendo parasitas pela coluna de DEAE celulose : Segura-se uma seringa de 20 ou 50 ml (dependendo do volume de sangue a ser passado) num pequeno suporte. Coloca-se no fundo desta, lâ de vidro ou papel filtro. Segura-se a extremidade inferior da seringa com uma mangueira pequena e fecha-se a extremidade desta. Montar a coluna colocando aproximadamente 20 g. de DEAE celulose quando tiver um volume de sangue coletado de dois ratos. Compactar a resina colocada na seringa passando 3 vezes o seu volume de PSG pH 8.0 (por exemplo se a resina estiver preenchendo 10 ml. da seringa serão passados 30 ml. de PSG). Deve se tomar cuidado de não deixar passar o nível do PSG abaixo

da resina durante a compactação, pois causaria pequenas rachaduras nela. Depois de compactada passar pela coluna a mistura de PSG com o sangue infectado na concentração de 1:1, monitorando sempre o nível desta mistura com o nível da resina evitando possíveis rachaduras na coluna. Deve se monitorar a passagem dos parasitas pela coluna, a qual ocorrerá logo após da passagem de um pouco de PSG.

2. Lavar 3 vezes com solução tampão fosfato 0,15M (pH 7,2), centrifugando a 3000 RPM durante 15m a 4° C.
3. Resuspende-se os parasitas em solução tampão fosfato 0,15M (pH 7,2) ajustando até atingir a quantidade aproximada de 40 parasitas por campo num aumento de 400x.
4. Coloca-se apenas uma camada fina do antígeno preparado em cada poço das lâminas para imunofluorescência a serem usadas.

Diluição dos soros:

A princípio para uma triagem preliminar os soros a serem testados não deverão ser diluídos. Conforme encontrados positivos é recomendável que sejam testados novamente em diluições seriadas de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280.

Montagem da Imunofluorescência:

- a) Diluir o conjugado na diluição indicada pelo fabricante (ou numa diluição específica determinada prévio teste pelo usuário) em azul de Evans 10 mg%.
- b) Colocar 10 µl do soro a ser testado em cada poço das lâminas com antígeno. Incubar em câmara úmida a 37° C durante 30 min. Logo após lavar 2 vezes com solução tampão fosfato 0,15 M (pH 7,2) deixando as lâminas no porta lâminas com solução tampão fosfato 0,15M durante 2 min. de cada vez.
- c) Colocar 10 µl da conjugado diluído como descrito em (a) em cada poço da lâmina incubada com o soro. Incubar em câmara úmida a 37° C durante 30 min. Logo após lavar 2 vezes com solução tampão fosfato 0,15 M como descrito em (b).
- d) Fazer a leitura num microscópio para Imunofluorescência no aumento de 400x.

e) Como sugestão o teste pode ser considerado positivo quando mais da metade do campo em observação apresente tripanosomas fluorescendo. Mas para isto tem que ser considerada a padronização prévia do conjugado na procura da melhor fluorescência para leitura.

10.3.2. Teste de aglutinação direta (Monzón, 1993)

Preparação do antígeno:

Camundongos de linhagem CF são inoculados intraperitonealmente com *T. evansi*. No pico da parasitemia o sangue é coletado do plexo braquial. Três partes do sangue são misturados com uma parte de citrato de sódio a 3,8%. A amostra é centrifugada por 7 min. a 754 G. Os parasitas sedimentados acima da camada de células sangüíneas são coletados e suspensos em 250 volumes de solução tampão fosfato pH 7,3, contendo glicose a 1% (solução tampão fosfato com glicose).

Ocasionalmente os parasitas podem ser separados das células sangüíneas por meio de técnicas cromatográficas.

O material coletado é lavado em solução tampão fosfato com glicose e centrifugado em centrífuga refrigerada a 10° C por 20 min. a 340 G. Subseqüentemente os parasitas são pesados e suspensos na solução de tripsina a 0,2% em solução tampão fosfato pH 7,6.

Para cada grama dos parasitas coletados é usado 30ml de tripsina a 0,2% tamponada. O material é incubado por 30 min. a 37 C e misturado novamente em 250 volumes de solução tampão fosfato com glicose e lavado várias vezes, na última lavagem deve se usar solução tampão fosfato sem glicose.

Para cada grama do pélete resultante é adicionado 50 ml de solução tampão fosfato contendo 1% de formalina. A preparação é misturada cuidadosamente várias vezes em uma seringa e deixada por 24 hs. a temperatura ambiente, agitada novamente e deixada sedimentar por 30 min. O sobrenadante é então removido filtrado duas vezes através de filtro de vidro (glass filter) com poros de aproximadamente 40 µm.

A concentração do antígeno é ajustada a uma densidade óptica de 0,40 usando um fotocolorímetro com um comprimento de onda de 50 nm, representando cerca de 50×10^6 parasitas/ml.

10.3.3. Aglutinação direta

São realizadas diluições seriadas a partir de 1:2 utilizando-se um volume de 25 µl por poço em microplacas com fundo em V, usando a solução tampão fosfato pH 7,3 contendo 0,8% de albumina bovina polimerizada (v/v).

Após a adição de 25 µl de antígeno para cada diluição do soro as placas são agitas manualmente por 30 seg. Devem-se cobrir as placas para evitar evaporação. Deixar 18 hs. a 37 C.

Tratamento das amostras com 2-Mercaptoetanol:

Para ativar a IgM iniciadas pelas infecções pelo *T. evansi* as amostras devem ser tratadas com 2-Mercaptoetanol (2-ME). 25 µl de 0,8% de 2-ME (v/v) em 0,15 M de NaCl são misturados com 25µl do soro teste e incubados durante 30 min. a 37 C.

Leitura do teste:

A leitura é feita em caixas de teste similares às utilizadas nos testes de aglutinação para brucelose.

Resultado:

Negativo: quando formar um botão no fundo da placa.

Positivo: quando formar uma rede ocupando pelo menos 50% do fundo.

10.3.4. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Detecção de antígenos circulantes em animais infectados com *T. evansi* (Ag-ELISA)

Segundo Nantulya et al. (1989) um teste imunoenzimático para detecção de antígeno utilizando monoclonal específico para o grupo *T. brucei* foi utilizado para detecção de antígenos circulantes em várias espécies de animais infectados experimentalmente com estoques de *T. evansi* do Sudão, Indonésia, Tailândia e América do Sul. Os antígenos circulantes foram detectados 6 dias após infecção e permaneceram por todo o período de observação do experimento (mais de 60 dias após infecção). Em uma análise dos soros de búfalos da Tailândia naturalmente infectados, o teste identificou todos os animais com exames parasitológicos positivos e mais 3 casos adicionais que não haviam sido detectados pelas técnicas parasitológicas. Em uma análise de soros de suínos na Tailândia suspeitos de um surto de *T. evansi*, o teste detectou "antigenemia" em 66,7% dos animais com títulos variando de 1:2 a 1:1512.

Detecção de anticorpos circulantes em animais infectados com *T. evansi* (Ab-ELISA)

Segundo Boid et al. (1996) a introdução de testes de ELISA no uso do diagnóstico da tripanosomose animal tem aumentado o interesse na utilização de técnicas sorológicas mais efetivamente no entendimento da epizootiologia da doença e também na aplicação delas no seu controle. Testes utilizando como antígenos tripanosomas crus ou sonicados mostraram que o ELISA tem uma sensibilidade e especificidade similar ao teste de Imunofluorescência. Contudo, em áreas onde existem mais de uma espécie de tripanosomas podem ocorrer reações cruzadas.

Atualmente, vários pesquisadores em diferentes laboratórios têm reportado problemas associados com o uso do ELISA para antígeno (Ag-ELISA) na detecção de tripanosomas. Isto é baseado principalmente nas reações cruzadas que dificultam o diagnóstico e inclusive proporcionam as vezes resultados não interpretáveis.

10.3.5. CATT (Card Agglutination Test) para detecção do *T. evansi*

O teste de aglutinação em cartão é um teste desenvolvido para detecção de anticorpos contra o *T. evansi* utilizando antígenos crus. Segundo Bajyana Songa et al (1987) numa amostra de 24 soros de búfalos positivos para tripanosomose através do teste de fixação de complemento (TFC) foram analisados utilizando-se o CATT, apresentaram 23 resultados positivos. Vinte animais que tinham apresentado parasitemias detectáveis foram todos positivos para CATT e TFC. Suínos infectados experimentalmente demonstraram resultados positivos 3 meses após a infecção na diluição de 1:5.

Tem sido observado que búfalos controles não infectados apresentam no soro fatores aglutinantes os quais em uma diluição do soro de 1:4 aglutinam os tripanosomas corados do CATT, isso pode ser evitado adicionando-se ao teste anti-IgG de búfalo.

10.3.6. Teste de Tripanolise

O princípio diagnóstico do teste de imunolise é baseado na progressiva acumulação de anticorpos séricos protetores para vários VATs que ocorrem sucessivamente durante a infecção. Os VATs para serem eficientes como reagentes em testes diagnósticos devem ter epítomos superficiais em comum com os VAT que aparecem no estágio inicial da infecção e que também tem uma tendência para reverter após o "clearance" imunológico inicial de tal forma que mantém o nível detectável de anticorpos. Contudo, a grande diversidade no repertório antigênico e para abranger um amplo espectro de teste os VATs diagnosticamente úteis devem ter uma ampla abrangência, por exemplo: portar iso-VATs comuns que reagem sorologicamente cruzados com os diferentes repertórios. Segundo Van Meirvenne et al (1995) todas essas condições podem ser preenchidas pela combinação de menos de 5 VATs. Teoricamente os VATs ótimos para detecção de casos precoces deveriam ser os VATs metacíclicos (mVATs) injetados pelas moscas tsé-tsé.

10.4 Métodos de diagnósticos moleculares

A acurada identificação e caracterização dos parasitas é de fundamental importância quando se estuda a epizootiologia dos tripanosomas. Inicialmente a caracterização foi baseada em diferenças morfológicas, as quais foram adequadas para distinguir entre parasitas de diferentes

subgêneros, porém falhou na distinção entre variantes biológicas ou cogenéricas (Masiga et al., 1996). Os métodos moleculares vieram suprir estas deficiências.

Segundo o Dr. Phelix Majiwa do ILRI - International Livestock Research Institute (comunicação pessoal) o diagnóstico baseado no DNA, oferece altos níveis de especificidade quando combinado com o PCR (Polimerase Chain Reaction). Várias seqüências específicas para uma variedade de tripanosomas têm sido identificadas e permitem detectar pequenas quantidades de parasitas nas amostras (Masiga et al., 1996).

Artama et al (1992) desenvolveram iniciadores de tipo espécie-específicos que se anelam aos minicírculos de *T. evansi*. Não existem observações adicionais sobre a especificidade destes iniciadores, principalmente na América do Sul. Particularmente no Brasil a maioria das cepas examinadas morfométricamente não apresentam cinetoplasto, o que iria inviabilizar o sucesso do diagnóstico usando os iniciadores para os minicírculos. Mais recentemente Ventura et al (2001) desenvolveram um diagnóstico por PCR do tipo espécie-específico para o *T. evansi*.

Nossos estudos no Pantanal e na Amazônia Peruana tem mostrado que as parasitemias de *T. evansi* em animais infectados naturalmente (búfalos e bovinos) podem ser muito baixas, e que os iniciadores mais sensíveis são os desenvolvidos por Masiga et al (1992) para *Trypanozoon* (subgênero específicos) que tem como alvo o DNA satélite. Porém, uma vez que estes iniciadores detectam também *T. brucei* spp. e *T. equiperdum*, não é possível dizer no caso das infecções em cavalos se os resultados positivos correspondem a *T. evansi* ou *T. equiperdum*. Os iniciadores KIN que tem como alvo o ITS1 do rDNA avaliados por Desquesnes et al. (2001) tem mostrado uma sensibilidade maior para o subgênero *Trypanozoon* do que os próprios iniciadores de Masiga et al. (1992).

O teste da reação em cadeia pela polimerase (PCR) bem como outros ensaios moleculares para o diagnóstico do *T. vivax*, se encontram em fase de implementação no Brasil. Masiga et al (1992) desenvolveram iniciadores espécie-específicos baseados no DNA satélite para a identificação de *T. simiae*, três subgrupos de *T. congolense*, *T. brucei* e *T. vivax*, nas moscas tsé-tsé. Outros ensaios moleculares para a detecção do *T. vivax* usando sondas de DNA têm sido desenvolvidos (Kukla et al, 1987; Dickin & Gibson, 1989; Nyeko et al., 1990). Porém, o método do PCR usando iniciadores a) espécie ou gênero específicos e b) iniciadores aleatórios constitui uma potente ferramenta de diagnóstico, contribuindo significativamente no diagnóstico e identificação de tripanosomas africanos, respectivamente (Majiwa et al., 1993).

A técnica do PCR usando as seqüências espécie-específicas para o diagnóstico de *T. vivax* (TVW1, TVW2) desenvolvida por Masiga et al (1992) oferece uma maior sensibilidade que os métodos parasitológicos (de Almeida et al. 1997), mas o mesmo não mostra maior sensibilidade que o parasitológico quando usado diretamente em soros de bovinos (Desquesnes 1997a). Na América do Sul estes iniciadores tem sido apenas testados na Guiana Francesa e testes preliminares foram feitos no Instituto de Medicina Tropical de Antuérpia, Bélgica usando algumas amostras do Brasil e da Bolívia.

Sabendo que a demonstração do parasita no sangue de animais infectados é o único método de diagnóstico seguro, e que os métodos parasitológicos não funcionam bem com parasitemias baixas, novos métodos de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade têm sido desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisa. Masake et al. (1997) desenvolveram um novo par de iniciadores para diagnóstico (ILO1264, ILO1265) que se anelam a uma região genômica do *T. vivax* que codifica um antígeno, e segundo os autores identificariam um maior número de genótipos de *T. vivax* de diferentes regiões. Na América do Sul, estes iniciadores foram recentemente testados na Bolívia. Mais recentemente, Ventura et al. (2001) e Morlais et al. (2001) desenvolveram iniciadores para amplificar o mini-exon e um microsatélite de *T. vivax*, respectivamente.

Mais recentemente, Dávila (2002) desenvolveu um ensaio de PCR baseado no locus ITS1 do RNA ribossomal (ITS1 rDNA) que tem mostrando utilidade no diagnóstico molecular diferencial. A versatilidade do ensaio se deve a que várias espécies de tripanosomas *Salivaria* podem ser detectados e diferenciados numa única reação de PCR e com um único par de iniciadores. Num estudo com DNA extraído de soros de ungulados do Pantanal, Souza et al (2002) mostraram que a combinação "Tryps-B" do mencionado ensaio para o ITS1 rDNA detectou uma prevalência de 70,4% (43/61) de *T. vivax*, enquanto os iniciadores TVW (Masiga et al 1992) e ILO (Masake et al 1992) detectaram 14,7 (9/61) e 4,9% (3/61), respectivamente. Além de detectar uma maior prevalência, a combinação "Tryps-B" mostrou uma sensibilidade de 5pg de DNA de *T. vivax* purificado, enquanto TVW e ILO detectaram até 5fg. Embora os iniciadores TVW sejam mais sensíveis na detecção de *T. vivax*, uma otimização na técnica de coleta de amostras e na extração de DNA tem sido recomendados para um melhor uso dos iniciadores para o ITS1 rDNA.

10.4.1. Iniciadores usados na detecção de tripanosomas *Salivaria*.

Os iniciadores que tem sido mais usados na detecção de tripanosomas *Salivaria* são os baseados no DNA satélite, devido principalmente a característica repetitiva dessa região no genoma. Além do DNA satélite, outros loci como os minicírculos e o mini-exon tem também sido explorados. A seqüência dos iniciadores para *Salivaria* e sua especificidade está descrita na Tabela 3, porém uma revisão mais completa sobre o assunto tem sido publicada por Desquesnes e Dávila (2002).

Tabela 3. Iniciadores específicos para a detecção de tripanosomas *Salivaria*.

Nome	seqüência dos iniciadores	Tamanho do produto (bp)	Especificidade	Referencia
KIN1 & 2	KIN1 : 5' gCgTTCAAAGATTgggCAAT 3' KIN2 : 5' CgCCCgAAAgtTCACC 3'	Species specific sizes	Kinetoplastida	McLaughlin <i>et al.</i> 1996
NRP1 & 2	NRP1: 5' CgA ATg AAT ATT AAA CAA TgC gCA gT 3' NRP2: 5' AgA ACC ATT TAT TAg CTT TgT TgC	177	<i>Trypanozoon</i>	Moser <i>et al.</i> , 1989a
TBR1 & TBR 2	TBR1: 5' gAATATTAACAATgCgCAg 3' TBR2: 5' CCATTTATTAgtCTTTgTgC 3'	164	<i>Trypanozoon</i>	Masiga <i>et al</i> 1992
Trypanozoon	5' CACAATggCACCTCgTTCCC 3' 5' TTAgtAATgCggCAACgAgA 3'	300-400	<i>Trypanozoon</i> (Iniciadores para Procyclin)	Artama <i>et al</i> 1992
Trypanozoon	5' TAgCgTAgTTgAAAgC 3' 5' TATTATTAgAACAgTTTCTgTAC 3'	1350	<i>Trypanozoon</i> (Spliced leader)	Artama <i>et al</i> 1992
<i>Trypanozoon</i>	ILO342 : 5' gATCCgCAGCCgggCCTg 3' ILO343 : 5' CCgCggTggCTCCTTCCC 3'	1500	<i>Trypanozoon</i>	Majiwa <i>et al</i> 1994
MP 1 & 2	MP1 : 5' CAACgACAAAgtTCAGT 3' MP2 : 5' ACgTgT TTT gTg TATggT 3'	994	<i>T. evansi</i>	Artama <i>et al.</i> 1992
TP1 & 2	TP1 : 5' gAATCAgtTCTTTTgAggg 3' TP2 : 5' AACCGtTgTgTATTACA 3'	500	<i>T. evansi</i>	Diall, 1993
TVW1 & 2	TVW1: 5' CTgAgTgTCCATgTgCCAC 3' TVW2 : 5' CCACCAgAACACCAACCTgA 3'	150	<i>T. vivax</i>	Masiga <i>et al.</i> 1992
ILO1264 & ILO1265	ILO1264: 5' CAgCTCgCCgAAggCCACTTggCTggg 3' ILO1265: 5' TCgCTACCACAgTCgCAATCgTCgTCTCAAgg 3'	400	<i>T. vivax</i>	Masake <i>et al</i> 1997
TV80 & 322.24	T.v.80.24 : 5' CAgtgCTCCgCTCgTACACggAC 3' T.v.322.24 : 5' gCACgCCACATAgCCgggAACAg 3'	266	<i>T. vivax</i>	Clausen <i>et al.</i> 1998

67 *Tripanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biología, Diagnóstico e Controle

TCS1 & 2	TCS1: 5' CgA gCg AgA ACg ggC AC 3' TCS2: 5' ggg ACA AAC AAA TCC CgC 3'	316	<i>T. congolense</i> savannah	Masiga et al., 1992
TCF1 & 2	TCF1: 5' ggA CAC gCC AgA Agg TAC TT 3' TCF2: 5' gTT CTC gCA CCA AAT CCA AC 3'	350	<i>T. congolense</i> forest	Masiga et al., 1992
TCK1 & 2	TCK1 : 5' gTg CCC AAA TTT gAA gTg AT 3' TCK2: 5' ACT CAA AAT CgT gCA CCT Cg 3'	294	<i>T. congolense</i> Kilifi	Masiga et al., 1992
TSM1 & 2	TSM1: 5' CCg gTC AAA AAC gCA TT 3' TSM2: 5' AgT CgC CCg gAg TCg AT 3'	437	<i>T. simiae</i>	Masiga et al., 1992
Tgd1 & 2	DGG1: 5' CTgAggCTgAACAgCgACTC 3' DGG2 : 5' ggCgTATTggCATAgCgTAC 3'	149	<i>T. godfreyi</i>	Masiga et al., 1996

Com referência ao *T. evansi* a amplificação dos minicírculos pelo PCR neste parasita é capaz de detectar o DNA equivalente a 5 tripanosomas enquanto a amplificação de seqüências específicas repetitivas detecta o DNA equivalente a 1 tripanosoma.

A técnica Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) é considerada por ter um grande potencial na detecção de DNA polimórfico para estudos taxonômicos. Os produtos gerados pelo RAPD podem ser usados na construção de mapas genéticos que demonstram as relações taxonômicas. Para fins epidemiológicos os resultados do RAPD e Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) podem ser combinados e reanalisados para produzir uma relação mais acurada entre os estoques/isolados (Boid et al., 1996).

Uma recente contribuição sobre as características do *T. evansi* foi feita por Ventura et al. (1996) ao identificar o fragmento espécie-específico Te664 do DNA usando a técnica RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction). Adicionalmente usando testes para análises da variabilidade genética as cepas de *T. evansi* estudadas por estes autores mostraram micro-heterogeneidade entre elas. Ensaio diagnóstico baseado nos minicírculos do kDNA não são úteis para as cepas sem cinetoplasto.

10.4.2. Preparação de amostras no campo para o PCR (Kawasaki et al, 1990)

Quando se está no campo e não se tem condições de preservar a amostra em gelo um outro método é altamente necessário. Um dos mais simples e talvez melhores métodos é também colocando sua amostra em 50% de etanol. Embora o DNA ou RNA possa ser extraído de tecidos fixados em formalina, o mínimo degradado e o alto rendimento de DNA pode ser isolado de amostras fixadas em etanol. DNA ou RNA conveniente para hibridizações e reações enzimáticas pode também ser isolado de células fixadas em metanol. Limpe a amostra de tecido uma vez em salina e corte em pequenos pedaços (< 1 cm de um lado). Resuspenda em um volume igual de salina (o volume exato não é preciso) e adicione lentamente um volume igual de etanol agitando gentilmente. O volume de etanol adicionado é igual ao volume da salina mais a amostra do tecido de tal forma que a concentração final fique em torno de 50%. As células fixadas são convenientes para a extração do DNA durante muitos dias a temperatura ambiente. E mais que 6 anos a 4 °C. Este protocolo é ideal para preservação de amostras pelo biólogo molecular de campo. Se alguém está estudando amostras sanguíneas de animais, sangue heparinizado ou citratado pode ser usado para análise do DNA depois de 1

ou 2 dias a temperatura ambiente, ou mais. Fixar o sangue como uma suspensão celular pode servir. Um bom método para preservar amostras sanguíneas para análise de DNA é simplificar arejando os esfregaços sanguíneos. A fixação em etanol ou metanol pode ser útil mas não necessário. O DNA de 13 anos, da medula óssea tem sido utilizado com sucesso em Southern Blots. O sangue inteiro contém poucas células nucleadas que as células da medula óssea, assim você pode querer fazer vários esfregaços sanguíneos por voluntário.

10.4.3. Preparação de DNA a partir de pellets usando Chelex-100®:

Desquesnes et al (2001) descreveram um método de extração de DNA usando a resina Chelex-100®. Estes autores se basearam nos protocolos de Vignoli et al (1995) e Penchienier et al (1996): os pellets dos tripanosomas são resuspendidos em água destilada (5000 parasitas/ μ l), vortexados vigorosamente, e 50 μ l da mistura são colocados em 450 μ l de tampão de lise (10 mM Tris, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1% Tween 20, e 1% Nonidet P40) contendo 5% de Chelex-100®, vortexados novamente, incubados durante 20 minutos a 56 °C, vortexados, incubados durante 10 minutos a 100 °C, e centrifugados durante 2 minutos a 15.000 RPM numa centrifuga para tubos eppendorf. Os sobrenadantes são coletados em tubos eppendorf novos e os pellets descartados. Apenas 1 μ l de DNA é usado para as reações de PCR num volume total de 21 μ l.

10.4.4. Preparação de DNA a partir de sangue usando Chelex-100®:

Dávila (2002) descreveu um método de extração de DNA a partir de sangue baseado em Walsh et al (1991) e de Almeida et al (1997). Segundo este autor, durante o diagnóstico parasitológico no campo, o buffy-coat de um microhematocrito é colocado num confetti de papel filtro (por exemplo Whatman 4) novo, a amostra é secada a temperatura ambiente longe da luz do sol e dos insetos e guardada na geladeira ou congelador para posterior extração de DNA no laboratório. O papel filtro contendo o buffy-coat pode ser recortado com uma furadeira estéril de papel e colocado num tubo eppendorf novo de 500 μ l. A extração de DNA consiste em colocar 500 μ l de água Milli-Q no tubo eppendorf contendo o confetti deixando em repouso

durante 30 minutos. O tubo eppendorf é invertido de 2 a 3 vezes cada 15 minutos para facilitar a lavagem, e depois centrifugado a 12,000 RPM numa centrifuga para tubos eppendorf durante 10 minutos. Logo após, 450 µl do sobrenadante é descartado e 100 µl de Chelex-100[®] 1% adicionado, o tubo é invertido varias vezes, incubado a 56 °C durante 30 minutos, fervido durante 8 minutos e vortexado vigorosamente durante 2 minutos. Depois de uma centrifugação final de 5 minutos a 12,000 RPM, 80 µl do sobrenadante são colocados num tubo novo e guardados a -20 °C. Apenas 1µl do DNA extraído é usado em reações de PCR num volumen total de 15 ou 20µl.

10.4.5. Esfregaços corados como de DNA para uso no diagnóstico (Alger et al, 1996)

Muitas vezes a coleta de amostras (como soro, sangue ou mesmo o isolamento do parasita) de um mesmo animal infectado não pode ser repetida e nos resta apenas esfregaços corados. O método descrito por Alger et al. (1996) pode auxiliar no diagnóstico, principalmente em regiões de difícil acesso onde não é possível obter mais material para os exames diagnósticos.

Segundo os autores o DNA foi extraído de esfregaços sangüíneos corados de *Plasmodium vivax* no campo, esfregaço de esputo corados com Ziehl-Neelsen contendo *Mycobacterium tuberculosis* e esfregaços de fluido tissular e exudato inflamatório corados com Giemsa e contendo amastigotas de *Leishmania (Viannia) panamensis* usando uma solução à de Chelex-100[®] (Bio-Rad-Richmond, CA) como a seguir:

500 µl de 1% de Saponina (sigma- St. Louis, MO) em água foi adicionada à tubos Eppendorf contendo material da amostra obtido por raspagem da superfície dos esfregaços usando lâminas de barbear descartáveis. As amostras foram encubadas em gelo por 60 minutos, agitadas em vortex 3 a 4 vezes e centrifugadas por 4 minutos a 12000 x g a temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, os pellets foram lavados (aproximadamente 3 vezes em solução tampão fosfato (pH 7,2) até o sobrenadante apresentar-se claro. A seguir após a adição de 50µl de Chelex-100[®], as amostras foram agitadas (vortex) novamente e incubadas a 56° C por 15 minutos, agitas novamente e incubadas em água fervente por 10 minutos. Após centrifugar à 12000 x g por 4 minutos o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20° C. Todas as amostras foram amplificadas utilizando os iniciadores específicos.

11. Caracterização molecular

Trypanosoma vivax

Dirie et al. (1993a) observaram que o oligonucleotídeo ILO 525 foi o único que gerou padrões espécie-específicos nos isolados de *T. vivax* testados usando RAPD. Os oligonucleotídeos ILO 101, 525 e 1060 forneceram “fingerprints” e características reproduzíveis para todos os isolados de *T. vivax*. Segundo os mesmos autores, o polimorfismo gerado por estes três oligonucleotídeos, separaria em dois grupos os isolados de *T. vivax* testados. O primeiro grupo pertencia ao Quênia, e o segundo abrangia os isolados da Uganda, Nigéria, Gâmbia e Colômbia. Os isolados da Uganda apresentaram padrões similares aos da África do Oeste e América do Sul.

Estudos prévios mostraram que os isolados de *T. vivax* da Colômbia estão mais associados aos da África do Oeste que aos da África do Leste (Dickin & Gibson 1989, Dirie et al. 1993b) sugerindo que a hipótese de que os isolados da América do Sul se derivaram dos isolados da África do Oeste transmitidos pela mosca tsé-tsé, é provavelmente correta (Dirie et al. 1993a). Os resultados também mostraram que os isolados do Quênia formam um grupo à parte. Porém, o baixo número de isolados da América do Sul que foram testados não permitiu avaliar o nível de heterogeneidade entre eles, nem saber se houve mais de uma importação deste tripanosoma da África para a América do Sul.

Além do polimorfismo encontrado entre os isolados do Oeste e Leste da África, existe uma diferença em patogenicidade descrita por Fairbairn (1953). Este autor mostrou que as formas curtas são características das cepas que causam a forma aguda da doença no gado do Oeste da África, enquanto que as formas longas foram associadas com as cepas causadoras de infecções crônicas no Leste da África. No Brasil e Bolívia (Silva et al 1998a, Silva et al., 1996a) tem se encontrado formas de *T. vivax* mais curtas que as encontradas por Fairbairn (1953) no Oeste da África, porém os sintomas clínicos registrados nessas duas regiões da América do Sul seriam melhor definidos como sendo uma doença aguda. Baseados nestas informações, alguns autores têm sugerido que as cepas curtas de *T. vivax* do Brasil (Shaw & Lainson 1972) e Bolívia estariam relacionadas com a doença aguda observada nestas regiões (Dávila et al. 1997a).

Metodologias sensíveis e exatas são necessárias para a caracterização deste parasita na região do Pantanal. A técnica da PCR usando oligonucleotídeos aleatórios (RAPD) (Welsh & McClelland 1990, Williams et al. 1990) tem sido muito útil na diferenciação de tripanosomas dos subgêneros *Nannomonas*, *Trypanozoon* e *Duttonella* (Majiwa et al. 1993, Waitumbi & Murphy 1993, Dirie et al. 1993b).

Esta técnica e o RFLP são muito úteis na caracterização de cepas, porém precisam de DNA do parasita livre do DNA do hospedeiro. Isto é um fator limitante na tipagem de isolados do campo, onde se extrairmos DNA do sangue total obteríamos DNAs do parasita e hospedeiro juntos. A tipagem de isolados do campo, tal como ocorrem na natureza deveria ser muito mais informativa do que usando amostras mantidas por longo tempo "in vitro" ou em roedores de laboratório, que facilitam a seleção de subpopulações.

Devido às limitações para a obtenção de grande número de parasitas purificados em *T. vivax*, o uso da PCR-RFLP é uma das opções para avaliar o polimorfismo genético nas amostras contendo ambos DNAs, do parasita e do hospedeiro juntos. Esta técnica consiste em amplificar por PCR regiões específicas do genoma do parasita, para logo digerir o produto com enzimas de restrição (RFLP). A PCR-RFLP foi usada pela primeira vez para detectar mutações pontuais num oncogene (Deng 1988) e atualmente está sendo usada com sucesso na tipagem de *Leishmania* tendo como alvo o ITS rDNA (Cupolillo et al 1995) e o gene gp63 (Victoir et al 1998).

Trypanosoma evansi

Zhang e Baltz (1994) avaliaram as relações filogenéticas de 15 isolados de *T. evansi*, três de *T. equiperdum*, e um de *T. brucei brucei* usando Southern blot da digestão de DNA, com dois sondas de DNA repetitivo de *T. brucei brucei*. Num dos grupos, *T. evansi* revelou que os padrões dos isolados de diferentes províncias da China foram idênticos, mas se diferenciaram dos padrões de *T. evansi* da África, América do Sul e Filipinas. Recentemente, Watanapokasin et al. (1998) usaram oligonucleotídeos capazes de diferenciar intra-especificamente cepas de *T. evansi* usando RAPD. Embora exista um número razoável de trabalhos publicados sobre caracterização molecular de *T. evansi*, são poucos os relatos sobre algum polimorfismo genético nesta espécie. Segundo Urakawa e Majiwa (2000), isto se deve ao fato de que *T. evansi* e *T. equiperdum* têm um genoma muito parecido com *T. brucei*, sendo que

as principais diferenças entre eles são que *T. evansi* é monomorfo, não transmissível pela tsé-tsé, não tem maxicirculos no seu kDNA, e alguns cepas não apresentam cinetoplasto.

Epizootiologia, Patogênese e Tratamento

Existe um número grande de espécies de tripanosomas que infectam animais descritos na literatura (revisado por Hoare, 1972; Clarkson, 1976; Stephen, 1986; Desquesnes, 1997; Dávila & Silva, 2000; Dávila, 2002). Porém, entre os tripanosomas que infectam animais de interesse na pecuária podemos citar: *Trypanosoma vivax*; *T. evansi*; *T. equiperdum* e *T. theileri*. O *T. evansi* tem ampla distribuição nas Américas, sendo encontrado no Panamá, Venezuela, Colômbia, Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Peru. O *T. evansi* e o *T. vivax* são um risco potencial para mais de 500 milhões de bovinos e 100 milhões de búfalos (Peregrine, 1994).

1. *Trypanosoma evansi*

Sinônimos: *Spirochaete evansi*, *Trypanosoma equinum*, *Trypanosoma soudanense*, *Trypanosoma hippicum*, *Trypanosoma venezuelense*, *Trypanosoma soudanense* Var. *berberum*, *Trypanosoma cameli*, *Trypanosoma marocanum*, *Trypanosoma ninae* Kohl *yakmov*, *Trypanosoma su-auru*, etc. (Hoare, 1972).

1.1 História

O *Trypanosoma evansi*, foi o primeiro tripanosoma patogênico descoberto. A surra, como é conhecida na Índia a doença causada pelo *T. evansi*, tem sido observada desde há muitos séculos, porém somente em 1880 Griffith Evans descobriu organismos móveis semelhantes a espirilos no sangue de cavalos e camelos doentes. Evans descreveu parasitas em esfregaço frescos e os reconheceu como sendo protozoários. Evans acreditou que a fonte primária da infecção dos cavalos fossem as águas poluídas (Hoare, 1972).

1.2 Distribuição e hospedeiros

1.2.1. Distribuição

A tripanosomose causada pelo *T. evansi* tem uma distribuição geográfica extremamente ampla. Ela ocorre no norte da África, Índia, Malásia, Indonésia, China, Rússia, Filipinas, América Central e América do Sul.

1.2.2. Hospedeiros

Os hospedeiros comumente observados são os camelos, cavalos, burros, bovinos, zebuínos, caprinos, suínos, cães, búfalos, elefantes, capivaras, coatis, antas, veados e pequenos roedores silvestres (*Oryzomys spp*).

1.2.3. Ciclo Vital

O *T. evansi* é transmitido mecanicamente por moscas hematófagas. Não ocorre desenvolvimento cíclico no vetor, os tripanosomas permanecem na proboscide. Os vetores usuais pertencem aos gêneros *Tabanus*, porém insetos dos gêneros *Stomoxys*, *Haematopota* e *Lyperosia* podem transmitir. Segundo Silva et al. (1995c) o principal vetor do *T. evansi* no Pantanal Mato-Grossense é o *Tabanus importunus*. Na América Central e do Sul o morcego hematófago *Desmodus rotundus* é considerado um vetor importante.

1.3 Epizootiologia

A epizootiologia é caracterizada por uma alta incidência inicial de morbidade e mortalidade seguida pela redução na incidência da infecção e da severidade da doença.

O mesmo padrão é observado localmente, quando um novo foco de infecção ocorre ou quando animais suscetíveis são introduzidos em uma área enzoótica.

Os surtos epidêmicos de tripanosomose por *T. evansi* tendem a envolver diferentes hospedeiros animais em diferentes partes do mundo. Na Indochina os equínos são os mais afetados, seguido pelos camelos e búfalos; embora na porção asiática da União Soviética os principais hospedeiros sejam os camelos, e em menor extensão os equínos. Na

África (Somália, Quênia, Etiópia, Sudão, Chad e Nigéria) os camelos são os mais atingidos pela doença. Nas Américas Central e do Sul, os equínos são os principais seguidos pelos bovinos. Vários animais silvestres têm sido encontrados naturalmente infectados com *T. evansi*.

Na Europa e Ásia o *T. evansi* tem sido encontrado em *Cervus unicolor* nas Ilhas Maurícius; *Matiacus muntjak*, *Axis axis*, *Cervus timorensis* na Indonésia; *Ovis ammon*, *Capreolus capreolus* e *Saigo tatarica* no Casaquistão. Infecções também foram observadas em orangotangos na Sumatra e Indonésia.

Na América do Sul, foram encontrados infectados *Odocoileus chiriquenos*, *Manzama sartorii* no Panamá, *Hydrochaeris hydrochaeris* (capivaras) na Argentina, Brasil, Paraguai, Panamá, Venezuela e Peru (Dávila & Silva, 2000); *Desmodus rotundos* no Panamá e Colômbia (Losos, 1980). Morales et al. (1976) encontraram alta prevalência (26,6%) de capivaras infectadas na Colômbia. Talvez o primeiro relato sobre a tripanosomose causada pelo *T. evansi* no Brasil tenha sido publicado em uma lei da assembléia legislativa da província do Pará em 1939 oferecendo um prêmio de "4 contos de réis" para alguém que eliminasse a "Peste Quebrabunda", nome regional pelo qual a doença era conhecida (Anon, 1839). No Pantanal e região subtropical da Argentina a tripanosomose devido ao *T. evansi* é conhecida como "Mal de Caderas" (Monzon & Villavicencio, 1990).

No Pantanal, Pinto (1944) relatou ter examinado alguns sobreviventes de um surto de "Mal de Caderas". Laranjeira et al. (1983) relataram vários surtos de tripanosomose no planalto de Mato Grosso do Sul nos seguintes municípios: Angélica e Brasilândia em 1978. No ano seguinte (1979) foram relatados, segundo os autores, novos surtos. E nos anos de 1980 e 1981 detectaram-se novos surtos no município de Ivinhema. Laranjeira (1985) sugeriu que a doença está se propagando para o Planalto, provavelmente através de animais portadores vindos do Pantanal.

Segundo relatos de pecuaristas pantaneiros, geralmente, ocorrem surtos de tripanosomose em capivaras que precedem aos surtos da doença em equínos. Infecções naturais por *T. evansi* foram constatadas em capivaras na sub-região da Nhecolândia, no Pantanal Sul-Matogrossense. A infecção foi observada em 45% (n= 53) das capivaras examinadas sendo que 13 apresentaram, por ocasião dos exames, sintomatologia compatível com "Mal de Cadeiras", também se detectou o *T. evansi* em 25% (n= 16) dos coatis (*Nasua nasua*) examinados, e um cricetídeo, *Oryzomys sp* no município de Corguinho (Nunes et al., 1993; 1994).

Franke et al. (1994) ao estudar a ocorrência de *T. evansi* em eqüinos, bovinos, cães e capivaras na sub-região do Pantanal de Poconé encontrou prevalências de 9,6; 4,2; 18,6 e 14,0 % respectivamente utilizando um teste Ab-ELISA (enzyme - linked immunosorbent assay) para detecção de anticorpos contra o *T. evansi*. Silva et al. (1995a) relataram a ocorrência em fevereiro de 1994 de um surto de tripanosomose em eqüinos devido ao *T. evansi* no Pantanal do rio Paraguai com mortalidade em torno de 50%. No mesmo ano os mesmos autores relataram a ocorrência de 9 surtos envolvendo também o Pantanal da Nhecolândia (Silva et al. 1995c).

Estudos isoenzimáticos

Num estudo de 9 estoques de *T. evansi* obtidos de capivaras e cães no Pantanal Sul-Matogrossense encontrou-se que todos foram similares isoenzimaticamente aos outros estoques de *T. evansi* descritos em diferentes partes do mundo (Stevens, et al., 1989). Gibson et al. (1980) não encontrou diferenças enzimáticas em isolados de *T. evansi* em capivaras da Colômbia. Boid (1981) encontrou algumas diferenças enzimáticas em isolados de camelos do Sudão, as quais não foram encontradas por Stevens, et al, (loc. cit). Boid (1985) encontrou variações consideráveis entre o *T. evansi* de Java e Indonésia, onde os estoques da Indonésia formaram um grupo mais heterogêneo.

1.4 Patogênese

A enfermidade ocasionada pelo *T. evansi*, em eqüinos, é manifestada por uma elevação na temperatura corporal, a qual está diretamente associada com a parasitemia e o progressivo desenvolvimento da anemia, perda da condição física e fraqueza. Episódios recorrentes de febre podem ser observados durante o curso da doença. Edema, principalmente, nas partes inferiores do corpo, e hemorragia petequiasis nas membranas serosas podem ser observadas.

A doença é freqüentemente fatal para camelos, cães e eqüinos, mas pode ser branda em bovinos, asininos, caprinos e ovinos (Mahmoud & Gray, 1980). O *T. evansi* causa enfermidades conhecidas na América do Sul como: Mal de cadeiras ou Peste quebrabunda no Brasil, desrengadera na Venezuela e Murrina no Panamá (Shaw, 1977).

Fatores de risco na tripanosomose por *Trypanosoma evansi* no Pantanal

Reservatórios silvestres

Estudos da tripanosomose em animais selvagens e domésticos no Pantanal foram desenvolvidos por Nunes & Oshiro (1990) demonstrando a ocorrência do *T. evansi* em cães, coatis e capivaras. Stevens et al. (1989) observaram prevalências do *T. evansi* de 27% em capivaras e 58% em animais em semi-cativeiro no Pantanal. Estes autores também isolaram o *T. evansi* de cães doentes na mesma região. Segundo Morales et al. (1976) capivaras saudáveis podem abrigar *T. evansi* e dessa forma, constituir um reservatório selvagem para cavalos e cães na Colômbia. Outros mamíferos selvagens poderiam portar *T. evansi* como por exemplo o Coati (Nunes & Oshiro, 1990), a onça (*Felis pardalis*) (Shaw, 1977) e os morcegos-vampiros (*Desmodus rotundus*) (Hoare, 1965), mas seus papéis como reservatórios no Pantanal é ainda desconhecido. Os morcegos-vampiros parecem ter um papel importante no início dos surtos do “Mal de cadeiras” nos cavalos e depois de iniciado o surto as moscas poderiam ser vetores efetivos na expansão da infecção (Constantine, 1970). Greenhal et al. (1971) descreveu ambos sequencial e simultânea alimentação do morcego vampiro comum *D. rotundus* a partir de uma única ferida. Este comportamento alimentar é retornando no mesmo hospedeiro, o qual não é favorável na disseminação da infecção. Recentemente Silva et al., (1996b) tem reportado 62,5 % de coatis (*Nasua nasua*) infectados com *T. evansi* na estação seca no Pantanal da Nhecolândia.

Vetores

Muitas espécies de tabanídeos têm sido reportadas como vetores de tripanosomas ao redor do mundo. Krinsky (1976) revisou o papel das moscas de cavalos como vetores de muitas espécies de tripanosomas e citou ao redor de 50 espécies de tabanídeos envolvidos na transmissão de *T. evansi*. Os tabanídeos são os principais e mais importantes vetores em condições de campo e Gruvel & Balis (1965) observaram uma correlação estacional entre a incidência de tripanosomose em camelos e a abundância de tabanídeos no Chad. Os tabanídeos mostraram um pique populacional de setembro à novembro, durante a primeira metade da estação das chuvas. Contudo, os níveis populacionais destes vetores

permaneceram altos até março, final da estação chuvosa. O *Tabanus importunus* foi a mais abundante e importante espécie durante a estação chuvosa e mostrou um pique populacional de outubro à janeiro.

Os estudos no Pantanal têm mostrado que a estação de vetores coincide com a primeira metade da cheia, de setembro/outubro até dezembro/janeiro (Fig. 6). Porém, as populações de tabanídeos aumentam consideravelmente até o final da época da cheia. Esta estação representa o período de maior risco na transmissão de tripanosomas pelos mencionados insetos, devido a sua abundância e pico populacional de espécies de notável capacidade vetorial como o *Tabanus importunus*. Lutz em 1908 citado por Barreto (1949) concluiu que a tripanosomose foi transmitida mecanicamente por tabanídeos principalmente *Tabanus importunus* e *Tabanus trilineatus* durante um surto na ilha de Marajó (norte do Brasil). Observações epidemiológicas na Venezuela revelaram uma elevada possibilidade de transmissão mecânica do *T. evansi* por *Tabanus importunus* (Krinsky, 1976).

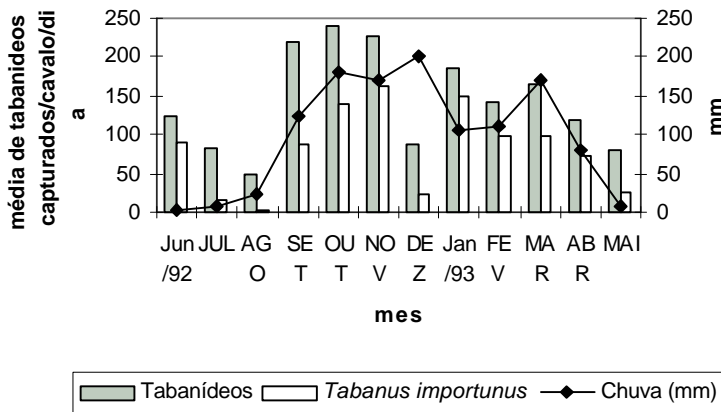


Fig. 6. Distribuição estacional de tabanídeos coletados em cavalos no Pantanal, Brasil, de junho/92 a maio/93.

7.2 Aumento do trânsito do gado no Pantanal

O incremento de comércio de gado no Pantanal tem causado um aumento no deslocamento de cavalos, gado e cães entre as propriedades. Isto

poderia ter contribuído na disseminação da doença. As condições ótimas para que os animais adquiram ou transmitam *T. evansi* ocorrem no período em que param para descansar durante a viagem para os leilões, e quando o número de animais de diferentes propriedades e a proximidade do hospedeiro fornecem uma excelente oportunidade para a transmissão da doença pelos vetores.

Em um estudo executado por Silva et al (1995c) de janeiro à julho de 1994, quando vários casos de tripanosomose ocorreram em cães e cavalos no Pantanal, amostras de sangue coletadas de 119 cavalos doentes e 4 cães foram examinadas pela técnica de centrifugação do microhematócrito e inoculação em camundongos. Todos os cães e 116 cavalos (97%) estavam infectados com o *T. evansi*. Dois surtos puderam ser identificados aparentemente sem ligação entre eles, envolvendo 116 cavalos infectados dos quais morreram 70 antes do tratamento. Há uma forte evidência circunstancial que esses surtos de "Mal de Caderas" foram produzidos por fatores como a presença de reservatórios domésticos (bovinos, cavalos e cães), reservatórios selvagens (principalmente capivaras e coatis), abundância da população de vetores, práticas locais assim como o intenso tráfego do gado e, possivelmente, as diferenças antigênicas entre tripanosomas circulantes entre as populações de animais de diferentes regiões do Pantanal. A variabilidade antigênica dos tripanosomas, demonstrada por vários pesquisadores e evidenciada por Silva (dados não publicados) e Dávila et al., (1995;1996), pode contribuir na ocorrência dos surtos, pois existem indícios de que animais que vivem em uma determinada região geográfica desenvolvem imunidade para os VATs circulantes na região. A entrada de animais reservatórios vindos de outras regiões pode introduzir tripanosomas portadores de VATs diferentes dos existentes no local e com isto provocar novos surtos de tripanosomose. Os morcegos vampiros podem ter um importante papel no início dos surtos, porém os tabanídeos são fundamentais na dispersão da infecção. A ocorrência estacional desses fatores podem determinar a situação epizootiológica regional.

1.5. Imunologia

De acordo com Losos (1986) as respostas imunológicas na tripanosomose dependem da complexa composição antigênica dos parasitas. Os antígenos são divididos em dois tipos, sendo um conhecido como homogenato interno ou antígenos comuns e que é derivado do organismo total desintegrado, e o outro é chamado de antígeno superficial ou antígenos variantes encontrados na superfície dos tripanosomas. Os

antígenos comuns se originam de vários componentes do núcleo e citoplasma e não são protetores mas responsáveis pelas reações sorológicas cruzadas entre as espécies. Os antígenos variantes, devido a sua heterogeneidade nas populações infectantes de tripanosomas, favorecem a sobrevivência e multiplicação do parasita apesar deles estimularem anticorpos protetores.

Diferentes métodos são utilizados para conferir proteção contra a infecção de tripanosomas salivários : a) infecção com tripanosomas irradiados, b) infecção com tripanosomas mortos ou seus componentes e c) infecção e quimioterapia. Apenas o ultimo é utilizado com sucesso no desafio homólogo mas não no heterólogo. Dávila et al. (1996) reportaram possível variação antigênica ou overdose do inóculo no desafio homólogo com o estoque A de *T. evansi*; provavelmente isto tenha ocorrido nas sucessivas passagens do estoque em ratos albinos do qual foi obtido o inóculo para a reinfeção. Estes autores verificaram a proteção conferida ante o desafio homólogo com *T. evansi*, como demonstrado por outros autores com *T. congolense*, *T. brucei*, *T. cruzi* e *T. evansi*.

Alguns estudos com cepas de *T. evansi* do Pantanal mostraram um alto nível de fagocitose in vitro na presença de anticorpos parasito-específicos, enquanto que na ausência destes anticorpos a fagocitose não foi sucedida, isto seria explicado pelo fato que os macrófagos normais têm alguma dificuldade para capturar os tripanosomas (Silva et al., 1996c). Estudos adicionais com estas mesmas cepas têm mostrado imunidade conferida por macrófagos e células do baço em infecções experimentais usando ratos albinos. Contrariamente aos reportes de imunossupressão observados em animais infectados com tripanosomas salivários, no mencionado estudo observou-se no grupo que recebeu macrófagos ativados um tempo médio de vida de 6 dias no grupo controle e 32 dias no grupo experimental. No grupo que recebeu células do baço observou-se um tempo médio de vida de 3 dias no grupo controle e 42 dias no grupo experimental (Silva et al., 1996d).

1.6. Tratamento

A droga disponível no País é o dimenazene cuja dosagem recomendada é de 7,0 mg/kg.

2. *Trypanosoma vivax*

Pertence a seção salivária, subgênero *Duttonella*.

2.1 Distribuição

O *T. vivax* é encontrado em toda a área ocupada pela mosca tsé-tsé na África. No Oeste da África o *T. vivax* é considerado o mais patogênico e importante tripanosoma dos bovinos. Ele contudo tem se expandido para outras áreas da África e América Central, América do Sul e Caribe. A primeira ocorrência do *T. vivax* nas Américas, foi na Guiana Francesa em 1919 e mais tarde outros países da América do Sul, Central, e algumas ilhas do Caribe. A tripanosomose bovina causada pelo *T. vivax* afeta a saúde animal e produtividade na Colômbia e Venezuela.

No Brasil, a ocorrência do *T. vivax* foi pela primeira vez mencionada por Boulhosa (1946) em bovinos da zona bragantina no estado do Pará, posteriormente Shaw & Lainson (1972) descreveram o parasita em um búfalo (*Bubalis bubalis*) nas proximidades da cidade de Belém, Pará. Outros relatos sobre *T. vivax* foram também feitos por Serra-Freire (1981) em Oiapoque no Amapá, Pereira & Abreu (1979) em ovinos e bovinos da região amazônica, Massar et al. (1979) em búfalos no Amapá, Serra-Freire (1983) e Silva et al (1995b; 1996a) em bovinos do Pantanal.

2.2. Epizootiologia

O *T. vivax* infecta um grande número de espécies de ungulados selvagens e domésticos. Na África é o responsável pela tripanosomose em eqüinos, bovinos e outros ruminantes. Os camelos são também susceptíveis ao *T. vivax* e os cães e suínos são os refratários do mesmo.

Esse tripanosoma é transmitido ciclicamente pelas moscas tsé-tsé e mecanicamente por outras moscas hematófagas. As moscas dos estábulos e outros tabanídeos ("mutucas"), podem ser vetores somente na Américas e nas áreas da África onde não ocorre a mosca tsé-tsé (Levine, 1973). Serra-Freire & Rezende (1988) mostraram que moscas da espécie *Stomoxys calcitrans* alimentadas em ovinos infectados com *T. vivax* foram capazes de fazer a transmissão mecânica. Porém, isto somente aconteceu quando as moscas sofreram interrupção da alimentação e encontraram um novo hospedeiro em menos de 15

segundos, e não tinham tido nenhuma alimentação anterior à do hospedeiro vertebrado infectado.

O *T. vivax* causa a mais importante forma de tripanosomose em bovinos no Oeste da África, e surtos agudos têm sido relatados no Leste da África (Losos & Ikede, 1972). O *T. vivax* tem sido identificado na América do Sul desde 1919 (Leger & Vienne, 1919). A teoria mais aceita é a que este parasita foi introduzido com um rebanho vindo do Senegal (África) em 1830 (Currason, 1943). Depois difundiu-se de um país a outro por meio de traslados de bovinos. Até 1976 a sua distribuição abrangia todos os países da costa Norte do Oceano Atlântico, além do Panamá, Brasil e as Ilhas de Guadalupe e Martinica (Wells et al., 1982).

Anticorpos contra o *T. vivax* foram encontrados em vários países da América do Sul: El Salvador, 15%; Costa Rica, 22,9%; Colômbia, 48,2%; Equador, 22,5%; Peru, 14,3%; Paraguai, 40% e Brasil, 54%, sendo que foram coletados respectivamente 100, 192, 3.324, 310, 49, 15 e 666.

Há uma associação temporal entre a estação das chuvas quando moscas hematófagas, particularmente *Tabanidae* são abundantes e um aumento na prevalência do *T. vivax* no gado bovino.

Em Oiapoque, Amapá, Serra-Freire (1981) relatou que 25% (8/32) dos búfalos examinados parasitologicamente apresentaram infecção por *T. vivax*, apresentando inclusive diferentes índices de parasitemia, como houveram relatos de casos de morte entre os animais, o autor considerou como sendo patogênica a cepas encontrada. Num outro estudo, Serra-Freire (1983) relatou uma prevalência de 8,9% de bubalinos e 7,6% de bovinos infectados com *T. vivax* nas localidades de Curiaú, Lagoa de Fora, e Rio Predreiras no município de Macapá, e os municípios de Magazão Velho e Magazão Novo no Amapá, sendo que a maior parte dos rebanhos tinha origem de animais importados do Estado do Mato Grosso do estado do Pará.

No Pantanal, estudos demonstraram que a estação dos *Tabanidae* ocorre na primeira metade da estação chuvosa, de setembro/outubro à dezembro/janeiro. Contudo os tabanídeos ainda permanecem em grande número até o final da estação.

Esta estação representa o período de maior risco de transmissão de tripanosomas por esses insetos devido a sua abundância, bem como pelo pique populacional de espécies de alto potencial de vetor como é o caso do *Tabanus importunus* (Barros, 2001).

Surtos de tripanosomose bovina por *T. vivax* em áreas inundáveis da Bolívia e Pantanal

Em 1995 o *T. vivax* foi reportado no município de Poconé localizado no norte do Pantanal (Silva et al., 1995d, 1996a), posteriormente ele foi encontrado em outros municípios do estado de Mato Grosso (Fig. 9). Em fazendas localizadas no Pantanal os principais sintomas clínicos observados foram: letargia, diarreia, perda de apetite, fraqueza, lacrimejamento, conjuntivite, aborto e perda da condição física. Alguns animais apresentaram perda substancial de peso em curto período de tempo, enquanto outros apresentavam a forma crônica da doença por 4 a 6 meses, emaciação e caquexia. No Pantanal de Poconé, 10 de 29 (34,48%) dos bovinos examinados pela técnica do microhematócrito foram positivos para *T. vivax*.

Recentemente o *T. vivax* foi encontrado no Sul do Pantanal (Fig. 9). O diagnóstico foi feito através do teste do microhematócrito e esfregaços sanguíneos finos, apresentando uma prevalência de 80.95% (17/21) e 50% (1/2) dos bovinos de duas fazendas localizadas nas sub-regiões do Nabileque e Paiaguás do Pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, respectivamente. Os sinais clínicos observados foram: febre, anemia, fraqueza progressiva, perda do apetite, letargia, substancial perda de peso em curto espaço de tempo.

Entre Janeiro e Maio de 1996 numerosos casos de abortos, perda progressiva de peso, intensa anemia e mortes de bovinos foram registrados em várias províncias do departamento de Santa Cruz (Fig. 7). Inicialmente o agente etiológico foi identificado como *T. evansi*. Embora os bovinos possam se infectar com esse parasita, freqüentemente não é observado enfermidade clínica.

O *T. vivax* foi encontrado em esfregaços sanguíneos de bovinos enviados ao Laboratório de Diagnóstico e Investigación Veterinaria (LIDIVET), Bolívia, bem como em amostras de sangue coletadas de bovinos na região da Laguna Concepción e posteriormente processadas pelo método de Woo e "Buffy Coat". Acredita-se que o *T. vivax* tenha chegado ao Departamento de Santa Cruz (Figs. 8 e 9) através de bovinos infectados provenientes do norte do Pantanal, Brasil.

Como na África, há uma associação temporal entre a estação das chuvas quando moscas hematófagas, particularmente *Tabanidae* são abundantes, e um aumento na prevalência do *T. vivax* no gado bovino. No

Departamento de Santa Cruz e no Pantanal, os estudos demonstraram que os *Tabanidae* ocorrem em abundância, 35 e 25 espécies respectivamente. Então é provável que a estação das chuvas represente o período de maior risco de transmissão de tripanosomas por esses insetos devido a sua abundância, bem como pelo pique populacional de espécies de alto potencial vetorial como é o caso do *Tabanus importunus* encontrado na região. O *T. vivax* também infecta várias espécies de antílopes para os quais ele não é patogênico.

Em algumas regiões do Departamento de Santa Cruz a fauna de ungulados (principalmente Cervídeos) parece ser rica e estes animais poderiam servir como importantes reservatórios.



Fig. 7. Bovinos do departamento de Santa Cruz de la Sierra encontrados infectados com *Trypanosoma vivax* em 1996.

2.3 Patogênese

O *T. vivax* pode provocar uma doença fatal associada a uma alta e persistente parasitemia (Losos & Ikede, 1972). Resposta imune reduzida, hemorragias e anemias tem sido verificado em bovinos infectados com *T. vivax* (ILRAD, 1984; Whitelaw, 1979).

Na forma aguda os animais morrem dentro de 5 semanas e apresentam alta temperatura, letargia, fraqueza, anemia, leve perda na condição física, lacrimação, diarreia que tem sido relatada em animais que morreram 37 a 58 dias após a infecção experimental, e aborto (Fig. 7).

A perda de peso pode ser substancial em curto espaço de tempo e tem sido observado que o gado zebu puro desenvolve alta parasitemia com a doença terminando em morte.

Segundo Souza & Serra-Freire (1987) numa infecção experimental em bovinos, caprinos e ovinos observaram-se períodos de incubação que variaram de dois a 31 dias, sendo que as parasitemias foram bastante flutuantes, inclusive com períodos de ausência de tripanosomas no sangue periférico que variou entre um e 58 dias para bovinos, um a 17 dias para caprinos e um a 12 dias para ovinos. Os autores concluíram que existem 3 formas de evolução das infecções: aguda, subaguda e crônica.

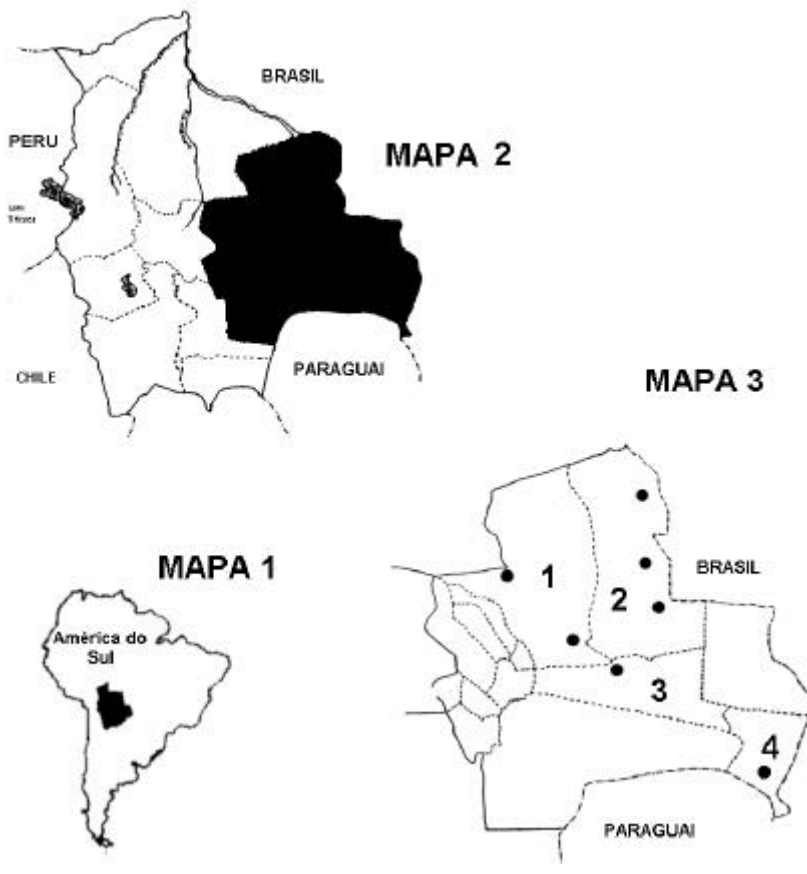


Fig. 8. Localização dos surtos de *Trypanosoma vivax* na Bolívia (Mapa 1 e 2) no departamento de Santa Cruz de la Sierra (Mapa 3). 1: Províncias de Nuflo de Chavez e Guarayos; 2: Província de Velasco; 3: Província de Chiquitos; 4: Província de Herman Bush.

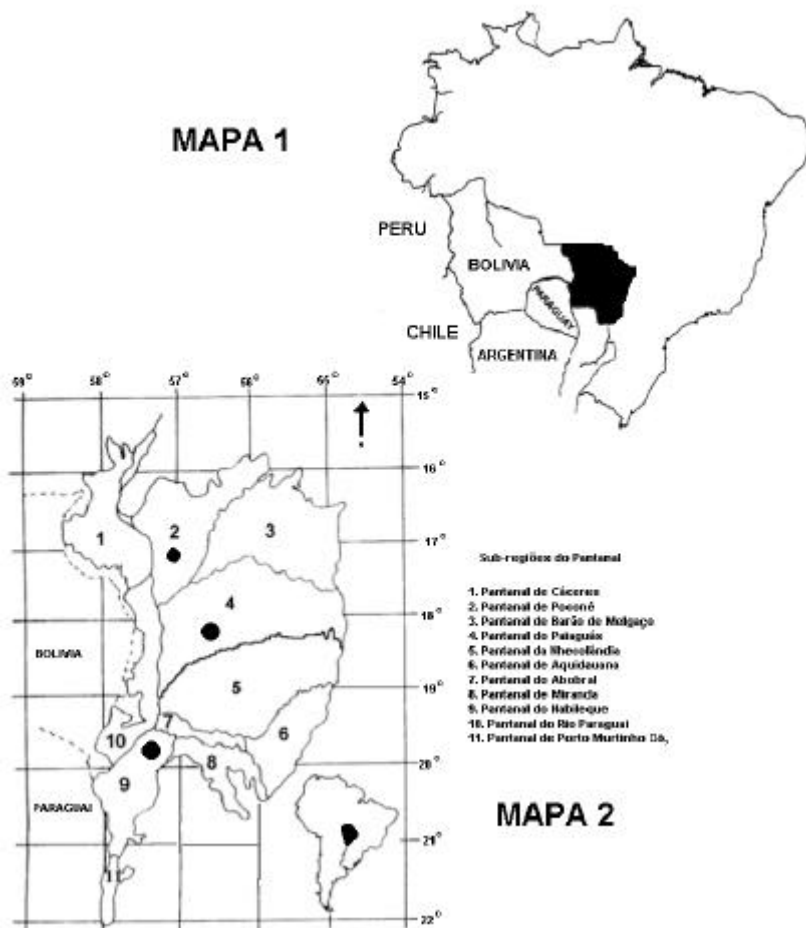


Fig. 9. Localização dos surtos de *Trypanosoma vivax* no Pantanal. Mapa 1: Localização do Estado do Mato Grosso do Sul; Mapa 2: Sub-regiões do Pantanal e localização dos surtos.

12. Métodos de controle

Os tripanosomas *T. evansi* e *T. vivax* na América do Sul, África e Ásia (incluindo a China) constituem um potencial risco para mais de 500 milhões de bovinos, 100 milhões de búfalos e 12 milhões de camelos. Contudo, cada enfermidade pode ser controlada efetivamente com ambos agentes quimioterapêuticos ou quimioprolifáticos, bem como também o controle dos artrópodes vetores (Peregrine, 1994).

12.1. Controle das tripanosomoses

Durante décadas vários métodos de controle, tais como desmatamento, uso de machos estéreis e armadilhas impregnadas com inseticidas para o controle dos vetores, pulverização de inseticidas nos animais, na vegetação, uso de inseticidas ***pour on*** e quimioprofilaxia foram tentados na África. Porém atualmente apenas a quimioprofilaxia e o controle dos vetores com drogas ***pour on*** e armadilhas impregnadas com inseticidas continuam sendo usadas.

12.2 Controle através de drogas tripanocidas

A quimioterapia é provavelmente o mais importante método pelo qual a tripanosomose é controlada em animais domésticos. O tratamento e a profilaxia da enfermidade nos bovinos, ovinos e caprinos é correntemente dependente de sais de três compostos: homidium, isometamidium e dimenazene. Em contraste os sais de três outros compostos são usados terapêuticamente em camelos, eqüinos e búfalos: suramin, quinapiramina e melarsomina (Peregrine e Mamman, 1993).

O tratamento da tripanosomose pode ser curativa, usando uma droga que dá pouca ou nenhuma ação residual ou preventiva. A diferença entre cura e prevenção depende da droga que está sendo usada e, em alguns casos, da dosagem que está sendo administrada. Algumas drogas são armazenadas nos tecidos e por uma lenta liberação na corrente circulatória mantém a concentração do composto ativo suficiente para controlar os tripanosomas (Peregrine, 1994). As drogas curativas são usadas quando a incidência é baixa, quando somente poucos casos ocorrem em um rebanho durante o período de um ano ou quando o tratamento de poucos casos ocorre principalmente durante uma estação a qual geralmente é a das chuvas.

12.3 Tratamento profilático

A profilaxia ou prevenção é requerida quando o gado está sob constante risco e quando a enfermidade ocorre em um alto nível durante o ano (Boyt, 1994).

12.4 Compostos correntemente em uso

A atual quimioterapia para a tripanosomose em animais domésticos depende de seis compostos, alguns dos quais são quimicamente relacionados. O Dimenazene, Homidium e isometamidium são primariamente usados para o tratamento e profilaxia da tripanosomose em bovinos, ovinos e caprinos. A Quinapiramina, suramin e melarsomina são primariamente usados como agentes terapêuticos para infecções com *Trypanosoma evansi*, embora a quinapiramina seja também usada para propósitos profiláticos. Estes três últimos compostos têm seu uso geralmente restritos à camelos, equídeos e búfalos (Peregrine, 1994).

A tabela 4 lista a dosagem, o nome comercial citado na literatura internacional, a espécie animal e a espécie do parasita contra qual é usada, e a tabela 5 lista os produtos disponíveis no mercado brasileiro.

12.5 Aceturato de diminazene

Diminazene é uma diamidina aromática e é comercializada em combinação com antipirina, que é um estabilizador que prolonga a atividade do composto em solução. Populações de *T. congolense* e *T. vivax* sensíveis ao produto são eliminadas por tratamento muscular a uma dosagem de 3,5 mg/kg. Desquesnes (comunicação pessoal) relatou a ocorrência na Guiana Francesa de uma cepa de *T. vivax* resistente ao Dimenazene. Inicialmente os experimentos com Dimenazene demonstraram uma atividade alta contra ambos *Trypanosoma* e *Babesia spp.* O Dimenazene subseqüentemente veio a ser o produto mais comumente usado nas tripanosomoses dos animais domésticos devido a um número de fatores: apresenta o mais alto índice terapêutico do que as outras drogas na maioria das espécies domésticas; atividade contra tripanosomas que são resistentes à outros tripanocidas usados em bovinos, apresenta uma baixa incidência de resistência (Peregrine e Mamman, 1993).

Tabela 4. Compostos quimioterapêuticos e quimioproláticos existentes no mercado internacional, usados para a tripanosomose animal (Peregrine, 1994).

Compostos	Nome Comercial	Dosagem mg/Kg	Rota	uso	Parasita	Animal
Aceturato de Dimenazene	Bernal® Veribem® Ganaseg® Ganatet ®*	3,5-7,0	i.m.	T	<i>T. congolense</i> (<i>T. vivax</i>) (<i>T. evansi</i>) (<i>T. brucei</i>)	Bovinos Pequenos ruminantes [Cães] [Equídeos]
Brometo de Homidium	Ethidium®	1,0	i.m.	T/P	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i>	Bovinos Pequenos Ruminantes [Equídeos]
Cloreto de Homidium	Novidium®	1,0	i.m.	T/P ^a	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i>	Bovinos Pequenos Ruminantes [Equídeos]
Cloreto de Isometamidium	Samorim® Trypamidium®	0,25-0,5 0,5-1,0	i.m. i.m.	T P	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> <i>T. brucei</i> <i>T. evansi</i>	Bovinos Pequenos Ruminantes Equídeos Camelos
Dimetilsulfato de Quinapiramina	Trypacide sulphate®	3,0-5,0	s.c.	T	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i>	Suínos Cães

91 *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: *Biologia, Diagnóstico e Controle*

					<i>T. brucei</i> <i>T. evansi</i> <i>T. simiae</i>	Equideos Camelos
Dimetilsulfato de Quinapiramina: Cloreto (3:2)	Trypacide Pro-salt®	3,0-5,0 ^b	s.c.	P	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> <i>T. brucei</i> <i>T. evansi</i> <i>T. simiae</i>	Suinos Cães Equideos Camelos
Suramin	Naganol®	7.0-10.0 ^c	i.v.	T(P)	<i>T. evansi</i>	Camelos Equideos
Melarsomina	Cymellarsan	0,25	s.c./i.m	T	<i>T. evansi</i>	Camelos

i.m.: intra-muscular; s.c.: sub-cutâneo; i.v.: intra-venoso; T: agente terapêutico; P: agente profilático; (): atividade limitada; []: pequeno índice terapêutico.

^aProfilaxia observada com baixo desafio de Tsé-tsé; ^bDosagem do sulfato; ^cGramas por animal; *Ganatot ®: Dimenazene em associação com Tetraciclina.

Tabela 5. Produtos usados no tratamento das tripanosomoses por *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* disponíveis no mercado brasileiro.

Nome Comercial	Parasita	Fabricante
Beronal	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> <i>T. brucei</i>	Quimio Produtos Químicos Com Ind Ltda
Tristeril	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> <i>T. brucei</i>	Probion-Ind. de Medicamentos Veterinários Ltda.
Hemo Clin	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> <i>T. brucei</i>	Embrasvet-Empresa Brasileira Veterinária Ltda.
Plasmosil	<i>Babesia spp</i>	Philips Couto Indústria Farmacêutica Ltda.
Babesin	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> <i>T. brucei</i>	Fagra-Farmagrícola S.A. Imp. & Exportação
Pirenthal	<i>T. congolense</i> <i>T. vivax</i> <i>T. brucei</i>	Minerthal Ltda.
**Ganatet	<i>Babesia spp</i> <i>Anaplasma spp</i>	Ciba Geigy Química S.A.
Ganaseg	Tripanosomose	Ciba Geigy Química S.A.
Nambiusol	Piroplasmose bovina e canina	Farmavet Produtos Veterinários Ltda.

*Os produtos têm como droga o aceturato de Diminazene. A dose recomendada é 3,5 mg/Kg por via intra-muscular.

**Apesar de nenhum dos fabricantes referir-se ao tratamento da tripanosomose pelo *Trypanosoma evansi* o Diminazene é efetivo na dosagem de 7,0 mg / Kg.

***Ganatet ®: Diminazene em associação com Tetraciclina.

12.6. Brometo/Cloreto de Homidium

O Homidium pertence à classe dos compostos da fenantridina e é fabricado tanto com o sal brometo como com o cloreto os quais são igualmente ativos em vivo. Ambos são recomendados como agentes terapêuticos à dosagem de 1,0 mg/Kg. Contudo, a mesma dosagem em bovinos, tem demonstrado atividade profilática, variando o período de proteção de 2 à 19 semanas à nível de campo.

12.7 Cloreto de Isometamidium

O Isometamidium é uma amidina aromática da fenantridina formada pela combinação do Homidium com a *p*-aminobenzamida diazotizada do Dimenazene e tem atividade profilática e terapêutica. A dosagem recomendada para fins profiláticos é de 0,5-1,0 mg/Kg, o composto tem sido usado com sucesso para manter a produtividade do gado zebú exposto ao desafio com a mosca tsé-tsé na África do leste. Contudo, considerável variação tem sido observada quando a dosagem de 1,0 mg/kg tem mostrado conferir profilaxia ao gado bovino por 2-22 semanas. Tais variações na atividade profilática parecem ser independentes do nível do desafio com tripanosoma e da presença ou ausência de infecção no período do tratamento. As variações na sensibilidade entre diferentes populações de tripanosomas parecem ser o maior fator determinante da duração da profilaxia.

12.8 Sulfato/Cloreto de Quinapiramina

A Quinapiramina é uma piramidina quinolina e é comercializada como sal sulfato como um agente terapêutico e em combinação dos sais sulfato e cloreto (3:2) para fins profiláticos. O produto foi amplamente utilizado na África entre 1950 e 1970 como agente terapêutico e profilático em bovinos. Contudo, sua fabricação cessou em 1974, devido a problemas com a toxicidade e resistência dos parasitas à droga. Em 1984 a droga foi novamente reintroduzida para o uso em camelos e cavalos. Seu uso não é recomendado em bovinos devido a aparente associação com resistência cruzada com outras drogas tripanocidas.

12.9 Suramin

Suramin foi pela primeira vez comercializado em 1920 e é o tripanocida mais antigo usado nos animais domésticos. É uma naftilamida sulfonada e tem sido usada como a droga de escolha para o tratamento de infecções

pelo *T. evansi* em cavalos e camelos por muitos anos, porque muitos outros tripanocidas são tóxicos para estas espécies. Porém, enquanto ele é ativo contra os tripanosomas do subgênero *Trypanozoon*, é inativo contra os tripanosomas *T. vivax* e *T. congolense*. No sangue o Suramin liga-se fortemente à proteínas plasmáticas e pode ser detectado por mais de 3 meses após o tratamento intravenoso, o qual conta para a sua atividade profilática. Porém, há uma grande variação individual na duração da profilaxia, então a administração profilática parece ser contra-indicada a menos que haja um alto nível de manejo veterinário. O Composto deixou de ser fabricado.

12.10 Melarsomina

A Melarsomina é um melaminil tioarsenito. O nome comercial Cymelarsan® é também conhecido como Mel Cy ou RM 110. O composto é ativo contra o subgênero *Trypanozoon*, particularmente o *T. evansi*. Em camelos a droga tem demonstrado efeito contra o *T. evansi* na dosagem de 0,2-1,25 mg/kg e em búfalos na dosagem de 0,25-3,0 mg/Kg. A dosagem padrão para camelos infectados com *T. evansi* é 0,25 mg/kg e deve ser usada no tratamento da tripanosomose aguda, subaguda e crônica. O produto não é usado profilaticamente.

13. Resistência à drogas

Dimenazene, Homidium, Isometamidium, Quinapiramina e Suramin têm sido usados no campo nos últimos 30 anos. De maneira similar há outros compostos que também tem sido usados por largos períodos, o uso de cada um destes 5 compostos tem sido associado com o desenvolvimento de resistência à drogas em muitas situações de campo. Devido ao fato de muitos desses compostos serem quimicamente relacionados, a resistência cruzada tem sido relatada tornando o problema ainda maior (Peregrine, 1994).

13.1 Mecanismos de resistência à drogas

A evidência de mecanismos implicados no desenvolvimento à drogas tripanocidas sugere que há uma troca na constituição genética, mutação e seleção. A teoria mutacional para a origem da resistência à drogas é suportada por observações que, ainda quando uma população de tripanosomas é derivada de um único parasita por clonagem, os tripanosomas pertencentes à esta população diferem na sua sensibilidade à

uma droga tripanocida em particular (Mutugi et al. 1995). Um exemplo deste acontecimento é dado por Peregrine et al. (1990): Em uma cepa de *T. congolense* com uma sensibilidade ao Berenil® na dosagem de 5,1 à 21 mg/Kg e ao Samorim® na dose de 1,5 à 5,1 mg/Kg originou uma população que mostrou ter sensibilidade ao Berenil® na dosagem de 35,7 mg/Kg e ao Samorim® na dose de 3,6 mg/Kg. Isto implica que, embora a população clonada original possuísse um nível particular de sensibilidade à droga, com a multiplicação a população aumentou e surgiram mutantes, os quais diferiram da população que lhes deu origem. Quando uma droga tripanocida é introduzida em uma população, os tripanosomas, os quais são resistentes à droga ao nível recomendado pelo fabricante, sobrevivem enquanto que aqueles que se mostram sensíveis são destruídos (Mutugi et al, 1995). Walker (1964) determinou que 10 tripanosomas resistentes em 1 milhão são suficientes para originar um isolado com fenótipo resistente.

Algumas características inatas dos tripanosomas sensíveis, tais como um crescimento rápido ou uma troca veloz nos tipos antigênicos variáveis, possibilitam ao parasita proliferar-se rapidamente e evadir-se da resposta imunológica do hospedeiro. Em oposição os tripanosomas resistentes à drogas estabelecem-se menos prontamente no hospedeiro vertebrado (Mutugi et al., 1995). De acordo com Cantrell (1956) ao estudar *T. equiperdum* resistente à drogas conclui que a maioria das cepas resistentes à drogas eram menos bem adaptadas à vida em ausência de droga do que a população original que lhe deu origem.

13.2 Métodos para identificar à resistência à drogas

De acordo com Peregrine (1994) vários métodos possibilitam a identificação de tripanosomas resistente à drogas, os quais citamos alguns.

13.2.1 Informações do campo

Estudos transversais sobre a prevalência da tripanosomose no campo não fornece informações sobre a prevalência a drogas. Contudo, estudos longitudinais podem ser usados para este propósito. Como exemplo é citado o caso de um estudo desenvolvido na Etiópia, onde foram coletados dados mensais de bovinos tratados com Dimenazene. O estudo permitiu distinguir a incidência de novas infecções de infecções recorrentes e demonstrou que a prevalência de infecções resistentes ao dimenazene aumentou de 6% em 1986 para 14% em 1989.

13.2.2. Grandes animais

Durante muitos anos para a caracterização de populações de tripanosomas (fenótipo) resistentes à drogas tem sido usado pequenos e grandes ruminantes. Os dados obtidos destes estudos podem ser diretamente aplicados no campo, porém, o alto custo da compra e manutenção dos animais por períodos superiores à 6 meses bem como o reduzido número de isolados ou cepas de tripanosomas que podem ser estudados restringe muito a utilização destes animais.

13.2.3. Animais de laboratório

Ratos e camundongos têm sido muito utilizados para o teste de resistência à drogas em função de seu baixo custo e menor tempo gasto para a realização dos testes (em geral 2 meses). Contudo, nem todos os tripanosomas isolados de casos que ocorrem no campo se desenvolvem em animais de laboratório. Outra conclusão importante é que parece não haver relação consistente entre os dados obtidos em animais de laboratório e em grandes animais. Então, não é possível a extrapolação de dados obtidos em pequenos animais para grandes animais.

13.2.4. Cultura

A utilização de métodos de cultura para o teste de drogas tem sido muito empregado por ser rápido e barato. Embora nem sempre seja possível extrapolar os resultados de métodos *in vitro* para animais vivos muitos pesquisadores têm encontrado boa correlação.

13.2.5. Resistência cruzada às drogas

A indução da resistência à Quinapiramina resulta em resistência cruzada ao Dimenazene. Resistência recíproca ocorre entre Quinapiramina, Homidium e isometamidium. Aconselha-se então, a usar juntos como curativos Homidium e Dimenazene e Isometamidium e Dimenazene, pois a indução de resistência à uma droga pode ser eliminada pela outra.

A Quinapiramina tem sido associada com os maiores problemas de resistência, pois em condições de campo pode induzir resistência cruzada ao Homidium, Isometamidium e Dimenazene. Não tem sido observada resistência cruzada entre Quinapiramina, Suramin e Melarsomina (Peregrine, 1994).

13.2.6. Variação na resistência ao suramin entre clones de *T. evansi*

Desde que clones de um só estoque de tripanosomas mostraram uma amplitude de sensibilidades ao Suramin então isolados do campo que são uma mistura de populações deve apresentar uma amplitude ainda maior (Mutugi et al., 1995)

14. Avaliação do uso do tratamento profilático estratégico ou curativo

Existem várias maneiras para se avaliar o uso de tratamentos curativos ou profiláticos estratégicos.

14.1. Índice berenil®

De acordo com Boyt (1994) o Índice Berenil® é baseado na utilização da droga Aceturato de Dimenazene cujo nome comercial mais conhecido é Berenil®. O Dimenazene tem um curto efeito preventivo sendo rapidamente excretado. Segundo o mesmo autor, por propósitos práticos o produto pode ser utilizado para estabelecer o desafio por tripanosoma em uma determinada área. Deve-se utilizar um rebanho experimental não menor que 10 bovinos. Amostras de sangue devem ser tomadas semanalmente e testadas através de exames parasitológicos. Por questões práticas recomenda-se o Teste do Microhematócrito e do "Buffy Coat". Os animais infectados devem ser tratados com Berenil®. O número de infecções registrados reflete a quantidade de infecções na área de estudo e isto, o desafio, expressa o número médio de infecções que cada animal poderá contrair em um ano. Para exemplificar citamos o mesmo exemplo do autor.

Em um rebanho de 25 bovinos um total de 35 casos de tripanosomoses foi detectado em um período de 16 meses.

Em 12 meses o número total de infecções calculado será:

35

_____ x 12

16

Porém isto é em 25 animais, então o número de infecções por animal por ano será;

35

$$\frac{\quad}{\quad} \times 12 \div 25 = 7/4 \times 3 \times 1/5 = 21/20 = 1,05$$

16

Índice Berenil® é considerado

. **Baixo:** 1-3. Significa que o desafio é baixo e os animais requerem apenas tratamentos curativos

. **Médio:** 4-6. Significa que o desafio é médio e os animais também requerem apenas tratamentos curativos.

. **Alto:** > 6. Significa que o desafio é alto e os animais necessitam de um tratamento profilático.

O ideal seria que em cada uma das regiões onde se registrou a presença do *T. vivax* fosse avaliado o índice Berenil®, porém esta avaliação é longa e exige testes semanais o que na maioria das vezes inviabiliza a realização do teste.

Sugerimos então, por razões práticas, que se considere como $\geq 20\%$ a prevalência limite. As Fazendas ou as regiões que apresentarem este índice deveriam iniciar um controle profilático estratégico.

15. Quimioterapia da Tripanosomose por *Trypanosoma evansi* (tratamento curativo)

Equinos

Em equinos experimentalmente infectados o suraminato de quinapiramina à dosagem entre 4mg e 50 mg/Kg protegeram contra um desafio experimental entre 6 meses e meio e vinte e seis meses e meio. A duração da proteção depende da dose, bem como do número de tripanosomas no desafio. Isto foi comparado com o suramin e quinapiramina (quinaldina), os quais protegeram somente por um ou dois meses respectivamente. O suraminato de quinapiramina causa um edema que pode perdurar por até 8 meses enquanto que as outras duas drogas normalmente não causam reação (Losos, 1980). O uso do Dimenazene é aconselhado na dose de 7,0 mg. Em cavalos aconselha-se utilizar a posologia de 0,5 mg/Kg por via endovenosa lenta.

Asininos

O sucesso do tratamento de burros infectados por *T. evansi* tem sido reportado com Samorin® (fenantridium) a uma dose de 2 mg/Kg sem o surgimento de nova parasitemia em um período superior à 70 dias (Losos, 1980). A dose recomendada para mulas é 3,5 mg/Kg (Peregrine e Mamman, 1993).

A dosagem curativa aconselhada pelo fabricante para Trypamidium® (isometamidium) é 0,25 à 2,0 mg/Kg .

Caninos

O tratamento de cães com Samorin® na dose de 1 a 2 mg/Kg em duas vezes com um intervalo de 25 a 30 dias produziu a cura sem o surgimento de nova parasitemia em um período superior à 70 dias. Porém, na dose de 4 mg/Kg causou severos sinais clínicos de intoxicação e reação inflamatório no local de aplicação do medicamento (Losos, 1980).

A dosagem curativa aconselhada pelo fabricante para Trypamidium® (isometamidium) é 0,5 à 1,0 mg/Kg .

Bovinos

Tratamento de bezerros *Bos taurus* e *Bos indicus* com dimenazene usando 10 mg/Kg de Berenil® em estágios terminais da enfermidade nos dias 41 e 42 da infecção tem sido registrado com sucesso (Losos, 1980). Tem sido demonstrada atividade tripanocida no soro de bovinos tratados com Dimenazene na dose de 7,0 mg/Kg por um período superior à 21 dias (Peregrine e Mamman, 1993). O Suramin pode ser usado na dosagem de 3g por animal (Peregrine, 1994). A dosagem curativa aconselhada pelo fabricante para Trypamidium® (isometamidium) é 1,0 mg/Kg.

Bubalinos

A dose para eliminar infecções varia de 3,5 mg/Kg à 16 mg/Kg (Peregrine e Mamman, 1993). O Suramin pode ser usado na dosagem de 3g por animal (Peregrine, 1994). A Melarsomina tem sido usada em búfalos na China na dose de 0,25 à 3,0 mg/Kg (Peregrine, 1994)

Camelos

A dosagem recomendada de Cymelarsan[®] é 0,25 mg/Kg. Um frasco de 100mg corresponde à um animal de 400Kg. Esta droga também tem sido usada em eqüinos.

16. Quimioterapia da Tripanosomose por *Trypanosoma vivax* (tratamento curativo)

Bovinos

A dosagem curativa aconselhada pelo fabricante para Trypamidium[®] (isometamidium) é 0,25 à 0,5 mg/Kg. Cloreto de Homidium (Novidium[®]) dosagem por animal: 1mg/Kg. O *T. vivax* é resistente ao Suramin (Naganol[®])

Bubalinos

A dosagem curativa aconselhada pelo fabricante para Trypamidium[®] (isometamidium) é 0,25 à 0,5 mg/Kg.

Ovinos e Caprinos

A dosagem curativa aconselhada pelo fabricante para Trypamidium[®] (isometamidium) é 0,25 à 0,5 mg/Kg.

17. Controle estratégico do *Trypanosoma evansi* através do uso de drogas tripanocidas

Equínos

Quinapiramina Sulfato e Quinapiramina Cloreto (Triquin®)

Em áreas endêmicas o Triquin® deveria ser injetado à cada 2 à 3 meses o que corresponde 6 à 4 aplicações anuais.

De acordo com o Dr. Brian Hursey (F.A.O, comunicação pessoal, 1996) o Trypamidium ® / Samorin ® pode ser administrado em uma dosagem de 0,5 mg/Kg. Em relação a bovinos, seguir o mesmo plano, ou seja, administrar com intervalos de 3 à 4 meses o que corresponde à 3 ou 4 aplicações por ano.

18. Controle estratégico do *Trypanosoma vivax* através do uso de drogas tripanocidas

Bovinos

Isometamidium

- **Trypamidium ® / Samorin ®**

O Trypamidium ® / Samorin ® são administrados com intervalos de 3 à 4 meses o que corresponde à 3 ou 4 aplicações por ano. Em uma dosagem de 0,5 mg/Kg.

Equínos

De acordo com o Dr. Brian Hursey (F.A.O, comunicação pessoal, 1996) o mesmo tratamento pode ser empregado para equínos.

18.1. Programa de profilaxia recomendado para o trypanidium ®

No primeiro ano do controle estratégico deve-se fazer 4 aplicações com intervalos de 3 meses entre elas. Nos anos subsequentes do controle são feitas apenas 3 aplicações com intervalos de 4 meses entre elas.

Obs: Durante a utilização continuada do Trypanidium ® é recomendável que se use uma vez ao ano o Dimenazene para evitar o surgimento de resistência ao produto. O uso do isometamidium permite combater a resistência à Quinapiramina e ao Dimenazene.

O uso do isometamidium na dose de 1 mg/Kg permite combater a resistência ao Homidium, apesar de ambos pertencerem à mesma família química.

Brometo de Homidium

- **Ethidium®**

Em uma dosagem de 0,5 mg/Kg confere uma proteção de 8 à 17 semanas (6 semanas em média). Dolan et al. (1990) obtiveram proteção for de 19 e 17 semanas.

dois tratamentos ao ano.

19. Comparação do Isometamidium e Brometo de Homidium como droga profilática

Em um estudo desenvolvido por Stevenson et al. (1995) no Quênia observou-se que o intervalo médio entre os re-tratamentos foi de $7,5 \pm 1,9$ semanas para os animais tratados com Isometamidium e $4,6 \pm 2,1$ semanas para os animais tratados com Homidium. Apesar da necessidade de tratamentos mais freqüentes no grupo do homidium quando comparado com o grupo do Isometamidium, o custo total da droga foi menos no primeiro. Houve evidencia de resistência ao Isometamidium por *T. vivax*.

20. Mecanismos experimentais de liberação lenta contendo Brometo de Homidium e Isometamidium

Um mecanismo de liberação de drogas (SRD, slow release device) foi desenvolvido por Kageruka et al. (1996). Dois experimentos foram executados para avaliar o efeito de um mecanismo SRD biodegradável

contendo isometamidium ou brometo de homidium. Coelhos receberam implantes subcutâneo com SRD e desafiados com diferentes estoques de *Trypanosoma congolense* a intervalos de 1 e 6,5 meses após o tratamento. No primeiro experimento a eficácia dos dois tipos de isometamidium-SRD (poly(D,L-lactide) e poly(D,L-lactide-co-glycolide) foi comparado com a clássica injeção da droga via intramuscular (i.m.). O primeiro composto mostrou um período médio de proteção, o qual foi maior que a outra formulação do isometamidium; um segundo experimento foi executado para avaliar o efeito profilático do poly(D,L-lactide) SRD, contendo isometamidium ou homidium bromide, com injeções via intramuscular (i.m.) das mesmas drogas na dosagem de 1mg/kg¹. O período de proteção médio do homidium bromide SRD foi significativamente grande quando comparado com a droga injetada via i.m. (112 vs. 49 dias). Não se obteve diferença significativa quando o isometamidium foi administrado como um SRD ou como uma injeção i.m. Os períodos médios de proteção foram, respectivamente, 106 ± 37 dias e 84 ± 18 dias. Quando a ruptura de isolados derivados de animais tratados com SRD foram comparados com os estoques originais de *T. congolense*, o primeiro mostrou algumas perdas de sensibilidade ao homidium bromide. Não foi observada diferença na sensibilidade para o isometamidium.

20.1 Apresentação dos produtos e recomendações dos fabricantes

Isometamidium

- Trypamidium ® / Samorin ®

Nome do Fabricante: Rhone Mérieux

Indicação: é particularmente ativo contra as infecções de bovinos (zebuiños e taurinos) por *T. vivax*, *T. congolense* e *T. brucei*; de pequenos ruminantes (ovinos e caprinos) por *T. vivax* e *T. congolense*, equídeos por *T. vivax*, *T. evansi*, *T. congolense* e *T. brucei*; búfalos por *T. evansi* e cães por *T. evansi* e *T. brucei*. O produto é vendido na forma de pó que pode ser misturado à água estéril (fervida) para obter uma concentração à 1% (1g do produto par 100ml de água. O produto após o seu preparo é estável por 24 à 48 horas a uma temperatura de + 4° C à + 15° C (temperatura de geladeira).

Aplicação: via intramuscular profunda. Os cavalos são mais sensíveis a injeção podendo ocorrer edema e reação inflamatória no local. Solução à 1%: diluir um sachê de 1g em 100 ml de água (ou 1 sachê de 125 mg em

12,5 ml de água). A dosagem recomendada pelo fabricante está listada na tabela 6.

Tabela 6. Dosagem recomendada pelo fabricante para a aplicação do Trypamidium.

Peso do animal	0,5 mg/Kg	1 mg/Kg
50	2,5 ml	5,0 ml
100	5 ml	10 ml
150	7,5 ml	15 ml
200	10 ml	20 ml
250	12,5 ml	25 ml
300	15 ml	30 ml
350	17,5 ml	35 ml
400	20 ml	40 ml
450	22,5 ml	45 ml

Apresentação: Caixa com 20 saches de 1g, Caixa com 10 saches de 125 mg e embalagem com 10 g.

Recomendações:

Não misturar o produto com outras drogas.

Não utilizar outra droga tripanocida no prazo de duas à quatro semanas.

Quando aplicar volumes grandes, dividir a aplicação.

Não consumir produtos dos animais tratados no prazo de 30 dias.

Não consumir a carne no ponto da injeção do produto.

Não inalar o produto e lavar as mãos após o manuseio.

Indicações adicionais:

Produto indicado em zonas infestadas por vetores, para prevenir a infecção.

Para animais que permanecem na zona.

Para prevenção da enfermidade.

Para evitar a disseminação da enfermidade à outros animais.

Para animais que atravessam zonas infestadas.

Para reduzir a pressão parasitária.

Para melhorar a performance e produtividade do rebanho (o *T. vivax* provoca aborto e emagrecimento progressivo).

Melarsomina

- **Cymelarsan®**

Nome do Fabricante: Rhone Mérieux

Indicação: é particularmente ativo contra *T. evansi* *.

Aplicação: via intramuscular profunda.

Apresentação: 100 mg de pó em um frasco de 20 ml.

Preparação: preparar uma solução à 0,5 % dissolvendo o pó liofilizado em 20 ml de água, depois utilizar rapidamente a solução.

Dosagem recomendada: 0,25 mg/Kg. Um frasco de 100mg corresponde à um animal de 400Kg (Tabela 7)

Quinapiramina Sulfato e Quinapiramina Cloreto

- **Triquin®**

Nome do Fabricante: Worckhardt (Europe) Ltd. Dublin Ireland.

Indicação: é particularmente ativo contra *T. evansi* .

Aplicação: via subcutânea.

Triquin®, dosagem por animal: 0,025 ml/Kg

Injetar 15 ml de água estéril no frasco

Tabela 7. Dosagem recomendada pelo fabricante para a aplicação do Cymelarsan®.

Peso do animal	Dosagem
50 Kg	2,5 ml
100 Kg	5,0 ml
150 Kg	7,5 ml
200 Kg	10,0 ml
250 Kg	12,5 ml
300 Kg	15,0 ml
350 Kg	17,5 ml
400 Kg	20,0 ml
450 Kg	22,5 ml
500 Kg	25,0 ml

* O Cymelarsan ® é normalmente indicado para infecções em camelos. Injetar 20 ml de água estéril no frasco.

Recomendações: Não consumir produtos dos animais tratados por um período de 14 dias.

Cloreto de Homidium

- **Novidium ®**

Nome do Fabricante: Rhone Mérieux

Indicação: é particularmente ativo contra *T. vivax* e *T. congolense*.

Aplicação: via intramuscular profunda.

Novidium ®, dosagem por animal: 1mg/Kg (Tabela 8)

Tabela 8. Dosagem recomendada pelo fabricante para a aplicação do Novidium®

Peso	Volume de uma solução de ,25%
100 Kg	4 ml
150 Kg	6 ml
200 Kg	8 ml
250 Kg	10 ml
300 Kg	12 ml
350 Kg	14 ml
400 Kg	16 ml
450 Kg	18 ml
500 Kg	20 ml

Recomendações:

Não misturar o produto com outras drogas.

Não utilizar outra droga tripanocida no prazo de duas à quatro semanas.

Quando aplicar volumes grandes, dividir a aplicação.

Lavar as mãos após o manuseio.

Apresentação: Frasco de 100 comprimido com 250 mg de cloreto de Homidium.

Obs: Para evitar resistência deve-se utilizar alternadamente Diminazene (Berenil® , Hoechst) ou Isometamidium (Trypamidium , Samorin - Rhône Mérieux)

Confere proteção por 6 semanas.

Brometo de Homidium

- Ethidium®

Nome do Fabricante: CAMCO-Cambridge Animal and Public Health Limited.

Indicação: é particularmente ativo contra *T. vivax* e *T. congolense*.

Aplicação: via intramuscular profunda.

Ethidium®, dosagem por animal: 1mg/Kg (Tabela 9)

Tabela 9. Dosagem recomendada pelo fabricante para a aplicação do Ethidium®.

Peso	Volume de uma solução de ,25%
100 Kg	4 ml
150 Kg	6 ml
200 Kg	8 ml
250 Kg	10 ml
300 Kg	12 ml
350 Kg	14 ml
400 Kg	16 ml

Apresentação: Frasco de 100 comprimido com 250 mg de brometo de Homidium.

Obs: Após a preparação pode ser usado até 3 semanas sem refrigeração.

Usar alternadamente com o dimenazene para evitar resistência.

21. Análise econômica

21.1 Escolha da estratégia de tratamento: o risco da tomada de decisão sob condições incertas

Pode ser seguramente assumido que a decisão do fazendeiro de tratar ou não os animais para *T. evansi* e *T. vivax* está baseada no aspecto econômico. O problema do fazendeiro é de minimizar o custo líquido esperado da doença ao longo do tempo. A escolha entre estratégias alternativas de tratamento não é trivial nem simples. Em ordem, para avaliar suas alternativas, o fazendeiro deve possuir ou obter um profundo conhecimento do risco de infecção em sua fazenda, o provável efeito da infecção, as opções de tratamentos disponíveis e os custos esperados de cada opção. Especificamente a decisão do fazendeiro pode ser facilitada pela estimativa dos seguintes valores:

- Taxa anual esperada de infecção em sua fazenda (X1);
- Número de animais potencialmente afetados em sua fazenda (X2);
- Custos de reposição destes animais (X3);
- Efeito esperado da doença (X4)

108 *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: *Biologia, Diagnóstico e Controle*

- Custo estimado dos serviços veterinários (X5)
- Custo estimado dos testes diagnóstico (X6);
- Custos estimado do tratamento (X7);
- Custo estimado e a capacidade para coletar os animais para tratamento por dia (X8).

O custo anual total estimado deveria ser estimado para cada uma das opções de estratégias dos fazendeiros para a conduta com relação à doença, incluindo a possibilidade de não fazer nada. A solução resultante no menor custo estimado anual é a estratégia preferível em termos econômicos empregando esta metodologia. A avaliação das estratégias alternativas pode ser feita mais acuradamente e mais complicada tanto mais completa forem as informações disponíveis. A qualidade da tomada de decisão econômica é altamente dependente das informações epidemiológicas e clínicas disponíveis.

21.2. Metodologia para uma fazenda em uma área de alto, médio e baixo desafio pelos vetores

Um exemplo é dado usando esta metodologia para uma fazenda em uma área de alto, médio e baixo desafio pelos vetores usando quatro regimes de tratamento: (1) sem tratamento, (2) tratamento curativo, (3) tratamento curativo estacional; (4) tratamento preventivo.

Perfil da Fazenda e Valor

Uma fazenda de tamanho médio (7,200 -14,400 ha.) contém 3.012,43 bovinos e 59,19 eqüinos em média. Embora o preço dos cavalos varie grandemente um valor aproximado de R\$ 375,00 pode ser usado como exemplo. As fazendas de bovinos de corte no Pantanal apresentam em média uma proporção de um touro para 10 vacas. Então esta fazenda teria aproximadamente 274 touros e 2.738 vacas. Usando os preços de 1995 o valor do rebanho desta fazenda é de R\$ 681.012,04 (Tabela 10).

Tabela 10. Características da fazenda usada no exemplo.

Variável	Eqüinos (X _a)	Bovinos (X _b)
Número Total dos Animais Total (X ₂)	59	3.012
Custo de Reposição por animal (X ₃)	375	274 (touro), 2.738 (vacas)
Custo da reposição Total (Valor) (X ₂ x X ₃)	22.125	388,47(touros), 201,47 (vacas)
		658.887
		552.446 (vacas), 106.441(bulls)

Riscos e perdas animais esperadas pela infecção e tratamento

Esta fazenda pode estar localizada em uma área de baixo, médio ou alto desafio pelos vetores e está sujeita a baixo, médio ou alto risco de infecção pelos tripanosomas. A eficiência das estratégias alternativas de tratamentos podem diferir com as categorias de risco. Uma exploração dos graus diferenciais de impacto sobre as perdas anuais esperadas e a eficácia das estratégias de tratamento é ilustrada. Aqui os valores de alto, médio e baixo risco são assinalados pelos seguintes valores: 70%, 40% e 10%, respectivamente (Tabela 11).

Tabela. 11. Taxa anual esperada de infecção e perdas de animais.

Estratégia de Tratamento	Perdas de Animais esperadas (X ₁)		
	Alto Risco de Infecção (70%)	Médio Risco de Infecção (40%)	Baixo Risco de Infecção (10%)
Sem Tratamento	2.150	1.228	302
Bovinos	2.109	1.205	301
Eqüinos	41	23	1
Cura Anual	215	123	30
Bovinos	211	121	30
Eqüinos	4	2	0.1
Cura Estacional	408	233	58
Bovinos	401	229	57
Eqüinos	8	4	1
Tratamento Preventivo	0	0	0

Uma suposição simplificada de que o *T. vivax*, semelhante ao *T. evansi*, resulta em algumas mortes de animais infectados que não receberam tratamento e que os animais tratados recuperam-se totalmente. Como resultado a estratégia de não tratar os animais implica em perdas anuais do rebanho equivalentes à taxa de risco multiplicada pelo tamanho do rebanho. A aplicação anual de um tratamento curativo estratégico é estimado em uma perda no rebanho de 10% devido ao tempo entre a detecção da doença e o tratamento. Estima-se que na alta estação dos vetores uma aplicação do tratamento seguida pelo não tratamento na estação da seca resulte em 19% de perdas devido à estratégia. O risco de infecção multiplicado pelas perdas estimadas e o tamanho do rebanho revelam as perdas de animais anuais para cada uma destas estratégias. Uma estratégia preventiva é considerada ser 100% efetiva, então, não ocorrem perdas de animais sob qualquer condição de risco.

Custo de investimentos nos tratamentos para tripanosomas

Os custos e benefícios das alternativas de tratamentos estratégicos, incluem não somente as perdas animais, mas também o custo de administração dos tratamentos. Estes custos geralmente podem ser divididos em custos do veterinário, custos dos exames diagnósticos e custos da administração dos medicamentos incluindo neste item, o custo para a coleta dos animais. Os custos diretos da adoção das alternativas estratégicas fora as perdas de animais constituem o investimento esperado pelo fazendeiro (Tabela 12).

Veterinário, custos diagnóstico, e custos para tratamento curativo são maiores sob condições de maior risco devido a maior prevalência antecipada das enfermidades. Cada surto da doença requer uma visita do veterinário e um exame diagnóstico. Em média há maior risco de infecção, a maior frequência de surtos e a maior necessidade de tratar os animais.

Tabela 12. Custo anual esperado do tratamento (em R\$).

Tratamento e Nivel de Risco	Custo do Veterinário (por animal) (X5)	Custo do Exame Diagnóstico (por animal) (X6)	Custo do Tratamento (por animal) (X7 + X8)	
			Bovino	Equino
Tratamento Curativo				
Alto	14,62	87,71	3,29	6,26
Médio	8,35	50,12	1,88	3,57
Baixo	2,09	12,53	0,47	0,89
Tratamento Curativo (Estacional)				
Alto	13,16	78,94	2,96	5,63
Mdio	7,52	45,11	1,69	3,21
Baixo	1,88	11,27	0,42	0,80
Tratamento Preventivo				
Alto	0	0	37,83	23,92
Médio	0	0	37,83	23,92
Baixo	0	0	37,83	23,92

Como uma visita de um veterinário será suficiente para um grande número de animais em uma fazenda grande, o maior custo efetivo será em um tratamento curativo. Os custos dos tratamentos são diferentes para bovinos e para equínos, porque as doses recomendadas e o peso médio dos animais são diferentes. Os custos das coletas são considerados equivalentes para bovinos e equínos e considera-se como diluídos no rebanho. Tratamentos preventivos não requerem visitas de veterinários, mas requerem a coleta e tratamento dos animais sob risco. Então, quanto maior o risco mais efetivo será o custo da estratégia preventiva

Custo total anual de alternativas estratégicas

As perdas anuais estimadas para cada alternativa estratégica podem ser calculadas pela multiplicação do preço de reposição de cada animal pelo número antecipado de perdas de animais. O investimento anual estimado requerido para cada alternativa estratégica pode ser calculado pela multiplicação da soma dos custo do veterinário por animal, diagnóstico e tratamento em cada categoria de risco pelo número de animais

potencialmente afetados. Quando os custos diferem em função das espécies, então este investimento pode ser calculado levando em conta as espécies bases (por exemplo bovinos de corte em uma fazenda do Pantanal). O custo total anual esperado das alternativas estratégicas é a soma das perdas de animais e o investimento requerido por estratégia para cada categoria de risco em potencial (Tabela 13).

Deve-se chamar a atenção para o fato de que a estratégia ótima minimiza os custos anuais esperados causados por tripanosomas para o fazendeiro.

Tabela 13. Custo anual esperado das alternativas estratégicas sob risco variável

Estratégia	Alto Risco	Médio Risco	Baixo Risco
Sem tratamento	476.718,75	272.218,75	66.218,00
Cura anual	363.190,50	212.653,31	52.733,67
Cura estacional	382.498,44	218.500,15	54.539,64
Prevenção	115.355,24	115.355,24	115.355,24

Se o fazendeiro tem uma propriedade em uma região que apresenta um risco médio ou alto de infecção por tripanosoma a estratégia preventiva é a mais adequada, ou se possui uma propriedade em uma região que apresenta um risco baixo de infecção por tripanosoma a estratégia mais adequada é a curativa. Ambas estratégias curativas tem demonstrado ser economicamente justificáveis sob todas as condições de risco. A estratégia anual curativa é considerada consistentemente superior à estratégia preventiva, visto que esta última não é economicamente sob condições de baixo risco.

A decisão de implementar alternativas estratégicas custosas para os tripanosomas deveria também ser avaliada contra os custos e benefícios de outros investimentos em potenciais. O investimento anual esperado da razão de retorno fornece a medida do potencial de investimento de cada estratégia que pode ser comparado à outros usos dos recursos (Tabela 14). Esta razão pode ser calculada dividindo a diferença entre as perdas esperadas do não tratamento e cada uma das alternativas estratégicas pelo investimento financeiro requerido para implementar cada estratégia por categoria de risco. O retorno anual esperado do tratamento para

trypanosoma deveria não somente ser positivo, mas também ser maior do que alguma outra estratégia alternativa de investimento para ser economicamente justificável do ponto de vista do fazendeiro.

Tabela 14. Investimento anual esperado para a razão do retorno da alternativa estratégica.

Estratégia	Alto risco	Risco Médio	Baixo Risco
Cura anual	1 : 1,35	1 : 1,32	1 : 1,29
Cura estacional	1 : 1,32	1 : 1,32	1 : 1,28
Prevenção	1 : 4,13	1 : 2,36	1 : 0,57

Em uma região de alto risco, cada Real investido na prevenção resulta em um retorno de R\$ 4,00 em uma região de alto risco ou 313% de retorno sobre o investimento. Contudo, em uma região de baixo risco o investimento de Reais na prevenção teria um retorno de somente R\$ 0.57 ou uma perda anual esperada de 43%. O retorno para os tratamentos curativos variam de 28% à 35% por ano.

Conclusões

Esta metodologia pode ser facilmente extrapolada para o nível municipal ou regional com informação acurada suficiente. Empregando esta abordagem, um estudo do impacto da infecção pelo *T. evansi* no Pantanal revelou que o custo anual é superior à R\$ 1,5 milhões. Este estudo encontrou que, baseado em médias regionais, a melhor estratégia para mitigar o efeito econômico da infecção do *T. evansi* em equinos do Pantanal foi uma aplicação anual de um tratamento curativo com Diminazine. Um tratamento preventivo com isometamidium foi observado ser economicamente justificável, porém mais custoso que o tratamento curativo. Aqui nós demonstramos que a estratégia ótima individual pode diferir significativamente da melhor estratégia disponível par uma perspectiva regional. Em geral as estratégias preventivas podem ser indicadas para as regiões de maior risco e para as fazendas de menor tamanho. Por outro lado, em regiões de menor risco e em fazendas maiores as opções curativas são mais indicadas.

22. Controle dos vetores

22.1. Controle biológico dos vetores

Os meios biológicos para o controle de vetores de enfermidades são alternativas, aos produtos químicos, razoáveis e não danosas ao meio ambiente. Eles incluem fatores que ajudam a reduzir as populações dos vetores abaixo do limiar da transmissão eficiente, o que impede a transmissão do patógeno no vetor ou promove trocas no patógeno de tal forma que ele não é transmissível no vetor. O requerimento básico para tais meios é ter a nossa disposição uma produção do fator biológico em massa e ser hábil para manejar a interação do vetor e do patógeno transmitido (Weiser, 1991).

22.1.1. Controle biológico de tabanídeos (Desquesnes y de la Roque, 1994)

As informações aqui contidas são provenientes de trabalhos desenvolvidos na Guiana Francesa pelos Drs Desquesnes e La Roque do Instituto Pasteur da Guiana Francesa.

Estágio de ovo

Cerca de 74% dos ovos postos por *Tabanus importunus* podem ser destruídos por pequenos insetos heminópteros. Segundo os autores este método de controle é insuficiente, porém não é desprezível no controle da população de tabanídeos. A aplicação de inseticidas para o controle dos tabanídeos também significa a destruição destes pequenos insetos heminópteros.

Estágio larval

Existem vários inimigos naturais dos tabanídeos entre eles estão fungos, nematóides, algumas moscas e pássaros, porém até o momento não tem sido possível avaliar o seu controle.

Estágio adulto

Nas Guianas existem dois tipos de predadores dos tabanídeos: as vespas e os pássaros insetívoros.

A) Vespas da areia

Na Guiana Francesa são conhecidas como “Vespas Protetoras do Cavalo” e em países de língua hispânica são conhecidas como “Avispas Policías”. As espécies identificadas foram as seguintes:

Gênero *Sticitia*: *Sticitia signata*, *S. maculata*, *S. hero*.

Gênero *Rubrica*: *Rubrica surinamensis*.

Gênero *Bicyrtes*: *Bicyrtes variegata*, *B. angulata*.

Estas vespas são predadoras dos dípteros e em particular dos tabanídeos. A fêmea ronda ao redor do gado para capturar tabanídeos e os mata com o seu ferrão venenoso e, posteriormente, os leva onde colocou seus ovos. As larvas alimentam-se de tabanídeos e de outras moscas capturadas. Uma vespa pode capturar de 3 a 9 insetos por dia para alimentar até 10 larvas. Uma larva de vespa pode devorar até 40 insetos e desta maneira uma vespa pode eliminar até 300 tabanídeos durante o seu ciclo de vida. De acordo com os autores estas vespas tem muito pouca atividade durante o amanhecer e ao entardecer, cujo período corresponde ao de maior atividade dos tabanídeos. Outra desvantagem deve-se ao fato de que é raro encontrar vespas no mês de novembro, quando os tabanídeos atingem seu pico populacional máximo. Os autores recomendam que em propriedades onde o solo não seja arenoso, sejam colocadas caixas com areia nos poteiros para que as vespas possam fazer seus ninhos.

A recomendação final é de que se forem aplicados inseticidas para o controle dos tabanídeos deve-se fazer uma avaliação prévia para que se evite a destruição das vespas da areia e outros insetos benéficos.

B) Pássaros insetívoros

Segundo os autores poucos pássaros contribuem para a eliminação dos tabanídeos. Entre eles o de maior efetividade é a “Garza Copetona” que no Pantanal é conhecida como “Garcinha Vaqueira”. Ela captura os tabanídeos quando param no animal para picá-lo. Alguns animais são continuamente escoltados em número de uma a duas por animal.

Um pássaro cujo nome científico é *Crotophaga ani*, conhecido na Guiana Francesa como “Pájaro Diabolo” ou “Pájaro Azulado” é menos eficaz na captura, porém também útil pois captura os tabanídeos não diretamente no gado e sim próximo à cercas e currais.

As galinhas são também eficientes na captura dos tabanídeos.

23. Controle através do uso de inseticidas

O controle dos vetores dos tripanosomas da seção salivária tem sido usado de forma intensiva principalmente na África para o controle da tripanosomose animal e humana. O controle é baseado principalmente na utilização de inseticidas.

23.1. Propriedade requeridas de um inseticida segundo a F.A.O. (Food and Agricultural Organization of the United Nations)

- Alto nível de toxicidade para as várias espécies do vetor*

O inseticida ideal deveria necessitar somente uma pequena quantidade para matar o vetor e não ter nenhum efeito para algum outro animal na dosagem usada.

- Fácil para preparar em formulações adequadas.

A eficiência química do produto e o grau pelo qual ele pode ser adaptado para o uso prático depende amplamente de como ele pode ser processado em uma formulação utilizável. Para tanto ele deve preencher os seguintes requisitos:

a) Fácil de transportar em quantidades suficientes para áreas remotas e relativamente isoladas; onde, se necessário, possa ser diluído conforme o desejado.

b) Fácil de aplicar e aderente à superfície seja ela poupa ou animal.

c) Prontamente transferível para o vetor após um breve contato. O inseticida deve ser suficientemente tóxico que a dose letal deve ser transferida para a mosca logo após o breve contato.

d) Rapidamente absorvido através da cutícula e entre no inseto de modo que a morte ocorra relativamente rápido.

e) Uma vez aplicado, ele deve ser estável à uma grande variabilidade de condições climáticas. Ele não deve ser rapidamente degradado pela luz do sol ou facilmente lavado da superfície de contato pelas chuvas.

f) Deve ter baixo custo.

* neste caso, espécies de tsé-tsé.

23.2. Inseticidas

Discutiremos apenas a utilização de inseticidas piretróides, pois eles são os mais aconselháveis para regiões de grande diversidade na fauna e flora, pois as piretrinas obtidas naturalmente de plantas são altamente tóxicas para os vetores porém quase sem toxicidade para os mamíferos e aves.

Atualmente as principais formas de utilização dos inseticidas são pour on, onde o inseticida é aplicado diretamente sobre o animal e em armadilhas impregnadas. Porém durante muitos anos algumas outras formas de controle empregando inseticidas, as quais não são mais utilizadas, serão citadas a seguir.

23.3. Aplicação de inseticidas na vegetação

Esta técnica foi baseada na aplicação de um inseticida residual para moscas na vegetação arbustiva de tal forma que as moscas morriam ao pousar nesta vegetação. Os inseticidas utilizados permaneciam ativos por um período de pelo menos 2 meses, período este correspondente à duração do período pupal da mosca tsé-tsé. A vegetação era tratada até uma altura de 0,75-4m e sua aplicação feita no período da seca para evitar que o produto fosse lavado durante as chuvas. Os inseticidas mais utilizados foram o DDT, dieldrin, endosulfa e piretróide.

23.4. Pulverização aérea de inseticidas

Helicópteros e pequenos aviões foram intensivamente usados na pulverização para o controle da tripanosomose animal. Os helicópteros foram muito usados na África do Oeste para a aplicação de compostos organoclorados na vegetação próxima a rios e linha de drenagens. Posteriormente foram utilizados inseticidas piretróides. A grande desvantagem deste método, sem contar os efeitos ambientais, foi a necessidade de repetir a aplicação 5 vezes com intervalos de 10 dias e o custo da aplicação. Vários efeitos danosos ao meio ambiente foram detectados entre eles a extrema toxicidade do endosulfan a fauna aquática.

24. Piretroides

24.1. Apresentação dos piretróides e recomendações dos fabricantes.

a) Deltamethrin

Nome comercial: Butox

Fabricante: Químio Produtos Químicos Com. E Ind. S.A.

Composição: À base de piretróide sintético. Cada 1000ml contém: deltametrina (100%) 50g veículo q.s.p. 1000ml.

Indicações: Como carrapaticida, para eliminar as larvas, ninfas, machos, fêmeas e impossibilitar a postura de ovos férteis do *Boophilus microplus*. Eficiente contra todas as cepas de carrapatos, inclusive as resistentes à produtos organofosforados.

Apresentação: Frascos de 1 litro.

Nome comercial: Butox Berne

Fabricante: Químio Produtos Químicos Com. E Ind. S.A.

Composição: Cada 100ml contém: deltametrina 0,4g; DDVP 40g; veículo q.s.p. 100ml.

Indicações: Como bernericida para eliminar as larvas de 1º, 2º e 3º estágios da *Dermatobia hominis*, conhecida como mosca do berne. Como carrapaticida para eliminar as larvas, ninfas, machos, fêmeas e impossibilitar a postura de ovos férteis do *Boophilus microplus*. Como mosquicida e repelente das moscas vetoras do berne (*Dermatobia hominis*), como *Stomoxys calcitrans* (Mosca do estábulo), *Musca doméstica* (Mosca doméstica) e *Morellia pruna*. Como piolhicida para eliminar as larvas, ninfas, machos e fêmeas e impossibilitar a postura de ovos férteis do *Haemotopinus eurytarnus* e *Linognathus vituli*.

Modo de aplicação: Qualquer tipo de pulverização, manual ou mecânica, poderá ser utilizado, tomando cuidado para que o jato tenha pressão adequada para penetrar por baixo dos pêlos onde estão agarrados os carrapatos, como entrepernas, patas, tábua do pescoço, cabeça, pavilhão auricular, região do períneo e base da calda, assim como fazer com que o produto atinja diretamente os nódulos dos bernes nas diversas partes do

corpo. Para se obter uma boa eficácia e atingir todas as partes infestadas, pulverizar um bovino adulto com o mínimo de 5 litros de calda.

Dosagens e modo de usar: É aplicado exclusivamente por via externa em banhos de aspersão (pulverização), após prévia diluição em água. A diluição recomendada é de 10 partes de Butox Berne para 2 partes de água, ou seja, 10ml de Butox Berne para 2 litros de água (10ml: 2 litros de água).

Preparação da diluição: Medir a quantidade exata de Butox Berne e fazer uma pré-mistura em um balde com 2 a 4 litros de água. Agitar até formar uma emulsão homogênea. Despejar a pré-mistura no pulverizador e, agitando sempre, completar o volume com o restante de água necessária para a pulverização dos bovinos a serem tratados. Não misturar a calda preparada com Butox Berne com outros piretróides ou organofosforados.

Apresentação: Frascos de 100ml e 500ml.

b) Cypermethrin

Nome comercial: Barrage

Fabricante: Shell Brasil S.A- Div. Química.

Composição: Concentrado emulsionável contendo 150g/litro de Cypermethrin

Indicações: Carrapaticida e mosquicida piretróide para bovinos, para o controle de carrapatos, moscas em geral, mosca de chifre, piolhos e sarna que atacam bovinos e suas instalações.

Modo de aplicação: Através de banhos de imersão (banheiros), pulverização (pulverizadores manuais ou motorizados) e através de corredores de aspersão.

Dosagens e modo de usar: Banhos de imersão (banheiros): Carga: diluir 1 litro de Barrage em 1000 litros de água (1:1000). Recarga: 1,5 litros de Barrage em 1000 litros de água (1,5:1000). Homogeneizar bem a calda no banheiro antes de banhar os animais. Através de pulverização sobre bovinos: diluir 20ml de Barrage em 20 litros de água. Pulverizar todo o corpo do animal principalmente orelhas, base dos chifres, barbela, axilas, entre membros, virilhas e inserção da cauda. Gastar ao redor de 4,5 litros de calda por bovino adulto. Pulverização de instalações (currais, estábulos, leiteiras, matadouros, bezerreiros, etc.): diluir 60 ml de Barrage em 20 litros de água. Pulverizar todas as estruturas da instalação. Gastar ao redor de um litro de calda para cada 10 m² de superfície. Através de corredores de aspersão: diluir 1 litro de Barrage em 1000 litros de água. Homogeneizar

120 *Tripanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: *Biologia, Diagnóstico e Controle*

bem a calda no tanque; verificar se não há bicos de pulverização entupidos e se a cortina de líquido é uniforme.

Apresentação: Em frascos de 20 ml, 200 ml e 1 litro.

c) Cyfluthrin

Nome comercial: Bayofly Pour-On

Fabricante: Bayer do Brasil S.A- Mosquicida e Piolhícida dorsal.

Composição: Cyfluthrin (éster ciano(4---fluoro-3-fenoxifenil) metílico do ácido 3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetil-ciclopropano-carboxílico) 1%; excipiente q.s.p. 100%.

Indicações: Indicado no combate às moscas (*M. domésticas*, *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*), malófagos (*Bovicola bovis* e *Bovicola ovis*) e piolhos (*Haematopinus eurysternus*, *Linognathus vituli*) e *Melophagus ovinus*.

Dosagens e modo de usar: Bayofly Pour-On vem pronto para uso e deve ser aplicado com a embalagem autodosadora.

Apresentação: Frasco autodosador de 0,5 a 1 litro.

Nome comercial: Bayticol Pour-On D.A.

Fabricante: Bayer do Brasil S.A - carrapaticida e mosquicida dorsal.

Composição: Flumethrin 0,5%, cyflumethrin 0,25%, excipiente q.s.p. 100%.

Indicações: Extermina todas as fases do carrapato (*Boophilus microplus*) de bovinos e moscas dos estábulos (*Stomoxys calcitrans* e Mosca doméstica) assim como a mosca do chifre (*Haematobia irritans*). Devido a sua ação mosquicida e também repelente, diminui sensivelmente as infestações por *Dermatobia hominus* (Berne) pois combate o seu vetor.

Dosagens e modo de usar: Bayticol Pour-On D.A. vem pronto para uso e pode ser aplicado com a embalagem dosificadora de 1 litro nas dosagens seguintes: 100 Kg peso vivo, 10 ml; 101 Kg a 200 kg 20 ml; de 201 a 300 Kg, 30 ml; de 301 a 400 Kg, 40 ml; de 401 a 500 Kg, 50 ml; de 501 em diante, 60 ml. Dosagem máxima animal: 60 ml. Vantagens de Bayticol Pour-On D.A.: Fácil, rápido e cômodo. O produto não requer período de carência para o leite ou carne, pois o mesmo não é sistêmico.

Apresentação: Frasco autodosador de 1 litro e embalagem de 4 + 1 litros.

d) Flumethrin

Nome comercial: Bayticol Plus Pour-On.

Fabricante: Bayer do Brasil S.A - carrapaticida e bernicida dorsal.

Composição: Éster do ácido alfaciano-4 (fluor-3-fenoxi)-benzeno-3[2(4-clorfenil)-clorvinil] 2,2 dimetil-ciclopropanocarbônico (Flumethrin) 1%, fosfato de 0,0-dimetil-oxi 2,2,2-tricloroetilo (Triclorophon) 30%; excipientes q.s.p. 100%.

Indicações: Extermina todas as fases do carrapato (*Boophilus microplus*) e as larvas de *Dermatobia hominis* (bernes) dos bovinos.

Dosagens e modo de usar: Vem pronto para uso e pode ser aplicado com sua embalagem dosificadora de 1 litro ou com uma pistola dosificadora automática. Pode também ser usado com um copo dosificador graduado. Usar o produto nas seguintes dosagens de acordo com o peso vivo dos bovinos: até 100 Kg, 10 Kg; de 101 a 200 Kg, 20 ml; de 201 a 300 Kg, 30 ml; de 301 a 400 Kg, 40 ml; de 401 a 500 Kg, 50ml; de 501 em diante, 60 ml. Dosagem máxima por animal: 60 ml. Vantagens de Bayticol Plus Pour-On: Fácil, rápido e cômodo.

Ação Total: O produto exercerá sua ação gradativamente sobre todo o corpo do animal, matando todas as formas do ciclo de vida do carrapato e por via sistêmica dos bernes. Mesmo regiões de difícil acesso, tais como cabeça, face interna das orelhas, entrepernas, úbre e calda, são facilmente atingíveis. Nas grandes infestações, dois a três dias após a aplicação quase todos os carrapatos estão mortos. Nos animais de pêlos longos algumas teleóginas podem permanecer por até uma semana, porém não farão ovoposição viável. A ação bernicida ocorre nas primeiras 72 horas pós-tratamento.

Contra-Indicações: Não aplicar Bayticol Plus Pour-On em animais comendo rações ou concentrados. Nestes animais não fornecer ração como alimentação nas 12 horas anteriores e 12 horas posteriores ao tratamento. Neste período os animais devem receber apenas alimentos verdes (gramíneas e forrageiras).

Período de carência: Para gado leiteiro observar um intervalo mínimo de 10 horas entre o tratamento e a ordenha. Para gado de corte, observar pelo menos 24 horas entre o tratamento e o abate.

Apresentação: Frasco autodosador de 1 litro e embalagens de 5 litros com medidor graduado.

25. Utilização de armadilhas impregnadas com inseticidas

A utilização de armadilhas e cortinas impregnadas com inseticidas tem aumentado muito a sua utilização no controle da tripanosomose em áreas endêmicas, onde elas têm se mostrado efetivas, simples, não-poluentes.

24.1. Controle da tripanosomose bovina utilizando armadilhas

Esta metodologia de controle foi empregada por Rowlands et al. (1996) na Cotê d'Ivoire (África). Utilizou-se armadilhas bicônicas (Challier & Laveissière, 1973) impregnadas com alfa-cipermetrina (Fendona®, Shell, Reino Unido). A utilização de armadilhas resultou em uma redução entre 66,7 e 98,9 % nos vetores de tripanosomas (glossinas) nas regiões estudadas. Observou-se também uma redução na prevalência do *T. vivax* de 77% para bezerros e 67% para vacas.

Referências Bibliográficas

- ALGER, J.; ACOSTA, M. C.; LOZANO, C.; VELASQUEZ, C., LABRADA, L. A. Stained Smears as a Source of DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.91, p.589-591, 1996.
- ALLSOPP, B. A.; NEWTON, S. D. Characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* by isoenzyme analysis. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.15, p.265-270, 1985.
- ALVAREZ, F.; CORTINAS, M. N.; MUSTO, H. The analysis of protein coding genes suggests monophyly of *Trypanosoma*. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.5, p.333-343, 1996.
- ANON. Collecção das leis de Provincia do Gram Pará; Lei nº 19 - de 6 de setembro de 1839. **Aurora Paraense**, Belém, v.2, p.11, 1839.
- ARTAMA, W. T.; AGEY, M. W.; DONELSON, J. E. DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* (Indonesia) and *Trypanosoma brucei* spp. **Parasitology**, London, v.104, pt.1, p.67-74, 1992.
- BAKER, J. R. Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae Doflein, 1901. **Experimental Parasitology**, New York, v.13, p.219, 1963.
- BAJYANA SONGA, E.; HAMERS-CASTERMAN, C.; HAMERS, R.; PHOLPARK, M.; PHOLPARK, S.; LEID, K.; TANGCHAITRONG, S.; CHAICHANOPOONPOL, I.; VITOORAKOOL, C.; THIRAPATSAKUM, T. The use of the Card Agglutination Test (Testryp CATT) for the detection of *T. evansi* infection: A comparison with other trypanosomiasis diagnostic tests under field conditions in Thailand. **Annales de la Societe Belge de Médecine Tropicale**, v.67, p.137-148, 1987.
- BAJYANA SONGA, E.; PAINDOVOINE, P.; WITTOUCK, E.; VISESHAKUL, N.; MULDERMANS, S. ; HAMERS, R. Evidence for kinetoplast and nuclear DNA homogeneity in *Trypanosoma evansi* isolates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.43, p.167-180, 1990.
- BALTZ, T.; GIROUD, C.; BALTZ, D.; ROTH, C.; RAIBAUD, A.; EISEN, H. Stable expression of two variable surface glycoproteins by cloned *Trypanosoma equiperdum*. **Nature**, London, v.319, p.602-604, 1986.
- BARBET, A. F.; MCGUIRE, T. C. Crossreacting determinants in variant-specific surface antigens of African trypanosomes. **Proceedings of the National Academic Science of the United States of American**, Washington, v.75, p.1989-1993, 1978.

BARBET, A. F.; MCGUIRE, T. C. Purification of *Trypanosoma brucei* variable surface glycoproteins: Analysis of degradation occurring during isolation. ***Parasitology***, London, v.85, p.511-522, 1982.

BARBET, A. F.; MUSOKE, A. J.; SHAPIRO, S. Z.; MPINBAZA, G., AND MCGUIRE, T. C. Identification of the fragment containing cross-reacting antigenic determinants in the variable surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. ***Parasitology***, London, v.83, p.623-637, 1981.

BARRETO, M. P. Importância médica e econômica dos tabânicas. ***Revista Clínica de São Paulo***, v.25, p.11-20, 1949.

BARRIGA, O. O. A review on vaccination against protozoa and arthropods of veterinary importance. ***Veterinary Parasitology***, Amsterdam, v.55, p.29-55, 1994.

BARRY, J. D. Antigenic variation during *Trypanosoma vivax* infectious of different host species. ***Parasitology***, London, v.89, p.49-58, 1986.

BARRY, J. D.; CROWE, J. S.; VICKERMAN, K. Instability of the *Trypanosoma brucei rhodesiense* metacyclic variable antigen repertoire. ***Nature***, London, v.306, p.699-701, 1983.

BERCHTHOLD, M.; PHILIPPE, H.; BREUNIG, A.; BRUGEROLLE, G. The phylogenetic position of *Dimastigella trypaniformis* within the parasitic kinetoplastids. ***Parasitology Research***, Berlin, v.80, p.672-679, 1994.

BOID, R. Identification of *Trypanosoma evansi* stocks using starch-gel electrophoresis. ***Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene***, v.75, p.323, 1981.

BOID, R.; MLECHE, W. C. H. Isoenzyme analysis of stocks of trypanosomes isolated from cattle in Indonesia. ***Research in Veterinary Science***, v.39, p.388-389, 1985.

BOID, R.; HUNTER, A. G.; JONES, T. W.; ROSS, C. A.; SUTHERLAND, D.; LUCKINS, A. G. Trypanosomosis Research at the Centre for Tropical Veterinary Medicine (CTVM) 1970 to 1995. ***Tropical Animal Health and Production***, Edinburg, v.28, p.5-22, 1996.

BORST, P.; FASE-FOWLER, F.; GIBSON, W. C. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. ***Molecular and Biochemical Parasitology***, v.23, p.31-38, 1987.

BOULHOSA, J. L. -- ***Boletim DEMA***, v., p., jul-nov., 1946.

BOYT, W. P. ***A Field guide for diagnosis, treatment and prevention of African animal Trypanosomiasis***. [S.I.]: FAO, 1986. 139 p.

BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z. R. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.79, p.95-107, 1998.

CARDOSO DE ALMEIDA, M. L.; TURNER, M. J. The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. **Nature**, London, v.302, p.349-352, 1983.

CENTRE FOR TROPICAL VETERINARY MEDICINE. **Annual Report**. Edinburgh: The University of Edinburgh, 1991. p.

CHEN, J.; RAUCH, A. R.; WHITE, J. H.; ENGLUND, P. T.; COZZARELLI, N. R. The topology of the kinetoplast DNA network. **Cell**, Cambridge, v.80, p.61-69, 1995.

CLARKSON, M. I. Trypanosomiasis of domesticated animals of South America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p.125-126, 1976.

CONSTANTINE, D. G. Bats in to the health, welfare, and economy of man. In: **BIOLOGY of Bats**. London: [s.n.], 1970. v.2, p.319-341.

CROSS, G. A. M. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. **Parasitology**, London, v.71, p.393-417, 1975.

CURRASON, L. **Traité de protozoologie vétérinaire et comparée**. Paris: Vigot Frétes, 1943. p.

DAR, F. K.; PARIS, J.; WILSON, A. J. Serological studies on trypanosomosis in East Africa: IV. comparison of antigenic types of *Trypanosoma vivax* group organisms. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v.67, p.237-244, 1973.

DÁVILA, A. M. R. **Trypanosomose animal na América do Sul**: epizootiologia, evolução e tecnologias da informação. 2002. 288 p. Tese (Doutorado) - Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

DÁVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L.; SILVA, R. A. M. S. Biometrical alterations of *Trypanosoma evansi* isolate in laboratory rodents. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 76, p.149-152, 1998.

DÁVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L.; SILVA, R. A. M. S. Morphological and biometrical differences among *Trypanosoma vivax* isolates from Brazil and Bolívia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.92, p.357-358, 1997b.

DÁVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L.; SILVA, R. A. M. S. Morphological and biometrical observations on bolivian *Trypanosoma vivax* isolate. ***Tropical Animal Health and Production***, 1997c (submetido).

DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. ; RAMIREZ, L. Protection from lethal infection by prior immunization with an homologous *Trypanosoma evansi* strain. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 14., 1995, Goiânia. ***Livro de resumos***. Goiânia: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1995. p.325.

DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S.; RAMIREZ, L. Partial protection against homologous *Trypanosoma evansi* stock. ***Trypanews***, v.3, n.1, p.9-11, 1996.

DE ALMEIDA, P. J.; NDAO, M.; VAN MEIRVENNE, N.; GEERTS, S. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. ***Acta Tropica***, Basel v.66, p.45-50, 1997.

DEANE, M. P.; JANSEN, A. M.; MANGIA, R. H. R.; GONÇALVES, A.M.; MOREL, C. M. Are our laboratory "strains" representative samples of *Trypanosoma cruzi* populations that circulate in nature?. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, Rio de Janeiro, v.79, p.19-24, 1984.

DESQUESNES, M.; DÁVILA, A. M. R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. ***Veterinary Parasitology***, Amsterdam, v.109, p.213-31, 2002

DESQUESNES, M.; MCLAUGHLIN, G.; ZOUNGRANA, A.; DÁVILA, A. M. R. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. ***International Journal of Parasitology***, Oxford, v.31, p.610-614, 2001.

DESQUESNES, M. Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immuno sorbent assay. ***Acta Tropica***, Basel, v.65, p.139-148, 1997a.

DICKIN, S.; GIBSON, W. Hybridisation with a repetitive DNA probes reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. ***Molecular and Biochemical Parasitology***, v.33, p.135-142, 1989.

DOLAN, R. B.; OKECH, G.; ALUSHULA, H.; MUTUGI STEVENSON, P.; SAYER, P. D.; NJOGU, A. R. Homidium bromide as a chemoprophylactic for cattle trypanosomiasis in Kenya. ***Acta Tropica***, Basel,v.47, p.137-144, 1990.

ENGLUND, P. T.; GUILBRIDE, D. L.; HWA, K-Y.; JOHNSON, C. E.; LI, C.; ROCCO, L. J.; TORRI, A. F. Kinetoplast DNA: structure and replication. In:

- SMITH, D. F.; PARSONS, M. **Molecular biology of parasitic protozoa**. [S.l]: IRL Press, 1996. p.88-114.
- FINELLE, P. African animal trypanosomiasis: part IV. economic problemes. **Wildlife Animal Review**, v.110, p.15-18, 1974.
- FRANKE, C. R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Investigation on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). **Acta Tropica**, Basel, v.58, p.159-169, 1994.
- GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, London, v.28, p.229-317, 1989.
- GILL, B. S. Properties of soluble antigen of *Trypanosoma evansi*. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v.38, p.357-361, 1965.
- GRAY, A. R. The antigenic relationships of strains of *Trypanosoma brucei* isolated in Nigeria. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v.44, p.263-271, 1966.
- GREENHALL, A. M.; SCHMIDT, U.; LOPEZ-FORMENT, W. Attacking behavior of the vampire bat, *Desmodus rotundus*, under field conditions in Mexico. **Biotropica**, Washington, v.3, p.136, 1971.
- GRUVEL, J.; BALIS, J. La trypanosomiase a *Trypanosoma evansi* chez le dromadaire au Tchad et ses principaux vecteurs. **Revue D'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, Paris, v.18, p.435-439, 1965.
- HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.91, p.37-49, 1998.
- HAJDUK, S. L.; VICKERMAN, K. Antigenic variation in cyclically transmitted *Trypanosoma brucei*: variable antigen type composition of the first parasitemia in mice bitten by trypanosome-infected *Glossina morsitans*. **Parasitology**, London, v.83, p.609-621, 1981.
- HASHIMOTO, T.; NAKAMURA, Y.; KAMAISHI, T.; ADACHI, J.; NAKAMURA, F.; OKAMOTO, K.; HASEGAWA, M. Phylogenetic place of kinetoplastid protozoa inferred from a protein phylogeny of elongation factor 1 alpha. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.70, p.181-185, 1995.
- HOARE, C. A. Vampire bats as vectors and hosts of equine and bovine trypanosomes. **Acta Tropica**, Basel, v.22, p.204-216, 1965.
- HOARE, C. A. **The trypanosomes of mammals**. Oxford: Blackwell, 1972. 749 p.

INTERNATIONAL LABORATORY FOR RESEARCH ON ANIMAL DISEASES. Anaemia in trypanosomiasis haemorrhagic. *T. vivax* may provide a clue. **ILRAD Reports**, v.2., n.4, p. , 1984.

INTERNATIONAL LIVESTOCK RESEARCH INSTITUTE. The communion of cells. **Livestock Research for Development**, v.2, n.1, p. , 1996.

JOHN, M. C.; NEDUNCHELLIYAN, S.; VENKATARAMAN, K. S. Biometrical observations on different strains of *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.43, p.143-145, 1992.

JOHNSON, C. M. Bovine Trypanosomiasis in Panama. **American Journal of Tropical Medicine**, Baltimore, v.22, p.289-297, 1941.

JONES, T. W.; MCKINNELL, C. D. Antigenic variation in *Trypanosoma evansi*. Isolation and characterisation of variable antigen type populations from rabbits infected with a stock of *T. evansi* . **Tropenmedizin und Parasitologie**, Stuttgart, v.35, p.237-241, 1984.

KAGERUKA, P.; KABORE, H.; MARCOTTY, T.; IBOUESSE, J. F.; DE DEKEN, R.; GEERTS, S.; LEMMOUCHI, Y.; SCHACHT, E. Comparative evaluation of the prophylactic effect of slow release devices containing homidium bromide and isometamidium on *Trypanosoma congolense* in rabbits. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.63, p.179-185, 1996.

KAWASAKI, E. S. Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. London: Academic Press, 1990. p.146-151.

KOSINSKY, R. J. Antigenic variation in trypanosomes : a computer analysis of variant order. **Parasitology**, Amsterdam, v.80, p.343-357, 1980.

KRINSKY, W. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (*Diptera: Tabanidae*). **Journal of Medical Entomology**, Lanhan, v.3, p.225-275, 1976.

KUBES, V. **El "Trypanosoma vivax", Americano agente de la tripanosomiasis bovina en Venezuela, su comparación con el del Africa**. Caracas: Editorial Grafolit, 1944. p.

KUKLA, B. A.; MAJIWA, P. A. O.; YOUNG, J. R.; MOLOO, S. K.; OLEMOIYOI, O. K. Use of species-specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infection in tse-tse flies. **Parasitology**, Amsterdam, v.95, p.1-16, 1987.

- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **THE LEISHMANIASES in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p.1-120.
- LARANGEIRAS, N. L. Importância econômica das tripanosomiasas em Mato Grosso do Sul. In: **CURSO SOBRE DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITÓSES DE BOVINOS, 1985, Campo Grande**. [Resumos...]. Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1985. p.
- LARANGEIRAS, N. L.; PINTO, J. A. N.; RIBEIRO, H. S.; LIMA, M. M.; PAIVA, F.; MELO, H. J. H. Infecção natural por *Trypanosoma evansi*. Evans, 1880 em suínos (*Sus Scrofa Domesticus*). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 1983, S.I. [Resumos...] s.n.t.
- LAVIER, G. L'evolution de la morphologie dans le genre *Trypanosoma*. **Ann. Parasitol.**, v.19, p.168, 1943.
- LE RAY, D.; BARRY, J. D.; VICKERMAN, K. Antigenic heterogeneity of macacyclic forms of *Trypanosoma brucei*. **Nature**, London, v.273, p.300-302, 1978.
- LEGER, L. Les affinités de l'*Herpetomonas subulata* et la phylogénie des trypanosomes. **C R Soc. Biol.**, v.67, p.615, 1904.
- LEGER, M.; VIENNE, M. Epizootie a trypanosomes chez les bovines de la Guyane Française. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v.12, p.258-266, 1919.
- LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man**. 2 ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1973. 406 p.
- LOSOS, G. J. **Infectious tropical diseases of domestic animals**. Harlow Essex: Longman Scientific and Technical, 1986. 938 p.
- LOSOS, G. J.; IKEDE, B. O. Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v.9, p.1-71, 1972.
- LOSOS, G. J. Diseases caused by *Trypanosoma evansi*, a review. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v.4, p.165-181, 1980.
- LUN, Z. R.; DESSER, S. S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA ? **Parasitology Today**, Barking, Essex, v.11, p.131-133, 1995.

MAHMOUD, M.M.; GRAY, A.R. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (Steel, 1985) Balbiani, 1888; A Review of Recent Research. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v.12, p.35-47, 1980.

MAJIWA, P. A.; MAINA, M.; WAITUMBI, J. N.; MIHOK, S.; ZWEYGARTH, E. *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. **Parasitology**, Amsterdam, v.106 (Pt 2), p.151-162, 1993.

MARCHE, S.; ROTH, C.; PHILIPPE, H.; DOLLET, M.; BALTZ, T. Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.71, p.15-26, 1995.

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

MASIGA, D. K.; McNAMARA, J. J.; GIBSON, W.C. A repetitive DNA sequence specific for *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *godfreyi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.62, p.27-33, 1996.

MASIGA, D. K.; SMYTH, A. J.; HAYES, P.; BROMIDGE, T. J.; GIBSON, W. C. Sensitive detection of trypanosomes in tse-tse flies by DNA amplification. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.22, p.909-918, 1992.

MASSAMBA, N. N.; WILLIAMS, R. O. Distinction of African trypanosome species using nucleic acid hybridisation. **Parasitology**, Amsterdam, v.88, p.55-65, 1984.

MATHIEU-DAUDÉ, F.; TIBAYRENC, M. Isozyme variability of *Trypanosoma brucei* s.l.: genetic, taxonomic and epidemiological significance. **Experimental Parasitology**, New York, v.78, p.1-19, 1994.

MELÉNDEZ, R. D.; FORLANO, M.; FIGUEROA, W. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. **Trypanews**, n.2, p.4, 1995.

MICHELS, P. A.; HANNAERT, V. The evolution of kinetoplastid glycosomes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v.26, p.213-219, 1994.

MILLER, E. N.; TURNER, M. J. Analysis of antigenic types appearing in first relapse populations of clones of *Trypanosoma brucei*. **Parasitology**, Amsterdam, v.82, p.63-80, 1980.

- MINCHIN, E. A. Investigations on the development of trypanosomes in tsetse flies and other Diptera. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, Essex, v.52, p.159, 1908.
- MOLOO, S. K.; GRAY, M. A. New observations on the cyclical development of *Trypanosoma vivax* in *Glossina*. **Acta Tropica**, Basel, v.4, p.167-172, 1989.
- MOMEN, H. Parasite characterization by Zymodeme. In: MOREL, C. M. **Genes and antigens of parasites: a laboratory manual**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p.111-120.
- MONZON, C. M.; VILLAVICENCIO, V. I. Serum protein in guinea-pigs and horses infected with *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.36, p.295-301, 1990.
- MONZÓN, C. M. Serological diagnosis of *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) in horses using a direct agglutination test. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.47, p.25-35, 1993.
- MORALES, G. A.; WELLS, E. A.; ANGEL, D. The capybara *Hydrochaeris hydrochaeris* as a reservoir host for *Trypanosoma evansi*. **Journal of Wildlife Disease**, Ames, v.12, 1976.
- MORIEARTY, P. L. Characterization of antigens by Western Blotting. In: MOREL, C. M. (Ed.) **Genes and antigens of parasites: a laboratory manual**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p.365-372.
- MORLAIS, I.; RAVEL, S.; GREBAUT, P.; DUMAS, V.; CUNY, G. New molecular marker for *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* identification. **Acta Tropica**, Basel, v.80, p.207-213, 2001.
- MURRAY, A. K.; CLARKSON, M. Characterization of Stocks de *Trypanosoma vivax*: II. immunological studies. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v.76, p.283-292, 1982.
- MUTUGI, M. W.; BOID, R.; LUCKINS, A. G. Differences in cloning and sub-cloning success rates in four stocks of *Trypanosoma evansi* and variation in suramin resistance of the clones. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.60, p.213-220, 1995.
- MYLER, P. J. Molecular variation in trypanosomes. **Acta Tropica**, Basel, v.53, p.205-225, 1993.
- NANTULYA, V. M.; BAJYANA SONGA, E.; HAMERS, R. Detection of circulating trypanosomal antigens in *Trypanosoma evansi*-infected animals using a *T. brucei* group-specific monoclonal antibody. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v.40, p.263-266, 1989.

NIESCHULZ, O. Über die morphologie des *Trypanosoma viennei* aus Surinam (Neiderlandisch Guyana). **Zschr. InfektKr. Hyg. Haust.**, v.55, p.207, 1939

NIESCHULZ, O.; BOS, A.; FRICKERS, J. Over een infectie door *Trypanosoma viennei* bij een rund uit Suriname. **Tijdschrift voor Diergeneeskunde**, Utrecht, v.65, p.963-972, 1938.

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

NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E. C.; ESPÍNDOLA, M. A.; CRISTALDO, G.; da ROCHA, H. C.; NUNES, A. B. Estudos epidemiológicos sobre leishmaniose tegumentar (LT) e Mal de Cadeiras no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - estudo de reservatórios, 1992-1994. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v.3, p.29-35, 1994.

NUNES, V. L. B.; OSHIRO, E. T.; DORVAL, M. E. C.; GARCIA, L. A. M.; DA SILVA, A. A. P.; BOGLIOLO, A. R. Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma evansi* no Pantanal Sul-Mato-Grossense: estudo de reservatórios. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v.2, p.41-44, 1993.

NYEKO, J. H. P.; OLE-MOIYOI, O. K.; MAJIWA, P. A. O.; OTIENO, L. H.; OCIBA, P. M. Characterisation of trypanosome isolates from Uganda using species-specific DNA probes reveals predominance of mixed infections. **Insect Science and its Applications**, Nairobi, v.11, p.271-280, 1990.

OVERATH, P.; HAAG, J.; LISCHKE, A.; O'HUIGIN, C. The surface structure of trypanosomes in relation to their molecular phylogeny. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.31, p.468-471, 2001.

PENCHENIER, L.; DUMAS, V.; GREBAUT, P.; REIFENBERG, J.-M.; CUNY, G. Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis. **Parasite**, v.4, p.387±9, 1996.

PEREGRINE, A. S. Chemotherapy and Delivery Systems: Haemoparasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.54, p.223-248, 1994.

PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M. Pharmacology of Dimmenazene: A Review. **Acta Tropica**, Basel, v.54, p.185-203, 1993.

PERRY, B. D.; RANDOLPH, T. F.; McDERMOTT, K. R.; SONES, K. R.; THORNTON, P. K. **Investing in animal health research to alleviate poverty**. ILRI (International Livestock Research Institute), Nairobi, Quênia, 2002. 148 p.

- PINTO, C. *Doenças infecciosas e parasitárias dos animais domesticos, s.l.* S. Científica, 1944. 760 p.
- PLATA, R. *Trypanosoma* tipo cazalboui en el ganado de la Costa Atlantica. *Rev. Med. Vet. Bogota*, v.3, p.141, 1931.
- RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; VICTÓRIO, A. M.; SILVA, R. A. M. S.; TRAJANO, V.; JANSEN, A. M. Measurements of *Trypanosoma evansi* isolates from wild and domestic animals of the Pantanal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.92, p.483-484, 1997.
- SEED, J. R.; EDWARDS, R.; SECHELSKI, J. The Ecology of Antigenic Variation. *Journal of Protozoology*, Lawrence, v.31, p.48-53, 1984.
- SERRA-FREIRE, N. M.; REZENDE, A. M. L. Stomoxys calcitrans, um vetor mecânico do *Trypanosoma vivax* no Brasil e notas sobre o comportamento do parasito no vetor. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, Itaguaí, jan./dez. v.11, n.1, p.77-82, 1988.
- SERRA-FREIRE, N. M.; SILVA, A. M.; MUNIZ, J. A. Prevalência de *Trypanosoma vivax* em *Bubalus bubalis* no município de Belém, estado do Pará. *Atas da Sociedade de Biologia*, Rio de Janeiro, v.22, p.35-36, 1981.
- SERRA-FREIRE, N. M. Reavaliação dos focos de *Trypanosoma vivax* Ziemann 1905 em bovinos e bubalinos do Território Federal do Amapá (TFA). *Revista da Faculdade de Veterinária da UFF*, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.41-45, 1983.
- SERRA-FREIRE, N. M. Oiapoque – outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v.4, n.4, p.30-31, out./dez.,1981.
- SOUZA, M. C.; SERRA-FREIRE, N. M. Flutuação da parasitemia por *Trypanosoma vivax* em infecções experimentais de ruminantes domésticos. *Arquivos Fluminense de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v.2, n.2, p.51-54, 1987.
- SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, London, v.66, p.25-32. 1972.
- SHAW, J. J. The epizootiology of American Surra with special reference to the Lower Amazon Region. *Protozoology*, v.3, p.119-128, 1977.
- SILVA, R. A. M. S.; AROSEMENA, N. A. E.; HERRERA, H. M., SAHIB, C. A.; FERREIRA, M. S. J. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.60, p.167-171, 1995a.

SILVA, R. A. M. S.; HERRERA, H. M.; DOMINGOS, L. B. S.; XIMENES, F. A.; DÁVILA, A. M. R. Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* Infection in dogs and Horses: Hematological and Clinical Aspects. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.25, p.233-238, 1995b.

SILVA, R. A. M. S.; BARROS, A. T. M.; HERRERA, H. M. Trypanosomosis outbreaks due to *Trypanosoma evansi* in the Pantanal, Brazil: a preliminary approach on risk factors. *Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, Paris, v.4, p.315-319, 1995c.

SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J. A. da; SCHNEIDER, R. C.; FREITAS, J. de; MESQUITA, D.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Outbreak of Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.5, p.561-562, 1996a.

SILVA, R. A. M. S.; SILVA, J.A. da; SCHNEIDER, R. C.; DE FREITAS, J.; MESQUITA, D. P.; MESQUITA, T. C.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Bovine Trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in the Northern subregion of Pantanal, Brazil. *Trypanews*, v.2, n.4, p.1-2, 1995d.

SILVA, R. A. M. S.; JANSEN, A. M.; TRAJANO, V.; DÁVILA, A. M. R. Coati (*Nasua nasua*) as a wild reservoir of *Trypanosoma evansi* during the low season of vectors in the Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.91, Suppl., p.105, 1996b.

SILVA, R. A. M. S.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; VICTÓRIO, A. M.; PEREIRA, M. E. B. An investigation of in vitro phagocytosis of *Trypanosoma evansi* by rat peritoneal macrophages: Increase mediated by parasite-specific antibodies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.91, Suppl., p.105, 1996c.

SILVA, R. A. M. S.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; VICTÓRIO, A. M.; PEREIRA, M. E. B. The mediation of adoptive transference for protection against *Trypanosoma evansi* by macrophage and spleen cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.91, Suppl., p.106, 1996d.

SILVA, R. A. M. S.; MORALES, G.; EULERT, E.; MONTENEGRO, A.; YBAÑEZ, R. Outbreaks of trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in bovines of Bolivia. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.76, 153-157, 1997a.

SILVA, R. A. M. S.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; FERREIRA, M. J. S.; SAHIB, C. A. The first record of outbreaks of bovine trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in the Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 1997b (submetido).

SILVA, R. A. M. S.; EGÜEZ, A.; MORALES, G.; EULERT, E.; MONTENEGRO, A.; YBAÑEZ, R.; SEIDL, A.; DÁVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L. Dynamics of bovine trypanosomosis outbreaks due to *Trypanosoma vivax* in Bolivian and Brazilian lowlands and possible involved factors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 1997c (submetido).

SOUZA, S. S.; SCHLEBINGER, T.; HERRERA, H. M.; TRAUB-CSEKO, Y. M.; DÁVILA, A. M. R. *Trypanosoma vivax* : pcr detection and sensitivity on ungulate serum samples. s.n.t.

STEVENS, J. R.; GIBSON, W. The molecular evolution of trypanosomes. **Parasitology Today**, Essex., v.15, p.432-437, 1999.

STEVENS, J. R.; NUNES, V. L. B; LANHAM, S. M.; OSHIRO, E. T. Isoenzyme characterization of *Trypanosoma evansi* isolated from capybaras and dogs in Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v.46, p.213-222, 1989.

STEVENSON, P.; SONES, K. R.; GICHERU, MWANGI, E. K. Comparison of isometamidium chloride and homidium bromide as prophylactic drugs for trypanosomiasis in cattle at nguruman, Kenya. **Acta Tropica**, Basel, v.59, p.77-84, 1995.

SWALLOW, B. M.; MULATU, W.; LEAK, S. G. A. Potential demand for a mixed public-private animal health input: evaluation of a pour-on insecticide for controlling tse-tse-transmitted trypanosomiasis in Ethiopia. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.24, p.265-275, 1995.

TURNER, C. M. R.; BARRY, J. D.; MAUDLIN, I.; VICKERMAN, K. An estimate of the size of metacyclic variable antigen repertoire of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **Parasitology**, London, v.97, p.269-276, 1988.

UNSWORTH, K. ; BIRKETT, J. D. The use of antrycide prosalt in protecting cattle against trypanosomiasis when in transit through tse-tse areas. **Veterinary Record**, London, v.64, p.351-353, 1952.

VAN MEIRVENNE, N.; MAGNUS, E.; VERVOORT, T. Comparison of variable antigenic types produced by trypanosome strains of the subgenus Trypanozoon. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, v.57, p.409-423, 1977.

VAN MIERVENNE, N.; MAGNUS, E.; BÜSCHER, P. Evaluation of variante specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. **Acta Tropica**, Basel, v.60, p.189-199, 1995.

VENTURA, R. M.; RODRIGUES, A. C.; DELL' PORTO, A.; CAMPANER, M.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. G. Molecular tools for the identification

and characterization of *Trypanosoma (Megatrypanum) spp.* and *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, 12, Caxambú-MG. **Livro de Resumos**. Caxambú, MG, Sociedade Brasileira de Protozoologia, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.91, Suppl., p.25-26, 1996.

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

VICKERMAN, K. Antigenic variation in trypanosomes. **Nature**, London, v.273, p.613-617, 1978.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Eds.). **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1976. p.1-34.

VIGNOLI, C., DE LAMBALLERIE, X., ZANDOTTI, C., TAMALET, C., DE MICCO, P. Advantage of a rapid extraction method of HIV1 DNA suitable for polymerase chain reaction. **Res. Virol.**, v.146, p.159±62, 1995.

VOS, G. J.; GARDINER, P. R. Antigenic relatedness of stocks and clones of *Trypanosoma vivax* from east and West Africa. **Parasitology**, London, v.100, p.101-106, 1989.

WALSH, P. S., METZGER, P. K., HIGUCHI, R. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v.10, p.506-513, 1991.

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, New York, v.18, p.124-193, 1966.

WELLS, E. A.; BETANCOURT, A.; RAMIREZ, L. E. The geographic distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, p.448, 1977.

WELLS, E. A.; RAMIREZ, L. E.; BETANCOURT, A. *Trypanosoma vivax* in Colombia: Interpretation of field results. **Tropical Animal Health and Production**, v.14, p.141-150, 1982.

WHITELAW, D. D. Immunosuppression in bovine trypanosomiasis: Studies with louping-ill vaccine. **Research in Veterinary Science**, v.26, p.10-107, 1979.

WHO. **Epidemiology and control of African trypanosomiasis**. [S.l.: s.n.], 1986. 128 p. (Technical Report Series, 739)

- WIEMER, E. A. C.; HANNAERT, V.; VAN DEN IJSSEL, P.; VAN ROY, J.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A.M. Molecular analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanoplasma borelli*: an evolutionary scenario of subcellular compartmentation in Kinetoplastida. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.40, p.443–454, 1995.
- WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. **Acta Tropica**, Basel, v.27, n.4, p.384-386, 1970.
- ZWEYGARTH, E.; KAMINSKY, R.; CHERUIYOT, J.K. A simple and rapid method to initiate *Trypanosoma brucei brucei* and *T. brucei evansi* bloodstream form cultures. **Acta Tropica**, Basel, v.46, p.205-206, 1989.

Anexo I - Soluções

Tampão salino Fosfato (pH 6,9 - 7,2)

NaCl	8 g.
KCl	0,2 g.
Na ₂ HPO ₄	1,5 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O destilada	1000 ml

Tampão para coloração (pH 6,8)

NaHPO ₄	9,2 g
H ₂ O destilada (q.s.p.)	1000 ml
Na ₂ HPO ₄	9,464 g
H ₂ O destilada (q.s.p.)	1000 ml

Misturar as duas soluções até atingir o pH 6,8

Tampão para coloração (pH 6,6)

PO ₄ HNa ₂	3,8 g
PO ₄ H ₂ K	5,47 g
H ₂ O destilada (q.s.p.)	1000 ml

Solução de EDTA

EDTA	1,445 g
H ₂ O destilada (q.s.p.)	20 ml

Dois gotas desta solução são necessárias para coleta de 5ml. de sangue.

Sôro Fisiológico

NaCl	8,5 g.
H ₂ O destilada (q.s.p.)	1000 ml

Solução tampão fostato 0,15M (pH 7,2)

Solução A:	
Na ₂ HPO ₄ (0,15M)	PM : 141,96g
Solução B:	
KH ₂ PO ₄ (0,15M)	PM : 136,09 g
NaCl (0,15M)	

Colocar 20 ml da solução B + 80 ml. da solução A

Acertar o pH para 7,2

Completar para 1000 ml com NaCl 0,15M.

Azul de Evans 10mg%

Azul de Evans	10mg
Solução tampão fosfato 0,15M (q.s.p.)	100ml

Giemsa

Giemsa em pó (BDH)	3 g.
Glicerol	125 g.
Alcool metílico	375 ml.

Mistura Giemsa e glicerol a 37 C durante 24 hs., logo adicionar alcool. Deixar durante 5 dias a 37 C homogenizando todos os dias. Filtrar com papel Whatman N° 1.

May Grünwald-Giemsa

Giemsa	2,27 g.
May Grünwald-Giemsa	1,90 g.
Glicerina*	60 ml.
Alcool metílico (q.s.p.)	1000 ml.

* A glicerina se utiliza em pequenas quantidades (10 ml) para dissolver os corantes em separado. Estes se lavam em alcool metílico e se msituram em frasco cor âmbar. O corante não deve utilizar-se, antes de um repouso de 30 dias e um filtrado prèvio.

Anexo II - Lista dos fornecedores de drogas contra as Tripanosomose

CIBA-GEIGY QUÍMICA S.A. DIVISÃO AGRÍCOLA - DIVISÃO SAÚDE ANIMAL.

São Paulo (SP) : Av. Santo Amaro, 5137 -

CX. Postal 21.468

Tel.: (011) 241-6393

Telex: (011) 37770

Fax: (011) 543-0992

CEP : 04706

EMBRASVET - EMPRESA BRASILEIRA VETERINÁRIA LTDA.

São José do Rio Preto (SP)

Rua XV de Novembro, 3630

Tel. (0172) 33-7136

CEP : 15015-110

QUIMIO PRODUTOS QUÍMICOS, COMÉRCIO E INDÚSTRIA S.A.

Rio de Janeiro (RJ)

Rua da Rocha, 155

Tel.: (021) 261-5252

CEP: 20960

Filial Fortaleza-Fortaleza (CE)

Rua Prof. Vicente Siqueira, 234

Bairro Monteze

Tel. (085) 247-3977

CEP 60410

PHILIPS COUTO INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA.

Anápolis (GO)

Rua 02, quadra 3-A, distrito Agro-industrial de Anápolis

TLX:624122-PHIQ

Tel.: (062) 324-1000

CX. Postal: 5059

CXI. CEP 77100

PROBION INDÚSTRIA DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS LTDA.

Juaboticabal (SP)
Rua Floriano Peixoto, 259 Centro
CEP: 14870
Tel.: (0163) 22-5222
Telefax: (0163) 22-2887

FAGRA-FARMAGRÍCOLA S.A. IMP. E EXPORTAÇÃO

Escritório e vendas - São Paulo (SP)
Rua Alcântara, 195/197 Vila Maria
Tel.: (011) 948-5155 (PBX)
Telex: 011-63493 FMG
Fax: (011) 948-5759
Fábrica - Mariporã (SP)
Rodovia Fernão Dias, km. 56
Bairro Terra Preta
Tels.: (011) 489-1511, 489-1512 (PBX)

MINERTHAL PRODUTOS AGROPECUÁRIOS LTDA.

São Paulo (SP)
Rua Camacam, 383
Vila Anastácio
Tel.: (011) 261-2155
Fax: (011) 832-2443
CEP: 05095

FARMAVET PRODUTOS VETERINÁRIOS LTDA.

São Paulo (SP)
Rua Riachuelo, 128
Tel.: 36-0471 e Pça da Sé, 47
1º andar Tels.: (011) 35-5406 e 36-2122
Laboratório - São Paulo (SP)
Rua Ismael Nery, 109 - Depósito e Escritório Central - São Paulo (SP)
Rua Doze de Setembro, 1252
Tel.: (PBX) (011) 950-7611
Telex: (011) 26868
Fax: (011) 950-8341

LAPROVET

Dr. G. remond
2 Chemin de la Milletière - BP 2262
37002 Tours Cedex
France
Fax: (33) 47491380

ou

Dr. K.R. Sones
Technical Adviser (Laprovvet)
StockWatch Ltd.
P O Box 24720
Nairobi ,Kenya
Fax: (2542) 882148

RHÔNE MÉRIEUX

Dr. Peter Jeffries
Strategic Development - Ruminants
29 Avenue Tony Garnier
BP 7123
69348 Lyon Cedex 07, France
Fax: (33) 72723205