

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**UTILIZAÇÃO DA LAMP PARA DIAGNÓSTICO E
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO
CLORIDRATO DE ISOMETAMIDIUM EM BOVINOS
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma vivax***

Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto

Médico Veterinário

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**UTILIZAÇÃO DA LAMP PARA DIAGNÓSTICO E
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO
CLORIDRATO DE ISOMETAMIDIUM EM BOVINOS
NATURALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma vivax***

Discente: Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

2018

C352u	<p>Castilho Neto, Kayo José Garcia de Almeida Utilização da LAMP para diagnóstico e avaliação da eficácia terapêutica do cloridrato de isometamidium em bovinos naturalmente infectados com <i>Trypanosoma vivax</i> / Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto. – Jaboticabal, 2018 59 p. : tabs. + 1 CD-ROM</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Fabiano Antonio Cadioli</p> <p>1. ELISA. 2. Métodos Moleculares. 3. Tratamento. 4. Tripanossomíases. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: UTILIZAÇÃO DA LAMP PARA DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO CLORIDRATO DE ISOMETAMIDIUM EM BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma vivax*


AUTOR: KAYO JOSÉ GARCIA DE ALMEIDA CASTILHO NETO

ORIENTADOR: FABIANO ANTONIO CADIOLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FABIANO ANTONIO CADIOLI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FMVA/UNESP - Araçatuba



Prof. Dr. ALEXANDRE HENRYLI DE SOUZA
Gerente Técnico Nacional de Pecuária-CEVA/Saúde Animal Ltda / Paulínia/SP



Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 31 de agosto de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto, nascido em 21 de setembro de 1990, na cidade de Nhandeara – SP, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Araçatuba - SP em março de 2009, colando grau em dezembro de 2013. Realizou Iniciação Científica, intitulada ALIMENTOS VOLUMOSOS SUPLEMENTARES: EFEITO DO EMURCHECIMENTO E DA ADIÇÃO DE INOCULANTE MICROBIANO E DE SAL COMUM NA ENSILAGEM DO CAPIM ELEFANTE CV. NAPIER, ROXO E PARAÍSO, sob a orientação do Prof. Dr. Hamilton Caetano, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2011/21929-2), entre março de 2012 e junho de 2013. Nesta unidade, realizou também especialização *lato sensu* no programa de Residência Uniprofissional (MEC/MS), denominada Residência Integrada em Medicina Veterinária na área de concentração Saúde Animal e Ambiental/Medicina Veterinária, subárea de Clínica Médica de Grandes Animais, entre março de 2014 a fevereiro de 2016. Em março de 2016 ingressou no Mestrado no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Clínica Médica Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli, sendo novamente bolsista FAPESP (processo nº 2015/25397-6).

EPÍGRAFE

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir!”

Augusto Cury

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Garcia de Almeida e Élia Castilho da Cunha Almeida, por serem os pilares da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pois sem eles nada seria na vida.

Aos meus pais, Antônio Garcia de Almeida e Élia Castilho da Cunha Almeida, por todo carinho, educação e sabedoria que me forneceram durante toda a vida.

Aos meus familiares, em especial a Ana Beatriz Botto de Barros da Cruz Favaro, pelo imenso apoio e paciência comigo nos momentos mais difíceis.

Ao Professor Dr. Fabiano Antonio Cadioli, pela orientação na pós-graduação.

Ao Professor Dr. Marcos Rogério André, pela grande ajuda e por compartilhar seu conhecimento com todos do Laboratório de Imunoparasitologia.

À Professora Dra. Rosangela Zacarias Machado, pela sabedoria e disposição em ensinar, que foram fundamentais para minha evolução como pessoa e pesquisador.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária, UNESP – Jaboticabal, pela amizade e ajudas providenciais.

Aos moradores e ex-moradores da República Antro do HV pela amizade.

A todos aqueles que não citei anteriormente, mas que contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e acadêmico direta ou indiretamente.

À CEVA Saúde Animal S.A, representado pelo Dr. Alexandre Henryli Souza, pelo fornecimento do quimioterápico para o desenvolvimento do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo número 2015/25397-6), pela bolsa de Mestrado concedida.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	2
3. Referências	11
CAPÍTULO 2 - ACOMPANHAMENTO DE BOVINOS LEITEIROS NATURALMENTE INFECTADOS COM <i>Trypanosoma vivax</i> APÓS TRATAMENTO COM CLORIDRATO DE ISOMETAMIDIUM	22
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	24
2.1. Caracterização da propriedade, sinais clínicos, seleção dos animais e tratamento.....	24
2.2. Métodos Moleculares	26
2.3. Teste sorológico.....	28
2.4. Análise estatística	28
3. Resultados e Discussão	29
3.1. Métodos moleculares	29
3.2. Teste sorológico.....	34
4. Conclusões.....	40
5. Agradecimentos.....	40
6. Referências	40


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Utilização da Lamp para diagnóstico e avaliação da eficácia terapêutica do cloridrato de isometamidium em bovinos naturalmente infectados com *Trypanosoma vivax***", protocolo nº 9.277/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fabiano Antonio Cadioli, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de julho de 2016.

Vigência do Projeto	15/07/2016 a 07/08/2018
Espécie / Linhagem	Bovino
Nº de animais	20
Peso / Idade	350 a 450 kg / 2 a 8 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Propriedade Rural

Jaboticabal, 06 de julho de 2016.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

UTILIZAÇÃO DA LAMP PARA DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA DO CLORIDRATO DE ISOMETAMIDIUM EM BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS COM *Trypanosoma vivax*

RESUMO - Tripanossomíases são doenças causadas por agentes do gênero *Trypanosoma*, que infectam humanos, animais domésticos e silvestres nos continentes Africano, Asiático, Américas do Sul e Central. Os sinais clínicos da enfermidade, como anemia e emagrecimento, são genéricos e também devido à presença de intervalos aparasitêmicos, o diagnóstico da doença torna-se desafiador. Quimioterápicos como aceturato de diminazeno (AD) e cloridrato de isometamidium (ISM) estão disponíveis para o tratamento da doença no Brasil, muito embora existam relatos e indícios de resistência aos princípios. Este trabalho teve como objetivo utilizar a amplificação circular isotérmica do DNA (LAMP) no diagnóstico e avaliar a cura parasitológica de bovinos naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax* após o tratamento com ISM. Foram utilizados 30 bovinos naturalmente infectados com *T. vivax*, que foram tratados com duas aplicações de ISM, na dosagem de 1,0 mg/Kg por via intramuscular profunda nos dias 0 e 150. Amostras de sangue e soro colhidas nos 0, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias após o tratamento, foram submetidas ao diagnóstico de *T. vivax* pelas técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) objetivando o gene alvo CatL-Like, LAMP visando o gene alvo DNA satélite e ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA) com antígeno bruto solúvel de *T. vivax*. Também, foi realizada uma PCR adicional para diagnóstico de infecção por *T. theileri* direcionado ao gene CATL. Houve persistência na detecção de DNA de *T. vivax* na PCR e LAMP bem como detecção contínua de anticorpos anti-*T. vivax* pelo método de ELISA após o tratamento instituído, sugerindo a presença de resistência do parasita ao ISM. Todas as amostras testadas para o diagnóstico de *T. theileri* pela PCR foram negativas. A LAMP se mostrou de grande utilidade no diagnóstico de animais naturalmente infectados, porém a combinação dos testes LAMP e ELISA podem evitar falsos diagnósticos, contribuindo para um melhor controle da doença. Os dados indicam que a PCR não é indicada para diagnóstico de *T. vivax* em animais apresentando baixa parasitemia, sendo, portanto não recomendada para promover o acompanhamento de animais após o tratamento com drogas tripanocidas.

Palavras-Chave

ELISA, métodos moleculares, tratamento, tripanossomíases

USE OF LAMP FOR DIAGNOSIS AND EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFICACY OF ISOMETAMIDIUM HYDROCHLORIDE IN BOVINES NATURALLY INFECTED WITH *Trypanosoma vivax*

ABSTRACT - Trypanosomiasis is disease caused by agents of the *Trypanosoma* genus, which infect humans, domestic and wild animals on the African, Asian, South and Central Americans continents. The clinical signs of the disease, such as anemia and weight loss, are generic and also due to the presence of parasitic intervals, the diagnosis of the disease becomes challenging. Chemotherapics such as diminazine aceturate (AD) and isomethemidium hydrochloride (ISM) are available for the treatment of the disease in Brazil, although there are reports and indications of resistance to the principles. This work aimed to use loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in the diagnosis and to evaluate the parasitological cure of cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with ISM. Thirty bovines naturally infected with *T. vivax* were treated with two ISM applications at a dose of 1.0 mg / kg intramuscularly on days 0 and 150. Blood and serum samples were collected on 0, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 and 240 days after treatment and were submitted to *T. vivax* diagnosis by polymerase chain reaction (PCR) targeting the CatL-Like, LAMP targeting the satellite DNA gene and enzyme immunoabsorption assay (ELISA) with soluble *T. vivax* antigen. Also, an additional PCR for diagnosis of *T. theileri* infection directed to the CATL gene was performed. There was persistence in the detection of *T. vivax* DNA in PCR and LAMP as well as continuous detection of anti-*T. vivax* antibodies by the ELISA method after the treatment, suggesting the presence of resistance of the parasite to the ISM. All samples tested for the diagnosis of *T. theileri* by PCR were negative. LAMP proved to be very useful in the diagnosis of naturally infected animals, but the combination of the LAMP and ELISA tests can avoid false diagnoses, contributing to a better control of the disease. The data indicate that PCR is not indicated for diagnosis in animals with low parasitemia, therefore is not recommended to promote the follow-up of animals after treatment with trypanocidal drugs.

Keywords

ELISA, molecular methods, treatment, trypanosomiasis

LISTA DE ABREVIATURAS

AD – Aceturato de diminazene
BIP – Oligonucleotídeo interno anti-sense
B3 - Oligonucleotídeo externo anti-sense
CatL-Like – Catepsina L-like
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DO – Densidade óptica
DP – Desvio Padrão
DT0155 – Oligonucleotídeo anti-sense
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimático
FIP – Oligonucleotídeo interno sense
F3 – Oligonucleotídeo externo sense
GAPDH – Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GVS – Glicoproteínas variantes de superfície
IgG – Imunoglobulina G
ISM – Cloridrato de isometamidium
kDNA – Ácido Desoxirribonucleico do cinetoplásto
Kg - quilograma
LAMP – Amplificação circular isotérmica do DNA
LB – Oligonucleotídeo circular anti-sense
LF – Oligonucleotídeo circular sense
mg – Miligrama
M – Molar
mM – milimolar
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
ng - Nanograma
PC – Ponto de Corte
PCR – Reação em cadeia da polimerase
SP – São Paulo
TM – Temperatura de melting
µL - Microlitro
UNESP – Universidade Estadual Paulista
USA – Estados Unidos da América
USP – Universidade de São Paulo
TviCatL – Oligonucleotídeo sense
TthCatL1 – Oligonucleotídeo sense

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

Tripanossomíases são enfermidades causadas por agentes do gênero *Trypanosoma*, afetando humanos, animais domésticos e silvestres. *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. evansi*, *T. theileri*, *T. b. brucei* e *T. b. rhodesiense* são as espécies responsáveis pela tripanossomíase animal na África, Ásia e Américas Central e do Sul (Dávila et al., 2003; Haji et al., 2015; Ogbaje et al., 2015). *T. vivax* infecta um grande número de espécies unguladas domésticas e silvestres, e na América do Sul é o principal agente etiológico da tripanossomíase em bovinos, sendo responsável por grandes perdas econômicas na bovinocultura (Seidl et al., 1999; Jones e Dávila, 2001).

No Brasil, o primeiro relato publicado de tripanossomíase por *T. vivax* ocorreu em 1972 (Shaw e Lainson, 1972). Posteriormente, o parasita foi diagnosticado em várias regiões do país e com frequência cada vez maior (Serra-Freire, 1981; Silva et al., 1996; Paiva et al., 1997; Barbosa Júnior et al., 2001), sendo que somente em um período de 10 anos houveram relatos de ruminantes infectados em Minas Gerais (Carvalho et al., 2008), Rio Grande do Sul (Silva et al., 2009), Pernambuco (Pimentel et al., 2012), São Paulo (Cadioli et al., 2012), Alagoas (Andrade Neto et al., 2015), Santa Catarina (Fávero et al., 2016), Goiás (Bastos et al., 2017), Sergipe (Vieira et al., 2017) e Piauí (Lopes et al., 2018) .

O diagnóstico da doença pode ser realizado por métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares, mas é dificultado pela não especificidade da sintomatologia clínica e pela presença de períodos de baixa parasitemia ou aparasitêmicos (Batista et al., 2007; Fidelis Junior et al., 2016). O método parasitológico é o mais utilizado para diagnóstico na América Latina e África (Osório et al., 2008; Dagnachew e Bezie, 2015), porém apresenta baixa sensibilidade em animais com baixa parasitemia, principalmente na fase crônica da infecção (Nantulya, 1990; Fidelis Júnior et al., 2016). Desta forma, métodos sorológicos, como o ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA), tornam-se uma ferramenta importante nas investigações de rebanhos infectados (Cuglovici et al., 2010), porém não permitem segregar animais com infecção ativa dos que foram tratados e

curados (Nantulya, 1990), além de não detectarem animais infectados no período inicial da infecção (Fidelis Junior et al., 2016; Sampaio, 2017). Deste modo, métodos moleculares, como a amplificação circular isotérmica do DNA (LAMP), apresenta alta capacidade de detecção de DNA de *T. vivax* (Njiru et al., 2011; Sampaio, 2017), mesmo em períodos supostamente aparasitêmicos (Cadioli et al., 2015); contudo, no Brasil, até o momento não há existência de relatos sobre a utilização da LAMP no diagnóstico em bovinos naturalmente infectados com *T. vivax*.

No Brasil, aceturato de diminazene (AD) e cloridrato de isometamidium (ISM) são os dois fármacos tripanocidas licenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o tratamento de animais parasitados por *T. vivax*. Porém há relatos de cepas Sul Americanas de *T. vivax* refratárias ao tratamento com AD na Guiana Francesa (Desquesnes et al., 1995) e evidências de resistência no Brasil (Cadioli et al., 2012; Bastos et al., 2017; Sampaio, 2017). Muito embora muitos relatos sobre a resistência ao ISM existam na África (Giordani et al., 2016), no Brasil apenas Sampaio (2017) sugere a presença de *T. vivax* refratário ao ISM em caprinos experimentalmente infectados, não havendo estudos sobre susceptibilidade de *T. vivax* ao ISM em bovinos naturalmente infectados e mantidos no sistema de produção. Deste modo, o presente estudo tem como objetivos: utilizar a LAMP como uma ferramenta para diagnóstico e avaliar a cura parasitológica de bovinos naturalmente infectados por *T. vivax* após o tratamento com ISM.

2. Revisão de Literatura

Tripanossomíases são enfermidades causadas por várias espécies de hemoprotozoários do gênero *Trypanosoma* que acometem humanos e muitas espécies de animais domésticos e silvestres nos continentes Africano, Asiático e Americano (Dávila et al., 2003). Na África, as principais espécies causadoras da enfermidade em bovinos e com grande importância econômica são *Trypanosoma vivax* e *T. congolense*, mas também *T. evansi*, *T. b. rhodesiense* e *T. b. brucei* são encontrados parasitando bovinos (Haji et al., 2015; Morrison et al., 2016). Por outro lado nas Américas, *T. vivax* é o principal agente etiológico da forma clínica da doença em ruminantes (Jones e Dávila, 2001), mas também *T. evansi* e *T. theileri* são espécies de tripanossomatídeos que podem ser encontrados parasitando

bovinos e bubalinos (Dávila et al., 2003; Rodrigues et al., 2003; Gonzales et al., 2007; Ramírez-Iglesias et al., 2017).

Para as espécies de parasitas que infectam mamíferos e de acordo com o modo de transmissão, o gênero *Trypanosoma* é dividido nas seções Salivaria e Stercoraria. Os parasitos pertencentes à seção Salivaria, por se localizarem nas glândulas salivares dos vetores biológicos e probóscide dos vetores mecânicos, são transmitidos através da inoculação da saliva de seus vetores. Por outro lado, aqueles pertencentes à seção Stercoraria se desenvolvem no trato digestivo dos vetores e são transmitidos por meio das fezes. A seção Salivaria pode ainda ser dividida em quatro subgêneros: *Dutonella*, *Pycnomonas*, *Nannomonas* e *Trypanozoon*. Sendo assim, *T. vivax* é um hemoprotozoário pertencente à família Trypanosomatidae, seção Salivaria, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Dutonella* (Hoare, 1972).

Morfologicamente *T. vivax*, pode ser caracterizado por possui um único flagelo livre e de tamanho variado, sendo descritos surtos com parasitas medindo de 13,72 até 31 μm de comprimento (Hoare, 1972; Gardiner, 1989; Gonzales et al., 2007). Segundo Shaw e Lainson (1972), as diferenças de tamanho são associadas com a patogenicidade do isolado. Associação foi igualmente observada por Gonzales et al. (2007) avaliando hematócritos e escores corporais de animais infectados com *T. vivax* de diferentes tamanhos, e também por Silva et al. (1996) que relacionaram formas menores do parasita a cepas causadoras de doença aguda e parasitas maiores causando infecção crônica.

T. vivax apresenta cinetoplasto grande, variando de forma circular a elíptica e localizado na porção subterminal, sendo sua posição um fator de identificação morfológica da espécie (Moraes, 2001). Trata-se também de um protozoário pleomórfico, apresentando a forma de tripomastigota na corrente sanguínea de seu hospedeiro vertebrado, onde se multiplica por fissão binária (Uilenberg e Boyt, 1998).

Estudos morfométricos de isolados de *T. vivax* provenientes de vários países da América do Sul mostram que são morfologicamente próximos aos encontrados a campo na África Ocidental, indicando que o protozoário, no continente Americano, teve origem a partir desta região (Jones e Dávila, 2001). Em convergência com os estudos morfométricos, análises filogenéticas utilizando varias cepas de *T. vivax* provenientes de países da América do Sul, incluindo o Brasil, e outros países da

África Ocidental e Oriental, mostram que apesar de algumas diferenças genotípicas, *T. vivax* do “Novo Mundo” foram filogeneticamente próximos aos parasitos da África Ocidental, apoiando desta forma, a hipótese de que isolados de *T. vivax* americano são derivados a partir de ancestrais comuns e introduzidos neste continente a partir da África Ocidental (Garcia et al., 2014).

A respeito dos meios de transmissão deste protozoário, no continente Africano, nas áreas onde as moscas do gênero *Glossina* spp. (*tsé-tsé*) estão presentes, *T. vivax* é em grande parte transmitido ciclicamente (Cuglovici et al., 2010; Laohasinnarong et al., 2015), mas há, como na América, relatos de transmissão mecânica em áreas com ausência de *Glossina* spp. (Giordani et al., 2016). Na América, onde não há a presença de moscas *tsé-tsé*, o parasito se adaptou à transmissão mecânica ou não cíclica em outros invertebrados picadores como *Tabanus importunus*, *Tabanus nebulosus* e *Cryptotylus unicolor*, ocorrendo principalmente nas regiões inundáveis do pantanal brasileiro e boliviano, Guiana Francesa e Colômbia (Madruga, 2004; Osório et al., 2008).

Em outras regiões, *Stomoxys calcitrans* desempenha papel importante na transmissão da doença em rebanhos bovinos, através do aumento considerável de sua população durante a estação chuvosa do ano ou por utilização indevida de resíduos de usinas de açúcar e álcool nos canaviais circunvizinhos às propriedades, associados à temperatura ambiente superior a 20°C (Paiva et al., 2000; Rodríguez-Batista et al., 2005; Batista et al., 2007; Cadioli et al., 2012; Cuglovici et al., 2010). Assim como *S. calcitrans*, *Haematobia irritans* tem um papel muito importante na transmissão de *T. vivax* dentro de uma propriedade, uma vez que o parasita já foi detectado na probóscide e tórax-abdômen dessas moscas e, por análise de regressão linear múltipla, chegou-se a conclusão de que a cada incremento de 500 moscas no local de estudo, poderá ocorrer a infecção de *T. vivax* em um novo animal (Salas et al., 2017).

Não obstante, a transmissão iatrogênica por fômites, como o uso compartilhado de agulhas e seringas para aplicação de ocitocina no momento da ordenha de animais ou por vacinações de rebanhos mostram-se altamente relevantes nos dias atuais (Jones e Dávila, 2001; Cadioli et al., 2012; Bastos et al., 2017). Por fim, a transmissão transplacentária pode ocorrer em fêmeas prenhes infectadas com *T. vivax* no terço inicial e final da gestação (Silva et al., 2013).

No Brasil, o caso índice de tripanossomíase por *T. vivax* foi datado e relatado em 1946 no estado do Pará, o qual ocorreu em bovinos. Porém o primeiro relato da doença publicado em jornal indexado foi descrito por Shaw e Lainson (1972) em búfalos (*Bubalis bubalis*) localizados em áreas inundadas próximos a cidade de Belém, estado do Pará. Posteriormente, *T. vivax* foi diagnosticado no Amapá (Serra-Freire, 1981) e na região do Pantanal Brasileiro, nos estados de Mato Grosso (Silva et al., 1996) e Mato Grosso do Sul (Paiva et al., 1997; Barbosa Júnior et al., 2001), no qual se estabeleceu de forma endêmica. Nas duas últimas décadas foram observados surtos no Maranhão (Feitosa Júnior et al., 2004), Tocantins (Linhares et al., 2004), Paraíba (Batista et al., 2007), Minas Gerais (Carvalho et al., 2008), Rio Grande do Sul (Silva et al., 2009), Pernambuco (Pimentel et al., 2012), São Paulo (Cadioli et al., 2012), Alagoas (Andrade Neto et al., 2015), Santa Catarina (Fávero et al., 2016), Goiás (Bastos et al., 2017), Sergipe (Vieira et al., 2017) e Piauí (Lopes et al., 2018).

A rápida disseminação e perpetuação deste protozoário entre os estados brasileiros e até entre países sul americanos se deve principalmente à ocorrência de rotas de comércio e transporte de bovinos entre regiões, com consequente introdução de animais com infecção assintomática em rebanhos que até então estavam livres do parasita, bem como condições climáticas propícias à presença de vetores mecânicos e uso compartilhado de agulhas e seringas (Silva et al., 1998; Jones e Dávila, 2001; Gonzales et al., 2007; Cadioli et al., 2012).

O impacto econômico gerado por *T. vivax* em rebanhos bovinos é notável, sendo estimado em mais de 4,5 bilhões de dólares por ano em perdas diretas e indiretas pelo parasita na bovinocultura africana (Yaro et al., 2016). No Brasil, analisando dados provenientes de surtos na bovinocultura de corte, Seidl et al. (1999) calcularam que o custo estimado da enfermidade é de US\$ 14,68 por animal ou 4% do valor estimado do rebanho. Sem tratamento, os custos se elevaram US\$ 64 por animal ou 17% do valor total do rebanho. Stevenson et al. (1995) afirmaram que no Pantanal, o gasto com tratamento pode chegar a US\$ 37,80 por animal. Da mesma forma, quando observamos os relatos sobre queda da produção na bovinocultura de leite, nos deparamos com decréscimos podendo chegar entre 27 e 28,5% da produção original (Carvalho et al., 2008; Bastos et al., 2017).

Dados epidemiológicos da doença ocorrida em surtos naturais, em áreas consideradas não endêmicas, indicam a eficiência da disseminação do parasita em

rebanhos leiteiros, Cuglovici et al. (2010), em sua análise de um surto ocorrido na região de Minas Gerais, relatam altas taxas de incidência e soro prevalência no rebanho estudado, atingindo até 25% e até 47%, respectivamente, de acordo com o momento analisado. Valores muito mais expressivos foram encontrados por Cadioli et al. (2012), com taxa de incidência de até 51,2% e soro prevalência de 57,1%, em um surto na região noroeste do estado de São Paulo. Por sua vez em área endêmica, Silva et al. (1996), em seu primeiro relato da doença no pantanal brasileiro, estado do Mato Grosso, observaram prevalência 34,48%, porém o método diagnóstico utilizado foi o parasitológico, o qual sabidamente apresenta baixa sensibilidade (Nantulya, 1990; Rebeski et al., 1999; Waal, 2012; Haji et al., 2015), podendo esse valor estar subestimado.

Durante o curso das tripanossomíases, imunossupressão do hospedeiro é relatada e predispõe a co-infecções ou falhas vacinais contra outros patógenos (Giordani et al., 2016; Yaro et al., 2016). Também verificam-se flutuações da parasitemia e até mesmo intervalos aparasitêmicos (Moraes, 2001; Almeida et al., 2010; Fidelis Junior et al., 2016), que se relacionam à resposta imunológica do hospedeiro e à variação antigênica das glicoproteínas variantes de superfície (GVS) dos tripanossomos (Nantulya, 1990; Cross, 2003; Stijlemans et al., 2010, Yaro et al., 2016). As GVS são glicoproteínas que revestem a superfície dos protozoários do gênero *Trypanosoma* spp. pertencentes à seção Salivaria, sendo perdidas e substituídas na medida em que há resposta de anticorpos do hospedeiro. Na literatura, são descritos mais de 1000 diferentes genes que permitem aos parasitas produzirem mais de 10.000.000 de ondas sucessivas de antígenos GVS diferentes (Yaro et al., 2016), possuindo desta forma um importante papel na evasão do parasita do sistema imune do hospedeiro (Nantulya, 1990; Stijlemans et al., 2010), bem como dificultando o desenvolvimento de vacinas comerciais aos tripanosomas (Giordani et al., 2016).

Na infecção por *T. vivax* pode-se observar a ocorrência da doença clínica, representada pelas fases aguda e crônica, cujos sinais clínicos são poucos específicos e caracterizados por anemia, febre, anorexia, apatia, emagrecimento progressivo, redução da produção de leite, linfadenopatia, diarreia, metrite, abortamentos, infertilidade podendo levar à esterilidade em machos, sinais neurológicos e morte (Batista et al., 2007; Oliveira et al., 2009; Cadioli et al., 2012; Betancur Hurtado et al., 2016; Fidelis Junior et al., 2016). Alterações nervosas

incluem incoordenação motora, dismetria, tremores musculares, fasciculações, opistótono e cegueira (Batista et al., 2007). Também é descrito em isolados africanos de *T. vivax* altamente patogênicos e virulentos, a síndrome hemorrágica aguda, sendo a forma clínica mais grave da doença com alta taxa de mortalidade, e caracterizada por hemorragias em orelhas, mucosa nasal e do trato gastrointestinal (Magona et al., 2008).

Defronte à não especificidade dos sinais clínicos e também à presença de períodos de baixa parasitemia ou aparasitemias, o diagnóstico da doença é desafiador, podendo ser realizado por métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (Fidelis Junior et al., 2016). Métodos parasitológicos, representados pelas técnicas de gota espessa (Brenner, 1961), centrifugação de micro hematócrito (Woo, 1970), esfregaço da camada leucocitária corada (*buffy coat*) (Murray et al., 1977) e esfregaço sanguíneo corado (Ndao et al., 2000), apresentam baixa sensibilidade em animais na fase crônica da infecção, a qual é associada a baixas parasitemias (Rebeski et al., 1999; Waal, 2012; Haji et al., 2015; Fidelis Junior et al., 2016). Apesar disso, estas técnicas são comumente utilizadas até os dias atuais para diagnóstico e inclusive em avaliação de eficácia terapêutica de fármacos em áreas com poucos recursos (Sow et al., 2012; Dagnachew et al., 2015), tornando o diagnóstico e tratamento ainda mais desafiador e favorecendo a dispersão da enfermidade.

Nas fases de baixa parasitemia ou suposta aparasitemia, o diagnóstico baseado na resposta imunológica, como o ELISA, é uma ferramenta importante para diagnóstico, apresentando maior sensibilidade em relação a métodos parasitológicos, sendo utilizada principalmente para a realização de “screening” de rebanhos suspeitos nos continentes Americano (Osório et al., 2008) e Africano (Dagnachew e Bezie, 2015). Entretanto, métodos sorológicos indiretos indicam apenas o contato do hospedeiro com o parasito, não permitindo identificar se a infecção se encontra ativa ou não (Nantulya, 1990). Além disso, persistência de anticorpos circulantes contra *T. vivax* por longos períodos no hospedeiro após o tratamento com drogas tripanocidas é relatado, período este variável de acordo com a natureza do antígeno utilizado nos ensaios, sendo observado na literatura permanência por 30 a aproximadamente 100 dias (Bengaly et al., 2001; Pillay et al., 2013), o que faz com que a interpretação dos resultados, em avaliações de animais após o tratamento, deva ser realizada com cautela.

Outro fator a se considerar, sobre métodos de diagnósticos imunológicos, é o fato de tenderem a não detectar animais infectados nos dias iniciais de uma infecção (Sampaio, 2017), podendo resultar em falhas no diagnóstico de rebanhos infectados e assim, favorecer a dispersão do parasita. Outro ponto a ser levado em consideração sobre a técnica de ELISA é a possibilidade da ocorrência de reação sorológica cruzada entre espécies de tripanosomas, incluindo *T. b. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. evansi* e *T. theileri*, as quais foram observadas em ensaios de imunodiagnóstico utilizando antígenos brutos solúveis (Luckins, 1977; Desquesnes et al., 2001; Jones e Dávila, 2001). Contudo, para o isolado GCTvPPO1-CO de *T. vivax*, o teste de ELISA utilizando antígeno bruto solúvel, apresentou alta sensibilidade (97,6%) e especificidade (96,9%) para diagnóstico de infecção por *T. vivax*, obtendo também valor muito baixo de reação sorológica cruzada com *T. evansi* (Madruga et al., 2006), fazendo deste teste uma técnica recomendada para utilização em estudos soro-epidemiológicos no Brasil.

Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Cortez et al, 2009), vem ganhando cada vez mais importância para o diagnóstico da tripanossomíase. A utilização oligonucleotídeos iniciadores específicos para uma região alvo de DNA, faz com que essa técnica possua alta especificidade para *Trypanosoma* spp, sendo bons indicadores para detectar a presença de DNA de *T. vivax* no sangue de bovinos, mesmo em animais que apresentam parasitemia indetectável nos exames parasitológicos diretos (Garcia et al., 2005). Por consequência, esses testes podem separar animais com infecção ativa daqueles que apresentam altos níveis de anticorpos, mas estão curados.

Porém, em alguns casos, as amostras obtidas a campo podem não estar adequadas à análise pela PCR, principalmente quando há resquícios de heparina, hemoglobina livre, mioglobina, anticorpos e fezes, afetando diretamente a sensibilidade do teste (Al-Soud e Rådström, 2001; Kuboki et al., 2003; Grab et al., 2005, Schrader et al., 2012). Por outro lado, a LAMP tem sido considerada técnica menos susceptível à presença de inibidores nas amostras sanguíneas do que a PCR convencional (Kaneko et al., 2007; Nimitphak et al., 2008; Grab et al., 2011), além de ser um teste de execução simples, rápido e barato (Notomi et al., 2000), e podendo ser realizado em áreas com recursos laboratoriais limitados (Njiru et al., 2011).

As principais vantagens da LAMP sobre a PCR são o uso de equipamentos de aquecimento simples para manter a temperatura entre 60 e 65°C; a amplificação

pode ser realizada em amostras não submetidas à extração de DNA; as reações são rápidas (Grab et al., 2011) e, além disso, apresenta maior capacidade de detecção que a PCR e testes parasitológicos (Haji et al., 2015; Laohasinnarong et al., 2015; Sampaio, 2017), inclusive em amostras de sangue de bovinos supostamente aparasitêmicos (Cadioli et al., 2015), o que a torna uma excelente ferramenta para diagnóstico.

Nos países Africanos, drogas tripanocidas, como AD, ISM e cloridrato de homidium, são as principais moléculas utilizadas para a quimioterapia e quimioprofilaxia da tripanossomíase animal (Giordani et al., 2016), e são comercializados há mais de 50 anos, constituindo juntamente com o controle dos vetores (utilização de armadilhas e inseticidas), as principais ferramentas utilizadas por produtores para o controle da dispersão do parasita (Sow et al., 2012). Por outro lado, no continente Americano, o controle da enfermidade é fundamentado somente na utilização de fármacos tripanocidas, sendo o AD o mais amplamente utilizado. Em poucas regiões do continente utiliza-se o ISM no tratamento (Jones e Dávila, 2001). Relatos de isolados de *T. vivax* sul americanos resistentes para o AD com retorno de parasitas circulantes dentro de poucos dias após a terapia foram relatados (Desquesnes et al., 1995; Gonzales et al., 2007) e evidências de resistência estão sendo descritas inclusive no Brasil (Cadioli et al., 2012; Bastos et al., 2017; Sampaio, 2017).

Dos fármacos quimioprofiláticos utilizados no combate a tripanossomíase, o ISM é o mais amplamente utilizado no continente Africano (Vitouley et al., 2012), o qual pertence à classe das fenantridinas, sintetizado hibridamente a partir do acoplamento de dois fármacos tripanocidas: o cloridrato de homidium e uma parte da molécula do AD, denominada de cloreto p -aminofenildiazonio (Delespaux e Koning, 2007). ISM foi sintetizado para o tratamento e prevenção de infecções de ruminantes com *T. vivax* e *T. congolense*, havendo diminuição da atividade em *T. evansi* e *T. brucei* spp. (Giordani et al., 2016). Em bovinos é utilizado nas dosagens de 0,5 mg/kg para tratamento e 1 mg/kg para profilaxia, sendo esta de 118 a 160 dias (Toro et al., 1983).

Com relação aos dados de farmacocinética do ISM, após sua aplicação, a concentração plasmática alcança seu pico dentro de 1 hora, após há uma queda relativamente rápida durante a primeira semana pós tratamento e, decorrido esse período, o decaimento é mais gradual. A meia vida do fármaco é relatada com sendo

de aproximadamente 25 dias. A droga é acumulada no fígado, rins, baço e no local de injeção, sendo que a partir desses locais ocorre a liberação lenta para o plasma, perfazendo sua atividade profilática. Excreção de resíduos de ISM ocorre principalmente através do suco biliar e também é relatada a presença de baixos níveis no leite (Giordani et al., 2016).

Sobre o mecanismo de ação da droga, estudos em *T. congolense* sugerem que existam dois mecanismos de transporte, o primeiro fundamentado no transporte passivo pela membrana plasmática e o segundo transporte ativo através membrana mitocondrial (Koning, 2001). Para *T. b. brucei* sugeriu-se que o transportador da membrana mitocondrial, aminopurina P2, codificado pelo gene TbAT1, tem papel importante na absorção de isometamidium. Em *T. evansi* o gene TvAT1 apresentou-se fundamental para a absorção. Portanto, a molécula irá se concentrar em grande parte no cinetoplasto, dentro das mitocôndrias, por afinidade e transporte ativo mediado por transportadores, local onde promove a clivagem do complexo das enzimas topoisomerases, e dessa forma, causando desagregação dos minicírculos (Delespaux e Koning, 2007) e realizando desta forma sua atividade tripanocida (Giordani et al., 2016).

Na literatura compilada, no continente Africano, há controvérsias sobre a efetividade do tratamento com ISM em ruminantes infectados com *T. vivax*. Olila et al. (2002) e Ogbage et al. (2015) observaram que o fármaco, na dosagem de 0,5 mg/Kg, foi eficaz no combate à doença. Entretanto, outros autores afirmam ou sugerem a ocorrência de isolados de *T. vivax* resistentes a droga, utilizando as dosagens de 1 mg/Kg (Awa e Ndamkou, 2006; Sow et al., 2012; Dagnachew et al., 2017) e 0,5 mg/Kg (Vitouley et al., 2012; Dagnachew et al., 2015). Na América do Sul há poucos relatos da utilização de ISM no tratamento da tripanossomíase, Desquesnes et al. (1995) na Guiana Francesa, Silva et al. (1999) na Bolívia, e Cadioli et al. (2012) no Brasil, observaram que a utilização do fármaco foi eficaz no tratamento da enfermidade, entretanto estudos de Sampaio. (2017) sugerem que o isolado Lins de *T. vivax* apresentou resistência ao ISM em caprinos experimentalmente infectados e tratados. É importante observar que a grande maioria dos trabalhos disponíveis não utilizam ferramentas diagnósticas com alta sensibilidade e especificidade para fazerem inferências sobre cura parasitológica, além de fazerem o monitoramento do rebanho em um curto intervalo de tempo e ficando restritos aos dados de ressurgimento de sinais clínicos ou retorno de

parasitemia por técnicas parasitológicas, o que permite a manutenção de animais com infecção assintomática no rebanho.

Resistência aos fármacos se devem à utilização dos princípios ativos por longo período de tempo, alta frequência de utilização da mesma droga em pequeno período de tempo, associados à utilização de sub dosagens e baixa qualidade dos medicamentos disponíveis nos comércios locais (Dragnachew et al., 2015; Dagnachew et al., 2017; Tekle et al., 2018), além de pouca quantidade de drogas tripanocidas disponíveis comercialmente e grande similaridade na composição química das mesmas (Yaro et al., 2016). Pouca efetividade de ISM foi observada em *T. evansi* ocorrendo naturalmente e em culturas de *T. b. brucei* desprovido de cinetoplasto, confirmando desta forma o papel central do cinetoplasto na afetividade do fármaco (Giordani et al., 2016). Além disso, estudos em *T. congolense* sugerem que o surgimento de cepas resistentes ao ISM se dá devido a mutações que ocorrem em um ou mais genes que codificam os transportadores da membrana mitocondrial no kDNA, resultando em perda ou diminuição do potencial da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, em falhas na absorção dos tripanocidas. A partir dessa informação, foram feitas correlações de isolados de *T. b. brucei* com polimorfismos ocorrendo no gene TbAT1, o qual resultaram em perda da função do transportador aminopurina P2 e resistência a ISM (Afework et al., 2006; Delespaux E Koning, 2007).

No Brasil, o ISM foi recentemente licenciado ao comércio pelo MAPA (Bastos et al., 2017) e não há nenhum dado de monitoramento científico na literatura sobre a sua eficácia terapêutica para os isolados circulantes brasileiros de *T. vivax*. Essa carência de dados técnicos sobre o medicamento proporciona a utilização indevida do fármaco por produtores rurais, como observado por Cadioli (2015), e inclusive há produtores nomeando erroneamente o quimioterápico de “vacina contra tripanossomose”. Além do mais, devido à ausência de relatos, não sabemos o potencial de diagnóstico da LAMP para isolados brasileiros de *T. vivax* em bovinos naturalmente infectados, fatos estes que justificam o presente estudo.

3. Referências

Afework Y, Maser P, Etschamann B, Von Samson-Himmelstjerna G, Zessin KH, Clausen PH (2006) Rapid identification of isometamidium-resistant stocks of *Trypanosoma b. brucei* by PCR-RFLP. **Parasitology Research** 99:253-261.

Almeida KS, Freitas FLC, Tebaldi JH, Alessi AC, Machado RZ, Nascimento AA (2010) Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira** 11:669-676.

Al-Soud WA, Rådström P (2001) Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **Journal of Clinical Microbiology** 39:485-493.

Andrade Neto AQ, Afonso JAB, Mendonça CL, Souto RJC, André MR, Machado RZ (2015) Surtos de tripanossomíase em bovinos leiteiros no agreste dos estados de Pernambuco e Alagoas. O biológico. **Resumos** 77:143.

Awa DN, Ndamkou CN (2006) Response of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* in zebu cattle in North Cameroon to prophylactic treatment with two formulations of isometamidium. **Preventive Veterinary Medicine** 76:90-96.

Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF (2007) Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology** 143:174–181.

Bastos TSA, Faria AM et al (2017) First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 26:366-371.

Barbosa Junior RNS, Madruga CR, Osório ALAR, Ribeiro LRR, Almeida RFC (2001) Descrição de surto de tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax*, com morte perinatal no Pantanal de Aquidauana, MS. In: IV Congresso Brasileiro de Buiatria. **Resumos**, Campo Grande, MS, p. 135.

Bengaly Z, Kasbari M, Desquesnes M, Sidibé I (2001) Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. **Veterinary Parasitology** 96:101-113.

Betancur Hurtado OJ, Castro PDJ, Giraldo-Ríos C (2016) Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. **Veterinary Parasitology** 229:54-59.

Brener Z (1961) **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas**. 79 f. Tese (Livre Docência) Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia e Farmácia.

CADIOLI FA (2015) **Diagnóstico e dispersão do *Trypanosoma vivax* em rebanhos bovinos**. 83f. Tese (Livre Docência). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.

Cadioli FA, Fidelis Junior OL, Sampaio PH, Santos GN, André MR, Castilho KJGA, Machado RZ (2015) Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. **Veterinary Parasitology** 214:174-177.

Cadioli FA, Barnabé PA, Machado RZ, Teixeira MCA, André MR, Sampaio PH, Fidelis Junior OL, Teixeira MMG, Marques LC (2012) First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 21:118-124.

Carvalho AU, Abrão DC, Facury Filho EJ, Paes PRO, Ribeiro MFB (2008) Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 60:769-771.

Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia AH, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, Paiva F, Teixeira MMG (2009) Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and south America – characterization, relationships and diagnostic implications. **Molecular and Cellular Probes** 23:44-51.

Cross GAM (2003) Antigenic variation in African Trypanosomes and malaria. In: Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecky RW. **Molecular Medical Parasitology**. San Diego: Academic Press, p. 82-110.

Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MFB (2010) Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology** 169:320-326.

Dagnachew S, Tsegaye B, Awukew A, Tilahun M, Ashenafi H, Rowan T, Abebe G, Barry DJ, Terefe G, Goddeeris BM (2017) Prevalence of bovine trypanosomosis and assessment of trypanocidal drug resistance in tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. **Parasite Epidemiology and Control** 2:40-49.

Dagnachew S, Bezie M (2015) Review on *Trypanosoma vivax*. **African Journal of Basic & Applied Sciences** 7:41-64.

Dagnachew S, Terefe G, Abebe G, Barry D, McCulloch R, Goddeeris B (2015) In vivo experimental drug resistance study in *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. **Acta Tropica**, 146:95-100.

Dávila AMR, Herrera HM, Schlebinger T, Souza SS, Traub-Cseko YM (2003) Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology** 117:1-13,.

Delespaux V, Koning HP (2007) Drugs and Drug resistance in African trypanosomiasis. **Drug Resistance Updates** 10:30-50.

Desquesnes M, Bengaly Z, Millogo L, Meme Y, Sakande H (2001) The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology** 95:141-155.

Desquesnes M, LA Rocque M, Peregrine AS (1995) French Guyanan stock of *Trypanosoma vivax* resistant to diminazene aceturate but sensitive to isometamidium chloride. **Acta Tropica** 60:133-136.

Fávero JF, Da Silva AS, Biazus AH, Volpato A (2016) *Trypanosoma vivax* infection in goat in west of Santa Catarina state, Brazil. **Comparative Clinical Pathology** 25:497-499.

Feitosa Júnior AB, Guerra RMSNC, Santos HP, Abreu-Silva AL (2004) Registro e morfometria de *Trypanosoma vivax* em esfregaço sanguíneo de bovino no município de Itapecuru-Mirim, Maranhão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 1:232.

Fidelis Junior OL, Sampaio PH, Machado RZ, André MR, Marques LC, Cadioli FA (2016) Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology** 25:69-81.

Garcia HA, Rodrigues AC et al. (2014) Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. **Parasites & Vectors** 7:1-13.

Garcia H, Garcia ME, Perez H, Mendoza-Leon A (2005) The detection and PCR-based characterization of the parasites causing trypanosomiasis in water-buffalo herds in Venezuela. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 99:359-370.

Gardiner PR (1989) Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology** 28:229-317.

Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, De Koning HP, Barrett MP (2016). The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology** 143:1862-1889.

Gonzales JL, Chacon E, Miranda M, Loza A, Siles LM (2007) Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. **Veterinary Parasitology** 146:9-16.

Grab DJ, Nikolskaia OV, Inoue N, Thekisoe OM, Morrison LJ, Gibson W, Dumler JS (2011) Using detergent to enhance detection sensitivity of African trypanosomes in human CSF and blood by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **PLoS Neglected Tropical Diseases** 5:e1249.

GRAB DJ, LONSDALE-ECCLES J, INOUE N (2005) LAMP for tadpoles. **Nature Methods** 2:635.

Haji I, Sugimoto C, Kajino K, Malele I, Simukoko H, Chitambo H, Namangala B (2015) Determination of the prevalence of trypanosome species in cattle from Monduli district, northern Tanzania, by loop mediated isothermal amplification. **Tropical Animal Health and Production** 47:1139 – 1143.

Hoare CA (1972) The Salivaria: Subgenus *Duttonella* Chalmers, 1918. In the: **The trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. Oxford: Blackwell Scientific Publications p. 401-429.

Jones T, Dávila AMR (2001) *Trypanosoma vivax* out of África. **Trends in Parasitology** 2:99–101.

Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T (2007) Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods** 70:499-501.

Koning HP (2001) Transporters in African trypanosomes: role in drug action and 570 resistance. **International Journal for Parasitology** 31:512-522.

Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, Sugimoto C, Igarashi I (2003) Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. **Journal of Clinical Microbiology** 41:5517-5524.

Laohasinnarong D, Goto Y, Asada M, Nakao R, Hayashida K, Kajino K, Kawazu S, Sugimoto C, Inoue N, Namangala B (2015) Studies of trypanosomiasis in the Luangwa valley, north-eastern Zambia. **Parasites & Vectors** 8:1-8.

Linhares GFC, Dias Filho FD, Duarte SC, Fernandes PR (2004) Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. **Resumos** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v.1, supl. 1, p. 232.

Lopes STP, Prado BS, Martins GHC, Beserra HEA, Souza Filho MAC, Evangelista LSM, Cardoso JFS, Mineiro ALBB, Souza JAT (2018) *Trypanosoma vivax* em bovino leiteiro. **Acta Scientiae Veterinariae** 46:1-5.

Luckins AG (1977) Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. **Tropical Animal Health and Production** 9:53-62.

Madruga CR, Araújo FR et al. (2006) The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 101:801-807.

Madruga CR (2004) Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanosoma (Duttonella) vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 13:46-47.

Magona JW, Walubengo J, Odimin JT (2008) Acute haemorrhagic syndrome of bovine trypanosomosis in Uganda. **Acta Tropica** 107:186-191.

Moraes MAV (2001) ***Trypanosoma vivax*: Infecção experimental em bovinos (*Bos indicus*)**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Morrison LJ, Vezza L, Rowan T, Hope JC (2016) Animal African Trypanosomiasis: Time to Increase Focus on Clinically Relevant Parasite and Host Species. **Trends in Parasitology** 33:599-607.

Murray M, Murray PK, McIntyre WIM (1977) An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene** 71:317–318.

Nantulya VM (1990) Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. **Revue Scientifique et Technique** 9:357-367.

Ndao M, Kelly N, Normandin D, Maclean JD, Whiteman A, Kokoskin E, Arevalo I, Ward BJ (2000) *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkey-related injuries. **Comparative Medicine** 50:658-665.

Njiru ZK, Ouma JO, Bateta R, Njeru SE, Ndungu K, Gitonga PK, Guya S, Traub R (2011) Loop-mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma vivax* based on satellite repeat DNA. **Veterinary Parasitology** 3-4:358-362.

Nimitphak T, Kiatpathomchai W, Flegel TW (2008) Shrimp hepatopancreatic parvovirus detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick. **Journal of Virological Methods** 154:56-60.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research** 28:63.

Ogbaje CI, Lawal IA, Ajanusi OJ (2015) Sensitivity of Nigerian field isolates of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* to commonly available trypanocides. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease** 5:214-218.

Olila D, McDermott JJ, Eisler MC, Mitema ES, Patzelt RJ, Clausen PH, Poetsch CJ, Zessin KH, Mehlitz D, Peregrine AS (2002) Drug sensitivity of trypanosome populations from cattle in a peri-urban dairy production system in Uganda. **Acta Tropica** 84:19-30.

Oliveira JB, Hernández-Gamboa J, Jiménez-Alfaro C, Zeledón R, Blandón M, Urbina A (2009) First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. **Veterinary Parasitology** 163:136-139.

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

Paiva F, Lemos RAA, Nakasato L, More AE, Brum KB, Bernado KC (2000) *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil: I – Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infactados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 9:135-141.

Paiva F, Lemos RAA, Oshiro AE, Salvador SC, Nakasato L (1997) Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 6:349.

Pillay D, Izotte J et al. (2013) *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. **Plos One** 8:e78565.

Pimentel DS, Ramos CAN, Ramos RAN, Araújo FR, Borba ML, Faustino MAG, Alves LC (2012) First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco. **Veterinary Parasitology** 185:286-289.

Ramírez-Iglesias JR, Eleizalde MC, Reyna-Bello A, Mendoza M (2017) Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. **Journal of Parasitic Diseases** 41:450-458.

Rebeski DE, Winger EM, Rogovic B, Robinson MM, Crowther JR, Dwinger RH (1999) Improved methods for the diagnosis of african trypanosomosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94:249-253.

Rodrigues AC, Campaner M, Takana CSA, A Dell' Porto, Milder RV, Takeda GF, Teixeira MMG (2003) Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. **Veterinary Parasitology** 116:185-207.

Rodríguez-Batista Z, Leite RC, Oliveira PR, Lopes CML, Borges LMF (2005) Populational dynamics of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae) in three biocenosis, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology** 130:343-346.

Salas RZ, Zuluaga EAC, Vélez JR, Chávez OT, García VHP, Osorio LAR, Rosales RB, Echeverry DP (2017) Tripanosomiasis bovina en ganadería lechera de trópico alto: primer informe de *Haematobia irritans* como principal vector de *T. vivax* y *T. evansi* en Colombia. **Revue de Médecine Vétérinaire** 33:21-34.

Sampaio PH (2017) **Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação da efetividade do tratamento contra *Trypanosoma vivax* em caprinos experimentalmente infectados**. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Sampaio PH, Fidelis Junior OL, Marques LC, Machado RZ, Barnabé PA, André MR, Balbuena TS, Cadioli FA (2015) Acute-phase protein behavior in dairy cattle herd naturally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology** 211:141–145.

Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R (2012) PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology** 113:1014-1026.

Shaw JJ, Lainson R (1972) *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 66:25–32.

Seidl AF, Dávila AMR, Silva RAMS (1999) Estimated Financial Impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 64:269-272.

Serra-Freire NM (1981) Oiapoque – outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 4:30-31.

Silva AS, Costa MM, Polenz MF, Polenz CH, Teixeira MMG, Lopes STA, Monteiro SG (2009) Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural** 39:2550-2554.

Silva TMF, Olinda RG, Rodrigues CM, Câmara AC, Lopes FC, Coelho WA, Ribeiro MF, Freitas CI, Teixeira MMG, Batista JS (2013) Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. **Veterinary Research** 44:1-9.

Silva RAMS, Ramirez L, Souza SS, Ortiz AG, Pereira SR, Dávila AMR (1999) Hematology of natural bovine trypanosomosis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. **Veterinary Parasitology** 85:87-93.

Silva RAMS, Eguez A, Morales G, Eulert E, Montenegro A, Ybañez R, Seidl A, Dávila AMR, Ramirez L (1998) Bovine Trypanosomiasis in Bolivian and Brazilian Lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 93:29-32

Silva RAMS, Silva JA, Schneider RC, Freitas J, Mesquita DP, Mesquita TC, Ramirez L, Dávila AMR, Pereira MEB (1996) Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovine of the Pantanal Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 52:561-562.

Sow A, Sidibé I et al. (2012) Field detection of resistance to isometamidium chloride and diminazene aceturate in *Trypanosoma vivax* from the region of the Boucle du Mouhoun in Burkina Faso. **Veterinary Parasitology** 187:105-111.

Stevenson P, Sones KR, Gicheru MM, Mwangi EK (1995) Comparison of isometamidium chloride and homidium bromide as prophylactic drugs for trypanosomiasis in cattle at Nguruman, Kenya. **Acta Tropica** 59:77-84.

Stijlemans B, Vankrunkelsven A, Caljon G, Bockstal V, Guilliams M, Bosschaerts T, Beschin A, Raes G, Magez S, De Baetselier P (2010) The central role of macrophages in trypanosomiasis-associated anemia: rationale for therapeutical approaches. **Endocrine, Metabolic Immune Disorders - Drug Targets** 10:71-82.

Tekle T, Terefe G et al. (2018) Aberrant use and poor quality of trypanocides: a risk for drug resistance in south western Ethiopia. **Veterinary Research** 14:1-8.

Toro M, León E, López R, Pallota F, Garcia JÁ, Ruiz A (1983) Effect of isometamidium on infections by *Trypanosoma vivax* and *T. evansi* in experimentally infected animals. **Veterinary Parasitology** 13:35-43.

Uilenberg G, Boyt WP (1998) **A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomiasis**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 158.

Vieira OLE, Macedo LO, Santos MAB, Silva JABA, Mendonça CL, Faustino MAG, Ramos CAN, Alves LC, Ramos RAN, Carvalho GA (2017) Detection and molecular characterization of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 26:516-520.

Vitouley HS, Sidibe I, Bengaly Z, Marcotty T, Van Den Abbeele J, Delespaux V (2012) Is trypanocidal drug resistance a threat for livestock health and production in endemic areas? Food for thoughts from Sahelian goats infected by *Trypanosoma vivax* in Bobo Dioulasso (Burkina Faso). **Veterinary Parasitology** 190:349-354.

Waal T (2012) Advances in diagnosis of protozoan diseases. **Veterinary Parasitology** 189:65-74.

Woo PTK (1970) The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. **Acta Tropica** 27:384-386.

Yaro M, Munyard KA, Stear MJ, Groth DM (2016) Combatting African Animal Trypanosomiasis (AAT) in livestock: The potential role of trypanotolerance. **Veterinary Parasitology** 225:43-52.

CAPÍTULO 2 - Acompanhamento de bovinos leiteiros naturalmente infectados com *Trypanosoma vivax* após tratamento com cloridrato de isometamidium

Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto^{1*}, Ana Beatriz Botto de Barros da Cruz Favaro², Otavio Luiz Fidelis Junior¹, Walter Beterquini Nagata², Marcos Rogério André¹, Marta Maria Geraldtes Teixeira³, Rosangela Zacarias Machado¹, Fabiano Antonio Cadioli^{1,2}

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Araçatuba, Rua Clóvis Pestana 793, 16050-470, Araçatuba, SP, Brasil.

³Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900, São Paulo, Brazil.

* Autor para correspondência: Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto; Tel.: +55 18 981064355. E-mail: kayoneto@gmail.com

RESUMO - Tripanossomíases acometem humanos, animais domésticos e silvestres. Em bovinos, os sinais clínicos inespecíficos da enfermidade, como anemia e emagrecimento, associados a intervalos aparasitêmicos, tornam o diagnóstico da doença desafiador. Quimioterápicos como aceturato de diminazeno (AD) e cloridrato de isometamidum (ISM) estão disponíveis para o tratamento da doença no Brasil. Este trabalho teve como objetivo, acompanhar de bovinos leiteiros naturalmente infectados por *Trypanosoma vivax* após o tratamento com ISM por meio de técnicas moleculares e sorológica. Para tal, foram utilizados 30 bovinos naturalmente infectados com *T. vivax*, sendo estes tratados com duas aplicações de ISM, na dosagem de 1,0 mg/Kg por via intramuscular profunda, nos dias 0 e 150. Foram avaliadas, para diagnóstico de *T. vivax*, amostras de sangue e soro colhidas nos 0, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 dias após os tratamentos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) objetivando o gene alvo CatL-Like, amplificação circular isotérmica do DNA (LAMP) visando o gene alvo DNA satélite e ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA) utilizando antígeno bruto solúvel de *T. vivax*. Também, foi realizada uma PCR adicional para diagnóstico de infecção por *T.*

theileri direcionado ao gene CATL. Verificou-se persistência na detecção de DNA de *T. vivax* pela PCR e LAMP bem como detecção contínua de anticorpos anti-*T. vivax* pelo método de ELISA após o tratamento instituído, sugerindo a presença de isolados brasileiros de *T. vivax* resistentes ao ISM. Todas as amostras testadas para o diagnóstico de *T. theileri* pela PCR foram negativas. A combinação dos testes LAMP e ELISA podem evitar falsos diagnósticos, contribuindo para um melhor controle da doença.

Palavras-chave:

Tripanossomíase, diagnóstico, sorologia, técnicas moleculares

1. Introdução

Tripanossomíases são enfermidades causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Trypanosoma* que infectam humanos, animais domésticos e silvestres. *Trypanosoma vivax*, *T. evansi*, *T. theileri* e *T. cruzi*, são as espécies responsáveis pela tripanossomíase animal nas Américas Central e do Sul (Jones e Dávila, 2001; Dávila et al., 2003). *T. vivax* infecta um grande número de espécies de ungulados domésticos e silvestres e, na América do Sul, é o principal agente etiológico da tripanossomíase em bovinos, sendo responsável por grandes prejuízos econômicos na bovinocultura (Seidl et al., 1999; Dávila e Silva, 2000; Jones e Dávila, 2001).

O diagnóstico da doença pode ser realizado por métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares. Entretanto, o diagnóstico mostra-se desafiador pela ausência de especificidade dos sinais clínicos (Batista et al., 2007; Cadioli et al., 2012) e presença de períodos de baixa parasitemia ou aparasitêmicos (Fidelis Junior et al., 2016). Métodos sorológicos, como o ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA), embora representem importantes ferramentas nas investigações de rebanhos infectados (Cuglovici et al., 2010), não permitem segregar animais com infecção ativa dos que foram tratados e curados (Nantulya, 1990), além de não detectar animais infectados nos primeiros seis dias da infecção (Sampaio, 2017). Por outro lado, métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Cortez et al., 2009; Pimentel et al., 2012) e a amplificação circular isotérmica do DNA (LAMP) (Njiru et al., 2011), apresentam alta capacidade de detecção de DNA de *T. vivax*, mesmo em períodos supostamente considerados como aparasitêmicos (Cadioli et al., 2015).

No Brasil, aceturato de diminazeno (AD) e cloridrato de isometamidium (ISM) são os dois fármacos tripanocidas licenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o tratamento de animais infectados por *T. vivax*. Porém há relatos de cepas Sul Americanas de *T. vivax* refratárias ao tratamento com AD na Guiana Francesa (Desquesnes et al., 1995) e evidências de resistência no Brasil (Cadioli et al., 2012; Bastos et al., 2017; Sampaio, 2017). Apesar da existência de relatos sobre a resistência de *T. vivax* ao ISM em isolados africanos (Giordani et al., 2016), no Brasil, até a presente data, um único estudo (Sampaio, 2017) sugeriu a presença de *T. vivax* resistente ao ISM em caprinos experimentalmente infectados. Por outro lado, no Brasil, não há estudos da susceptibilidade de *T. vivax* ao ISM em bovinos naturalmente infectados e mantidos em sistemas de produção, bem como a utilização da LAMP no acompanhamento da cura parasitológica no pós-tratamento. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo acompanhar bovinos leiteiros naturalmente infectados por *T. vivax* após o tratamento com ISM por meio de técnicas moleculares e sorológica.

2. Material e Métodos

A realização do presente trabalho aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal sob processo 9.277/16.

2.1. Caracterização da propriedade, sinais clínicos, seleção dos animais e tratamento

A propriedade em que foi conduzido o estudo está localizada no município de Mococa-SP (21° 28' 04" S e 47° 00' 17" W). Destinada exclusivamente à atividade de pecuária leiteira semi-intensiva, possuindo um total de 100 hectares com seis equinos e um rebanho total de 608 bovinos da raça Girolando e Gir leiteiro, vacinados contra mastite, leptospirose, complexo respiratório bovino, clostridioses, brucelose, raiva e febre aftosa, além do uso costumeiro de endectocidas. O controle de dípteros e moscas picadoras, como por exemplo, *Tabanus* spp., *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*, eram feitos com a utilização frequente de mosquicidas e com isso observou-se que durante o período experimental, os animais, por vezes, continham baixa infestação por *Stomoxys calcitrans* e ausência

de *Haematobia irritans* e dípteros do gênero *Tabanus*, não havendo consideráveis aumentos em suas populações. Ocitocina era aplicada em todos os animais antes da ordenha e o compartilhamento de seringas e agulhas era usual antes do diagnóstico de *T. vivax* no rebanho. Após o diagnóstico da tripanossomíase, com o objetivo de reduzir a transmissão de *T. vivax*, o compartilhamento deixou de existir, sendo utilizadas uma agulha e seringa por animal na ordenha e, após a utilização, os materiais eram lavados com água corrente e detergente, sendo colocadas em solução com Cloreto de alquil dimetil benzil amônio e polioxietilenonilfenileter (CB 30®, Ouro Fino Saúde Animal) por duas horas, sendo posteriormente imersos em água a 85°C por 20 minutos e secas, sendo reaproveitadas na próxima ordenha.

Suspeita-se que *T. vivax* tenha sido introduzido na propriedade através de duas vacas emprestadas para uma propriedade localizada em Rifaina-SP no início de 2012, permanecendo no local por um ano. Ao retornarem, essas vacas apresentavam baixo escore corporal, hiporexia, tosse e secreção nasal, ocorrendo o óbito de um animal logo nos primeiros dias após a chegada. Quatro meses após o retorno desses animais, foram observados outros bovinos do rebanho com emagrecimento progressivo, queda brusca na produção de leite, abortamento, tosse e morte, em média, 90 dias após o início dos sinais clínicos. Não foi observada resposta satisfatória ao uso de antibióticos, anti-inflamatórios e terapia de suporte. Com o passar do tempo, a ocorrência de animais doentes diminuiu, sendo observados casos esporádicos culminando em mortes. Entretanto, bovinos sobreviventes não recuperavam seu escore corporal anterior e, conseqüentemente, não voltavam à sua produção de leite original, ficando sempre abaixo da média do rebanho.

Diante do exposto, suspeitamos da ocorrência de tripanossomíase causada por *T. vivax*. Para o diagnóstico inicial do agente em questão na propriedade, foram coletadas amostras de sangue total acrescida de EDTA dos animais com histórico pregresso de sintomatologia clínica condizente com tripanossomíase. Para tanto foram amostrados 13,65% (83/608) dos animais do rebanho e, subseqüentemente, as amostras foram submetidas aos testes de gota espessa (Brenner, 1961) e LAMP. Apesar de todas as amostras terem sido negativas para o teste parasitológico, 40,96% (34/83) foram positivas pelo teste LAMP, dentre estas 30 amostras (Bovinos 1 a 30) foram selecionados aleatoriamente para compor o presente estudo.

Após o diagnóstico, todos os animais da propriedade, incluindo os bovinos neonatos provenientes a partir de todo o período experimental, equinos e o grupo com 30 bovinos foram tratados, no dia 0 (D0) com ISM (Vivedium[®], CEVA Saúde Animal S.A.) na dose de 1 mg/Kg, por via intramuscular profunda na tábua do pescoço, sendo o tratamento repetido no D150. Os 30 animais foram acompanhados por 240 dias, sendo colhidas amostras de sangue na veia jugular externa nos dias 0, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240, utilizando-se o sistema Vacutainer[®], com agulhas e tubos estéreis com e sem EDTA (BD Diagnostics). Amostras do D0 e D150 foram colhidas imediatamente antes da aplicação de ISM. As amostras de sangue e soro foram alíquotizadas em triplicata e armazenadas a -80°C até o momento de seu processamento. Durante o período experimental (240 dias), não houve saída e nem entrada de novos animais na propriedade. O Bovino 10 veio a óbito no dia 136 em decorrência de quadro hemorrágico agudo por lesão no úbere, não sendo possível a colheita de material a partir do D150.

2.2. Métodos Moleculares

A extração de DNA de sangue total em EDTA foi realizada fundamentada no protocolo de isolamento de DNA genômico conforme descrito por Kuramae-Izioka (1997). Para verificar eventual contaminação das amostras, em cada bateria de extração acrescentou-se água ultra pura autoclavada DNase e RNase free (Invitrogen[®], Carlsbad, USA), denominadas de controles da extração. O DNA extraído de cada amostra foi submetido à análise por espectrofotometria (Nanodrop 2000[®], Thermo Scientific, USA), obtendo-se suas concentrações e relações 260/280 e 260/230. Todas as amostras e controles da extração foram submetidas à PCR para o gene endógeno GAPDH codificador da proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, conforme descrito por Birkenheuer et al. (2003), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (GAPDH F [5'CCTTCATTGACCTCAACTACAT3'] e GAPDH R [5'CCAAAGTTGTCATGGATGACC3'], IDT[®], USA).

Para o diagnóstico de *T. vivax* pela PCR, foi utilizada a técnica descrita por Cortez et al. (2009), empregando os oligonucleotídeos iniciadores (TviCatL [5'GCCATCGCCAAGTACCTCGCCGA3'] e DT0155 [5'TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA3'], IDT[®], USA) que flanqueiam um fragmento de 177 pares de base do gene da região domínio catalítico CatL-Like, que codifica a enzima Cathepsina L-Like (CatL) de *T. vivax*.

Com objetivo de detectar infecção concomitante por *T. theileri*, todos os animais no D0 e as amostras que deram densidade óptica (DO) acima de 0,400 no ELISA foram submetidas à PCR adicional para a detecção de *T. theileri*, segundo a metodologia descrita por Rodrigues et al. (2010), na qual utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores (TthCatL1 [5`CGTCTCTGGCTCCGGTCAAAC3`] e DTO155 [5`TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA3`], IDT®, USA) que flanqueiam um fragmento de aproximadamente 273 pares de base do domínio catalítico parcial de CATL específica de *T. theileri*.

Os ensaios de PCR visando as ampliações de fragmentos dos genes GAPDH, CatL-Like de *T. vivax* e CATL de *T. theileri* foram conduzidas em termociclador (T100™ Thermal Cycler, Bio Rad, USA). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% para o gene GAPDH e 2,0% para os genes CatL-Like e CATL, corado com brometo de etídeo em tampão TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). Os resultados foram visualizados e analisados utilizando-se transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (ChemiDoc Imaging System, BioRad, USA).

Para a técnica de LAMP foi utilizado um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam um fragmento de 125 pares de bases da sequência do DNA satélite do *T. vivax* (GenBank: J03989), conforme descrito por Njiru et al. (2011). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: oligonucleotídeos iniciadores externos (F3 [5`TGTTCTGGTGGCCTGTTGC3`] e B3 [5`GGCCGGAGCGAGAGGTGC3`]), oligonucleotídeos iniciadores internos (FIP [5`GTGGAGCGTGCCAACGTGGACCCGCTCCCAGACCATA3`] e BIP [5`TGTCTAGCGTGACGCGATGGAAGAGGGAGTGGGGAAGG3`]) e oligonucleotídeos iniciadores circulares (LF [5`CACATGGAGCATCAGGAC3`] e LB [5`CCGTGCACTGTCCCGCAC3`]). Todas as reações foram conduzidas em triplicata, acompanhadas de água ultra pura como controle negativo e DNA do isolado Lins de *T. vivax* (Cadioli et al., 2012; Garcia et al., 2014) como controle positivo. As reações foram conduzidas em termociclador CFX96 (BioRad, USA) a 63°C por 60 minutos. Por fim, elevou-se a temperatura para 80°C por 5 minutos e a curva de dissociação foi realizada variando a temperatura de 63 a 96°C com incrementos de 0,5°C a cada 5 segundos. Somente as amostras que apresentaram uma variação de $\pm 0,5^\circ\text{C}$ na

temperatura de melting (TM) quando comparadas à TM do controle positivo foram consideradas positivas.

2.3. Teste sorológico

O ELISA foi realizado conforme o método descrito por Machado et al. (1997) e Aquino et al. (1999), com pequenas modificações. As placas utilizadas foram as de fundo plano Nunc MaxiSorp[®] (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA), as quais foram sensibilizadas com 0,1 µg/mL de antígeno bruto solúvel de *T. vivax* diluído e os soros controles e a serem testados foram diluídos na proporção de 1:50. O conjugado utilizado foi IgG de coelho anti-IgG de bovino acoplada à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich[®], A0705-.25ML, Saint Louis, USA) diluído na proporção de 1:30.000. Todos os soros testes foram testados em duplicata.

Com o intuito de definir o ponto de corte (PC) entre todas as placas, foram utilizados dois controles negativos e um controle positivo em todas as placas testes. Os controles negativos foram provenientes de dois bovinos fêmeas adultas pertencentes a um rebanho localizado em uma região não endêmica para a enfermidade e testadas previamente com testes moleculares (PCR e LAMP) e sorológico (ELISA) quanto a infecção por *T. vivax*, obtendo resultados negativos. Por sua vez, o controle positivo foi selecionado a partir de um bovino experimentalmente infectado com o isolado Lins de *T. vivax* (Fidelis Junior et al., 2016). Calculou-se então a média e desvio padrão (DP) das DO obtidas dos controles negativos de todas as placas, e a partir desses resultados estabeleceu-se o PC conforme a seguinte equação, descrita por Madruga et al. (2006):

$$\text{PC} = \text{Média dos controles negativos} + (3 \times \text{DP controles negativos}).$$

2.4. Análise estatística

Foi calculado o coeficiente de concordância Kappa entre os testes diagnósticos PCR, LAMP e ELISA. O teste foi interpretado segundo Landis e Koch (1977), na qual Kappa <0,00: resulta em pobre concordância; 0,00 a 0,20: ligeira concordância; 0,21 a 0,40: concordância razoável; 0,41 a 0,60: moderada concordância; 0,61 a 0,80: concordância substancial; 0,81 a 1,00: concordância quase perfeita. Para tanto, foi utilizado o software BioEstat versão 5.0.

3. Resultados e Discussão

O presente trabalho é pioneiro em utilizar a LAMP como ferramenta de diagnóstico no acompanhamento de bovinos naturalmente infectados com *T. vivax* após tratamento com fármaco tripanocida, bem como é o primeiro experimento no Brasil a acompanhar bovinos naturalmente infectados com *T. vivax* após o tratamento com ISM.

3.1. Métodos moleculares

Durante os 240 dias de período experimental, foram obtidas 326 amostras de sangue total. A média das concentrações de DNA extraído, relações 260/230 e 260/280 obtidas foram $97,43 \pm 87,291$ ng/ μ L, $0,72 \pm 0,334$, $1,57 \pm 0,543$, respectivamente. Todas as amostras analisadas foram positivas para o gene GAPDH, exceto os controles da extração, estando, portanto, aptas para o diagnóstico molecular.

Na PCR para *T. vivax* houve detecção de animais positivos em cinco momentos, sendo quatro após a primeira aplicação de ISM (D60, D90, D120 e D150) e após a segunda aplicação, em D210 (Figura 1). Todos os controles da extração foram negativos na PCR para *T. vivax*. De maneira geral, a PCR detectou DNA de *T. vivax* em apenas 1,84% (6/326) das amostras entre D0 a D240, entretanto no período pós-tratamento (D7 a D240) a PCR detectou 2,03% (6/296) das amostras. Foram positivos os bovinos 1 (D90), 8 (D210), 11 (D210) e 20 (D120) e o bovino 5 foi positivo em dois momentos (D60 e D150).

Por outro lado, a LAMP detectou amostras com DNA de *T. vivax* em todos os momentos das análises, com detecção global de 25,77% (84/326) das amostras. Os controles da extração foram negativos em todas as análises. No período pós-tratamento (D7 a D240), a LAMP relevou a presença de DNA de *T. vivax* em 18,24% (54/296) nas amostras. Maior número de amostras positivas foi observado em D7 (9/30) e D120 (9/30), por outro lado, menores números de amostras positivas foram observados em D60 (2/30) e D210 (2/29), 60 dias após a primeira e segunda aplicação de ISM, respectivamente (Figura 1). Analisando os animais individualmente durante o período de acompanhamento (D0 a D240), flutuação de positividade pode ser observado em todos os animais, com exceção dos bovinos 7, 14, 15, 18, 23, 28 e 30 que se apresentaram constantemente negativo (Tabela 1).

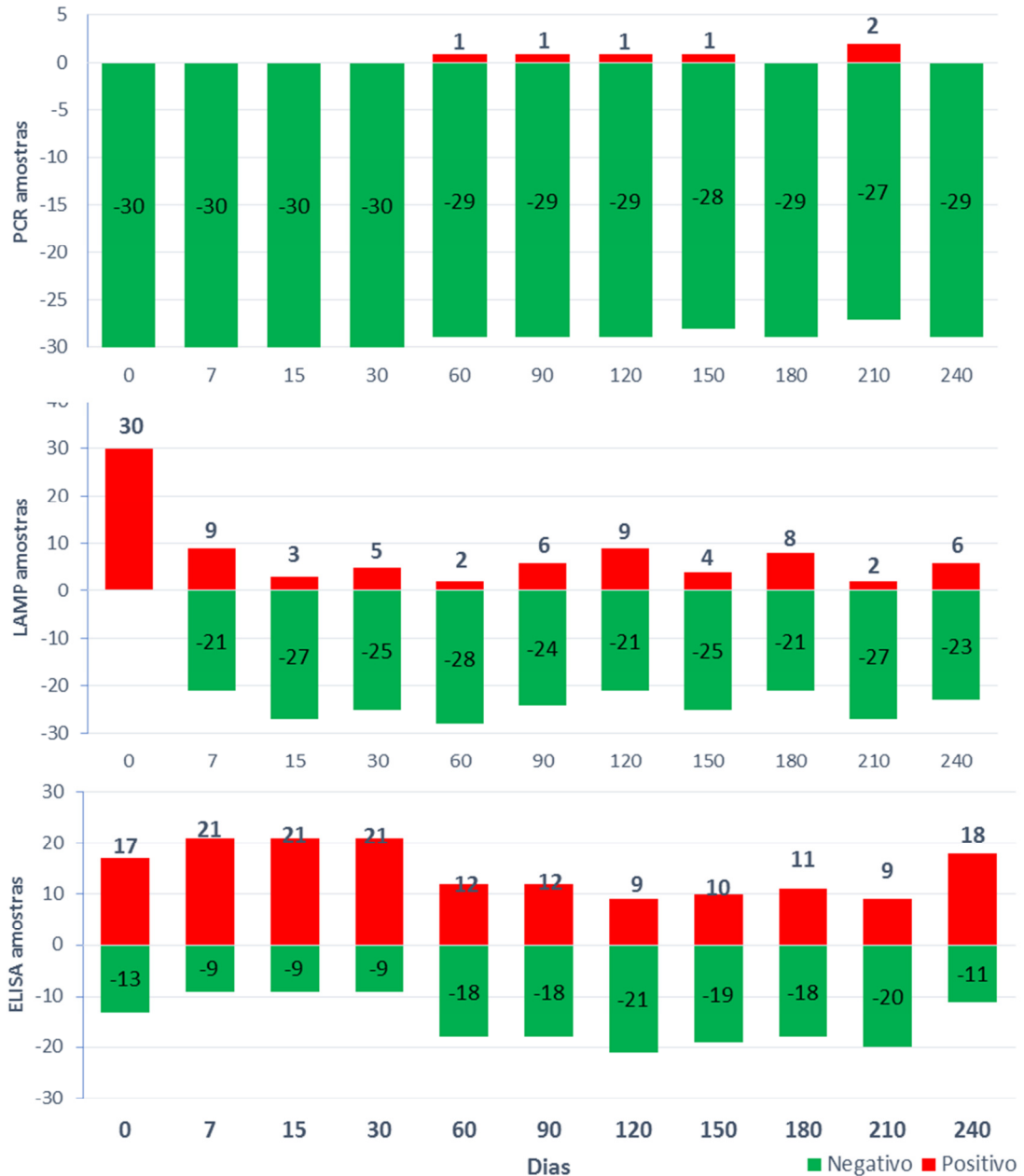


Figura 1. Detecção de animais positivos e negativos para *Trypanosoma vivax*, pelas técnicas de PCR, LAMP e ELISA em amostras de sangue ou soro de bovinos naturalmente infectados com *Trypanosoma vivax*, antes e após o tratamento com cloridrato de isometamidium, na dose de 1 mg/Kg.

Tabela 1. Dinâmica de detecção de DNA de *Trypanosoma vivax* pela LAMP, nos animais que apresentaram flutuações de DNA detectável após o tratamento com cloridrato de isometamidium, na dose de 1 mg/Kg.

Animal	D0	D7	D15	D30	D60	D90	D120	D150	D180	D210	D240
Bovino 1	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
Bovino 2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Bovino 3	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Bovino 4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Bovino 5	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Bovino 6	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Bovino 8	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Bovino 9	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Bovino 10	+	+	-	-	-	+	-	x	x	x	x
Bovino 11	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Bovino 12	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Bovino 13	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Bovino 16	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Bovino 17	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Bovino 19	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Bovino 20	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
Bovino 21	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Bovino 22	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Bovino 24	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Bovino 25	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Bovino 26	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Bovino 27	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Bovino 29	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: + (Positivo); - (Negativo); x (amostras perdidas)

A média e desvio padrão dos ciclos de quantificação (Cq) das amostras positivas na LAMP foram de $39,37 \pm 12,354$, o que caracteriza amostras com baixa quantidade de DNA. Para o controle positivo obteve-se Cq médio de $15,43 \pm 1,482$. A TM foi de $87,50^{\circ}\text{C}$, sendo, portanto consideradas amostras positivas aquelas contidas no intervalo entre $87,00$ e $88,00^{\circ}\text{C}$.

A LAMP é uma ferramenta disponível para o diagnóstico de vários agentes patogênicos e está sendo utilizada cada vez mais no diagnóstico da tripanossomíase humana (Grab et al., 2011) e animal (Haji et al., 2015). Quando analisamos os resultados da LAMP, nota-se que para todos os dias de avaliação houve a persistência de detecção de animais albergando DNA de *T. vivax* após o tratamento, não havendo grandes diferenças entre a quantidade de animais positivos e os dias correspondentes à primeira (D7 a D150) e segunda aplicação de ISM (D180 a D240).

Durante todo o período de acompanhamento dos animais, com exceção do D210, a LAMP apresentou maior capacidade de detecção de amostras positivas para *T. vivax* em comparação à PCR. Aumento na capacidade diagnóstica de animais infectados com *Trypanosoma* spp. também foi observado por outros autores quando a LAMP foi utilizada, apresentando melhores resultados em relação à PCR (Cadioli et al., 2015; Laohasinnarong et al., 2015). A maior capacidade diagnóstica da LAMP é devido ao fato de esta técnica apresentar limiar de detecção de 1 pg de DNA, o que corresponde a 1 tripanosoma.mL⁻¹ de sangue (Njiru et al., 2011).

Por outro lado, apesar da PCR detectar a presença de DNA de *T. vivax* em alguns momentos no pós-tratamento, a utilização desta técnica resultou em falha no diagnóstico em todos os dias, com exceção do D210, no qual os dois animais detectados pela PCR também foram positivos na LAMP. Heparina, hemoglobina livre, mioglobina, anticorpos e contaminação por fezes, podem inibir a PCR por inativar a *Taq* DNA polimerase (Kuboki et al, 2003; Grab et al., 2005; Schrader et al., 2012), situação menos susceptível de ocorrer na LAMP (Kaneko et al. 2007; Nimitphak et al., 2008). Contudo, a presença de inibidores de reação pôde ser descartada no presente estudo, pois todas as amostras testadas foram positivas para o gene endógeno, assegurando assim a qualidade das amostras obtidas, bem como mostrando integridade do DNA extraído.

No entanto, baixas concentrações de DNA de *T. vivax*, relacionadas a baixas parasitemias dos animais, também podem afetar a taxa de detecção do DNA alvo por meio da PCR (Morlais et al., 2001; Cadioli et al., 2015). No presente estudo, obtivemos amostras positivas na LAMP com a média de Cq alto (39,37), o que indica que os animais positivos apresentavam baixas parasitemias, justificando dessa forma a falha na detecção de animais positivos pela PCR. Estudos de Cadioli et al. (2015) e Fidelis Junior et al. (2016) evidenciaram que na fase crônica da infecção, o *T. vivax* tende a apresentar parasitemias muito baixas no decorrer da infecção, o que dificulta muito o diagnóstico da enfermidade nos rebanhos.

Deste modo, a LAMP mostrou-se uma ferramenta muito útil no acompanhamento de cura parasitológica de animais infectados com *T. vivax*, identificando os animais positivos ao longo do tempo e, por conseguinte, mostrando-se ser um teste de diagnóstico sensível para avaliar a situação pontual do rebanho. Não podemos dizer o mesmo para a PCR, que não foi capaz de detectar grande parte das amostras positivas, inclusive antes do tratamento (D0), o que pode induzir a erros na estratégia de tratamento de rebanhos, pois pelo teste, assume-se que o tratamento foi efetivo, quando na verdade a sensibilidade é baixa em decorrência das baixas parasitemias nas quais os animais se encontram. Desta forma, essa técnica contribui para a manutenção de animais “aparentemente” curados nos rebanhos, os quais, conseqüentemente, proporcionam a manutenção do parasita na propriedade e também promovem a disseminação do mesmo através de rotas comerciais, tornando-se o principal fator da dispersão do parasita (Silva et al., 1998; Jones e Dávila, 2001).

Ao longo dos 240 dias de acompanhamento após o tratamento, houve flutuação na detecção de DNA de *T. vivax* nos bovinos, o que pode ser explicado pela eliminação transitória dos parasitas, achado este que corrobora com as observações encontradas por outros autores após tratamento com ISM, seja pelo método diagnóstico parasitológico (Dagnachew et al., 2015) ou molecular (Vitouley et al., 2012). A presença de animais que apresentam recirculações de *T. vivax* após o tratamento com ISM é uma informação muito importante para ações de controle da enfermidade, sendo necessário manter o monitoramento constante do rebanho em

tratamento, evitando assim reinfecções no rebanho, gerando novos impactos no rebanho.

3.2. Teste sorológico

Por meio da determinação da média e DP dos controles negativos, os quais foram $0,117 \pm 0,031$, respectivamente, calculou-se o PC entre as placas, como descrito anteriormente, resultando no valor de 0,209. Para o controle positivo, o valor médio e DP das DOs foram $1,079 \pm 0,148$, respectivamente. No geral, o ELISA detectou 49,39% (161/326) de amostras albergando anticorpos anti-*T. vivax*, sendo observado também, por este teste, que 48,65% (144/296) das amostras foram soropositivas para *T. vivax* no período após o tratamento (D7 a D240).

Muito embora tenha sido notada a presença de animais soropositivos em todos os dias pós-tratamento, é possível observar que após a primeira aplicação de ISM, houve diminuição destes, com menor quantidade de animais no D120 (Figura 1). É possível notar também que houve redução dos valores médios de DOs dos animais, ficando próximo ao ponto de corte e atingindo menores valores no D60 e D150, porém ainda com a presença de animais com DO acima de ponto de corte (Figura 2). Por sua vez, a segunda aplicação de ISM (D150) não interferiu na soronegativação dos animais positivos remanescentes após a primeira aplicação do fármaco, com elevação na quantidade de animais soropositivos e na DO média desses, no último dia de análise (D240) (Figuras 1 e 2).

A soronegativação dos animais positivos no D0 ocorreu em cinco momentos, sendo eles D7, D15, D60, D120 e D180. O bovino 1 tornou-se soronegativo no D7; bovino 3 no D15; bovinos 7, 11, 17, 22 e 27 no D60; bovinos 5, 20 e 21 no D120 e por fim o bovino 18 no D180. Flutuações no diagnóstico durante o período experimental (D0 a D240) foram observadas nos bovinos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 24 e 26 (Tabela 2). Os bovinos 17, 22 e 27 mantiveram-se como soronegativos em todo o período experimental, após a primeira aplicação de ISM. Os bovinos 10, 12, 16, 25, 29 e 30 permaneceram soropositivos em todas as análises realizadas, por outro lado os bovinos 9, 13, 23 e 28 mantiveram-se soronegativos por todo o período experimental.

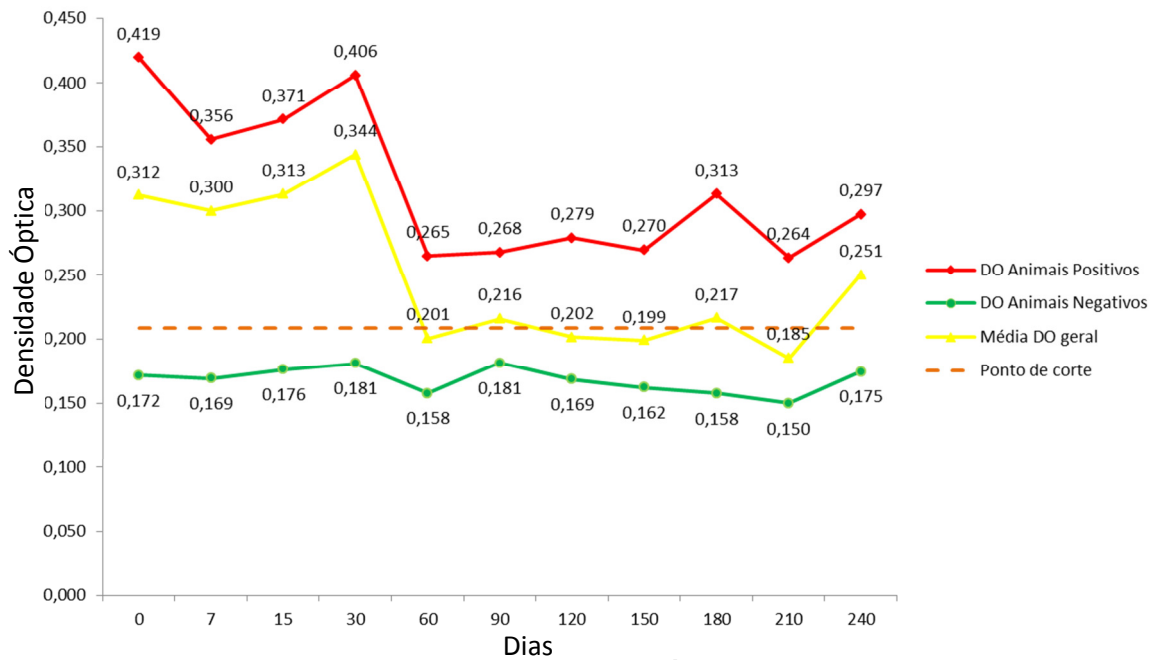


Figura 2. Valores médios das Densidades Ópticas por momentos das amostras de soro de bovinos naturalmente infectados com *Trypanosoma vivax*, antes e após o tratamento com cloridrato de isometamidium, na dose de 1 mg/Kg.

ELISA é uma técnica amplamente utilizada em estudos soro-epidemiológicos para infecções por *T. vivax* tanto na África (Dagnachew e Bezie, 2015) quanto na América do Sul (Osório et al., 2008; Sampaio et al., 2015), fornecendo valiosas informações sobre a ocorrência da doença no rebanho. No presente estudo, apesar deste método ter diagnosticado apenas 17 dos 30 animais tidos como positivos pelo teste da LAMP no D0 (Figura 1), o referido teste sorológico apresentou maior capacidade de detecção de animais positivos no período de pós-tratamento em relação aos métodos moleculares utilizados. Segundo Nantulya. (1990), o ELISA é altamente sensível para diagnóstico de *T. vivax*, porém há relatos de resultados não satisfatórios, apresentando menor sensibilidade em relação a PCR (Desquesnes, 1997) e à LAMP (Cadioli et al., 2015), situações não observadas em nosso experimento, levando em consideração a detecção global de amostras positivas.

Tabela 2. Dinâmica de detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma vivax* pelo teste sorológico ELISA, nos animais que apresentaram flutuações de diagnóstico após o tratamento com cloridrato de isometamidium, na dose de 1 mg/Kg.

Animal	D0	D7	D15	D30	D60	D90	D120	D150	D180	D210	D240
Bovino 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Bovino 2	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Bovino 3	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Bovino 4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Bovino 5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Bovino 6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Bovino 7	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
Bovino 8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Bovino 11	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Bovino 14	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Bovino 15	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Bovino 18	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Bovino 19	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Bovino 20	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Bovino 21	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Bovino 24	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Bovino 26	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+

Legenda: + (Positivo); - (Negativo).

Com o passar do tempo, os níveis de anticorpos tendem a diminuir progressivamente após o tratamento. Desquesnes et al. (2003) e Monzon et al. (2003), utilizando métodos de ELISA com antígenos bruto solúveis de *T. vivax* e *T. evansi*, observaram que isto ocorre a partir de 2 e 2,3 meses em bovinos e equinos naturalmente infectados por *T. vivax* e *T. evansi* após o tratamento com AD e sulfato de quinapiramina, respectivamente. No presente trabalho seis animais permaneceram soropositivos até o final do acompanhamento e, para aqueles que soronegativaram, grande parte ocorreu com 60 dias após a primeira aplicação de ISM. Esse comportamento foi igualmente observado por Desquesnes et al. (2003) e Pillay et al. (2013) em bovinos experimentalmente infectados com *T. vivax*. Pillay et al. (2013) utilizando antígeno recombinante GM6 de *T. vivax*, notaram que o momento em que a maioria dos animais soronegativaram foi em 30 dias após o tratamento com AD. Por outro lado, Desquesnes et al. (2003), utilizando antígeno bruto solúvel de *T. vivax*, obtiveram um maior valor, como sendo de 90 dias, também após o tratamento com AD.

No D7 houve uma evidente negativação de animais pela LAMP, porém pelo ELISA o decaimento de animais soropositivos e das DOs média ocorreram a partir do D60 (Figuras 1 e 2). Tendência similar foi observada por Bengaly et al. (2001) utilizando os métodos de diagnóstico molecular (PCR) e sorológico (ELISA) na avaliação de eficácia terapêutica de AD em ovinos experimentalmente infectados com *T. vivax* e *T. congolense*, na qual, pela PCR, a negativação dos animais ocorreu um a dois dias após o tratamento, período este anterior aos 60 a 100 dias obtidos pelo ELISA. Essa tendência tardia de alteração do perfil do ELISA na redução gradual dos títulos de anticorpos após o tratamento comparativamente aos testes moleculares, os quais mostram resultados negativos em momentos anteriores, indicam que os resultados de métodos sorológicos como o ELISA, devam ser interpretados em uma série histórica longa ou realizados em conjunto com técnicas moleculares, evitando desta forma erros na avaliação da real situação do rebanho.

As técnicas de ELISA, como a realizada no presente estudo, destinadas à detecção de anticorpos contra *Trypanosoma* spp. são muitas vezes realizadas utilizando antígenos bruto solúveis de tripanosomas lisados. Tal fato faz do ELISA um teste de difícil padronização e com possibilidade de apresentar reações

sorológicas cruzadas com outras espécies de tripanosomas, incluindo *T. theileri* (Luckins, 1977; Desquesnes et al., 2001, Jones e Dávila, 2001). *T. theileri* são parasitas cosmopolitas que se não estiverem associados a outras infecções concomitantes ou condições de estresse, não são patogênicos para bovinos e búfalos. Tal espécie de tripanosoma já foi detectado em bovinos hígidos no estado de São Paulo, Brasil (RODRIGUES et al., 2003; DESQUESNES, 2005).

Como o intuito de detectar possível parasitismo por *T. theileri* aos animais do presente estudo e, desta forma, podendo estar influenciando nas leituras dos dados de ELISA que obtivemos, foi realizada a PCR para o diagnóstico deste hemoprotozoário em 56 amostras, sendo compostas por todos os animais no D0 (30 amostras) e 26 amostras as quais apresentaram DO acima de 0,400. Todas as amostras testadas não continham DNA de *T. theileri*, assegurando dessa forma a especificidade do teste de ELISA.

Os resultados das correlações Kappa entre LAMP e PCR (0,10) e, LAMP e ELISA (0,02) indicam ligeira concordância e, entre PCR e ELISA (-0,02), pobre concordância. Esses resultados são reflexos das diferentes taxas de detecções pelos testes que obtivemos no presente estudo, taxas estas, inerentes a diferentes alvos de detecção de cada técnica utilizada. O que reforça a necessidade da combinação de testes sorológicos e moleculares no diagnóstico de rebanhos naturalmente infectados por *T. vivax*.

No continente Africano, recirculação de *T. vivax* em bovinos após o tratamento com ISM tem sido relatada com frequência cada vez maior (Dagnachew e Bezie, 2015) e são associados à utilização dos princípios ativos por longos períodos, sub-dosagens e formulações com concentrações inadequadas do quimioterápico (Dagnachew et al., 2015; Tekle et al., 2018). Além do mais, recirculação de parasitas após tratamento foi correlacionado com a presença de *T. vivax* em locais de refúgio, como o líquido cefalorraquidiano, plexo coróide e humor aquoso (Whitelaw et al., 1988; Batista et al., 2011), locais nos quais o fármaco não atinge concentrações efetivas mesmo durante o período de profilaxia (Giordani et al., 2016), que seria de até 160 dias para a dose de ISM de 1 mg.kg^{-1} (TORO et al., 1983). Portanto, podemos hipotetizar que a persistência de detecção de DNA de *T. vivax* observado pelos métodos moleculares poderia ser oriunda a partir de parasitas

mortos abandonando seus locais de refúgio e retornando para a corrente circulatória sob a ação do ISM. Por outro lado, os resultados de ELISA mostram que houve animais soropositivos em todos os dias das análises, com a menor percentagem de detecção representada por 30% (9/30) da amostragem (Figura 1), mesmo após a segunda aplicação do ISM. Tal fato indica a ocorrência de estímulos de antígenos de *T. vivax*, possivelmente provenientes da seleção de parasitas pelo tratamento o que pode ter culminado com a manutenção da infecção nos animais.

Testes para avaliação de resistência a drogas tripanocidas podem ser realizados por métodos *in vivo*, *in vitro* ou por moleculares. Os testes *in vivo*, tendo exemplo a utilização de bovinos em seu local de origem, são métodos que não requerem o isolamento de parasitas e são propostos para avaliar diretamente uma provável resistência no campo em uma determinada localidade, sendo seus resultados apenas indicativos de resistência (Giordani et al., 2016). Porém, no campo, os resultados provenientes desses métodos são susceptíveis de serem oriundos de uma reinfecção dos animais após o tratamento, principalmente em áreas com grande exposição dos animais a vetores mecânicos e biológicos e, com a utilização de fármacos sem efeito profilático (Moti et al., 2015).

Porém, no presente estudo, apesar da presença de moscas picadoras (*Stomoxys calcitrans*) na propriedade, elas estavam controladas, isto é, por vezes os animais estavam expostos a uma leve infestação; nós realizamos o acompanhamento mensal de um grupo de animais para diagnóstico de *T. vivax*, bem como todos os animais da propriedade foram tratados com um fármaco que apresenta propriedades profiláticas por longo período de tempo, não houve chegada de novos animais na propriedade e, aliados a nossos resultados da presença de animais positivos na sorologia e também albergando DNA de *T. vivax* em todos os momentos de avaliações, nos permite dizer que não houve reinfecção dos animais durante o período de acompanhamento e que o tratamento pode ter selecionado *T. vivax* resistente ao ISM. Este é um fato preocupante, pois implica em falhas nos tratamentos dos rebanhos quando o ISM é utilizado de forma pontual e sem o embasamento diagnóstico adequado, o que pode favorecer a seleção de isolados de *T. vivax* resistentes ao ISM, o qual foi recentemente licenciado à comercialização no Brasil.

4. Conclusões

Embora os testes LAMP e ELISA apresentaram-se como técnicas de grande utilidade para promover o diagnóstico e monitoramento de bovinos naturalmente infectados com *T. vivax*, é necessária a combinação destes testes em rebanhos após o tratamento. Por outro lado, a PCR não é indicada para o diagnóstico de *T. vivax* em bovinos apresentando baixas parasitemias. O tratamento de bovinos naturalmente infectados com a dose profilática de ISM evidenciou possível presença de *T. vivax* resistentes ao quimioterápico no Brasil, informação muito importante na estruturação de futuras estratégias de contenção da doença em rebanhos bovinos brasileiros.

5. Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido em forma de bolsa, processo número 2015/25397-6, assim como à CEVA Saúde Animal S.A, pelo fornecimento do Vivedium® para o desenvolvimento do trabalho.

6. Referências

Aquino LPCT, Machado RZ, Alessi AC, Marques LC, Castro MB, Malheiros EB (1999) Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94:255-260.

Batista JS, Rodrigues CMF, García HA, Bezerra FSB, Olinda RG, Teixeira MMG, Soto-Blanco B (2011) Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. **Veterinary Research** 42:1-7.

Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF (2007) Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology** 143:174–181.

Bastos TSA, Faria AM et al. (2017) First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 26:366-371.

Bengaly Z, Kasbari M, Desquesnes M, Sidibé I (2001) Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. **Veterinary Parasitology** 96:101-113.

Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB (2003) Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology** 41:4172-4177.

Brener Z (1961) **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas**. 79 f. Tese (Livre Docência) Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia e Farmácia.

Cadioli FA, Fidelis Junior OL, Sampaio PH, Santos GN, André MR, Castilho KJGA, Machado RZ (2015) Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. **Veterinary Parasitology** 214:174-177.

Cadioli FA, Barnabé PA, Machado RZ, Teixeira MC, André MR, Sampaio PH, Fidelis Junior OL, Teixeira MM, Marques LC (2012) First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 21:118-124.

Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia AH, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, Paiva F, Teixeira MMG (2009) Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and south America – characterization, relationships and diagnostic implications. **Molecular and Cellular Probes** 23:44-51.

Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MFB (2010) Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology** 169:320-326.

Dagnachew S, Bezie M (2015) Review on *Trypanosoma vivax*. **African Journal of Basic & Applied Sciences** 7:41-64.

Dagnachew S, Terefe G, Abebe G, Barry D, McCulloch R, Goddeeris B (2015) In vivo experimental drug resistance study in *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. **Acta Tropica** 146:95-100.

Dávila AMR, Herrera HM, Schlebinger T, Souza SS, Traub-Cseko YM (2003) Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology** 117: 1-13.

Dávila AMR, Silva RAMS (2000) Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. **Annals of the New York Academy of Sciences** 916: 199-212.

Desquesnes M (2005) Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene** 99:716.

Desquesnes M, Bengaly Z, Dia ML (2003) Evaluation de la persistance des anticorps détectés par Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* après traitement trypanocide chez des bovins naturellement infectés. **Revue D'élevage Et De Médecine Vétérinaire Des Pays Tropicaux** 56:141-144.

Desquesnes M, Bengaly Z, Millogo L, Meme Y, Sakande H (2001) The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology** 95:141-155.

Desquesnes M (1997) Evaluation of simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immunosorbent assay. **Acta Tropica** 65:139-148.

Desquesnes M; La Rocque M, Peregrine AS (1995) French Guyanan stock of *Trypanosoma vivax* resistant to diminazene aceturate but sensitive to isometamidium chloride. **Acta Tropica** 60:133-136.

Fidelis Junior OL, Sampaio PH, Machado RZ, André MR, Marques LC, Cadioli FA (2016) Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology** 25: 69-81.

Garcia HA, Rodrigues AC et al. (2014) Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. **Parasites & Vectors** 7:1-13.

Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, De Koning HP, Barrett MP (2016) The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology** 143: 1862-1889.

Grab DJ, Nikolskaia OV, Inoue N, Thekisoe OM, Morrison LJ, Gibson W, Dumler JS (2011) Using detergent to enhance detection sensitivity of African trypanosomes in human CSF and blood by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). **PLoS Neglected Tropical Diseases** 5:1249.

Grab DJ, Lonsdale-Eccles J, Inoue N. Lamp for tadpoles (2005). **Nature Methods** 2:635.

Haji IJ, Sugimoto C, Kajino K, Malele I, Simukoko H, Chitambo H, Namangala B (2015) Determination of the prevalence of trypanosome species in cattle from Monduli district, northern Tanzania, by loop mediated isothermal amplification. **Tropical Animal Health and Production** 47:1139-1143.

Jones T, Dávila AMR (2001) *Trypanosoma vivax* out of Africa. **Trends Parasitology** 2: 99–101.

Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T (2007) Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods** 70:499-501.

Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, Sugimoto C, Igarashi I (2003) Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. **Journal of Clinical Microbiology** 41:5517-5524.

Kuramae-Izioka EE (1997) A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar** 19:683-689.

Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics** 33:159-174.

Laohasinnarong D, Goto Y, Asada M, Nakao R, Hayashida K, Kajino K, Kawazu S, Sugimoto C, Inoue N, Namangala B (2015) Studies of trypanosomiasis in the Luangwa valley, north-eastern Zambia. **Parasites & Vectors** 8:1-8.

Luckins AG (1977) Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. **Tropical Animal Health and Production** 9:53-62.

Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos EG, Machado MRF, Valadão IFF, Barci LG, Malheiros EB (1997) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology** 71:17-26.

Monzon CM, Mancebo OA, Russo AM (2003) Antibody levels by indirect ELISA test in *Trypanosoma evansi* infected horses following treatment with quinapyramine sulphate. **Veterinary Parasitology** 111: 59-63.

Morlais I, Ravel S, Grébaud P, Dumas V, Cuny G (2001) New molecular marker for *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* identification. **Acta Tropica** 80:207-213.

Moti Y, De Deken R, Thys E, Van Den Abbeele J, Duchateau L, Delespaux V (2015) PCR and microsatellite analysis of diminazene aceturate resistance of bovine trypanosomes correlated to knowledge, attitude and practice of livestock keepers in South-Western Ethiopia. **Acta Tropica** 146:45-52.

Nantulya VM (1990) Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. **Revue Scientifique et Technique** 9:357-367.

Njiru ZK, Ouma JO, Bateta R, Njeru SE, Ndungu K, Gitonga PK, Guya S, Traub R (2011) Loop-mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma vivax* based on satellite repeat DNA. **Veterinary Parasitology** 180:358-62.

Nimitphak T, Kiatpathomchai W, Flegel TW (2008) Shrimp hepatopancreatic parvovirus detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick. **Journal of Virological Methods** 154:56-60.

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

Pillay D, Izotte J et al. (2013) *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. **Plos One** 8:e78565.

Pimentel DS, Ramos CAN, Ramos RAN, Araújo FR, Borba ML, Faustino MAG, Alves LC (2012) First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco. **Veterinary Parasitology** 185:286-289.

Rodrigues AC, Garcia HA et al. (2010) Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: Cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. **Parasitology International** 59:318-325.

Rodrigues AC, Campaner M, Takana CSA, A Dell' Porto, Milder RV, Takeda GF, Teixeira MMG (2003) Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. **Veterinary Parasitology** 116:185-207

Sampaio PH (2017) **Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação da efetividade do tratamento contra *Trypanosoma vivax* em caprinos experimentalmente infectados**. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Sampaio PH, Fidelis Junior OL, Marques LC, Machado RZ, Barnabé PA, André MR, Balbuena TS, Cadioli FA (2015) Acute-phase protein behavior in dairy cattle herd naturally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology** 211:141–145.

Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R (2012) PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology** 113: 1014-1026.

Seidl AF, Dávila AMR, Silva RAMS (1999) Estimated Financial Impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 64:269-272.

Silva RAMS, Eguez A, Morales G, Eulert E, Montenegro A, Ybañez R, Seidl A, Dávila AMR, Ramirez L (1998) Bovine Trypanosomiasis in Bolivian and Brazilian Lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 93:29-32.

Tekle T, Terefe G et al. (2018) Aberrant use and poor quality of trypanocides: a risk for drug resistance in south western Ethiopia. **Veterinary Research** 14:1-8.

Toro M, León E, López R, Pallota F, Garcia JA, Ruiz A (1983) Effect of isometamidium on infections by *Trypanosoma vivax* and *T. evansi* in experimentally infected animals. **Veterinary Parasitology** 13:35-43.

Vitouley HS, Sidibe I, Bengaly Z, Marcotty T, Van Den Abbeele J, Delespaux V (2012) Is trypanocidal drug resistance a threat for livestock health and production in endemic areas? Food for thoughts from Sahelian goats infected by *Trypanosoma vivax* in Bobo Dioulasso (Burkina Faso). **Veterinary Parasitology** 190:349-354.

Whitelaw DD, Gardiner PR, Murray M (1988) Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. **Parasitology** 97:51-61.