

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/08/2020.

**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 – Gliceraldeido 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.

#### 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.