

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/07/2024.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS,
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE
Trypanosoma Vivax EM BOVINOS NO BRASIL**

Angelo Estevão Sant'Anna Donadon

Médico Veterinário

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS,
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE
Trypanosoma Vivax EM BOVINOS NO BRASIL**

Angelo Estevão Sant´Anna Donadon

**Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Zacarias
Machado**

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).

D6741

Donadon, Angelo Estevão Sant'Anna

Levantamento soroepidemiológico de Trypanosoma vivax em bovinos no Brasil / Angelo Estevão Sant'Anna Donadon. -- Jaboticabal, 2023

62 p. : tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Rosângela Zacarias Machado

1. Medicina veterinária. 2. Doença grandes animais. 3. Trypanosoma vivax. 4. Soroepidemiologia. I. Título.

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.

Impacto potencial desta pesquisa

Esta dissertação teve por objetivo detectar anticorpos anti- *Trypanosoma vivax* em rebanhos bovinos no Brasil. Com os resultados obtidos, demonstrou-se que este parasita vem causando prejuízos econômicos na produção nacional de leite e carne bovina.

Potential impact of this research

This dissertation aimed to detect anti- *Trypanosoma vivax* antibodies in cattle herds in Brazil. With the obtained results, it was demonstrated that this parasite causes economic damage in the national milk and beef production

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE *Trypanosoma vivax* EM BOVINOS DO BRASIL

AUTOR: ANGELO ESTEVÃO SANT'ANNA DONADON
ORIENTADORA: ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

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




Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dr. ANDRÉA PEREIRA DA COSTA (Participação Virtual)
Depto. de Patologia / Universidade Estadual do Maranhão - São Luís/MA



Documento assinado digitalmente
ANDRÉA PEREIRA DA COSTA
Data: 21/01/2023 11:57:54-0300
Verifique em <https://verificador.br.br>



Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV UNESP Câmpus de Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de janeiro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Angelo Estevão Sant'Anna Donadon, nascido em 17 de junho de 1993, na cidade de Bebedouro- SP, ingressou no curso técnico em agropecuária na Escola Técnica Estadual Prof. Matheus Leite de Abreu, Mirassol- SP, em 2008, colando grau em 2010. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF) de Garça - SP em fevereiro de 2012, colando grau em janeiro de 2017. Em março 2017, ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional em Clínica Médica de Grandes Animais na Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA) da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Araçatuba – SP, finalizando em fevereiro de 2019. Em março de 2019, 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 da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Aldo Humberto Donadon e Sônia Maria Sant'Anna Donadon, por serem os pilares da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pois sem ELE nada seria na vida.

Aos meus pais, Aldo Humberto Donadon e Sônia Maria Sant'Anna, por todo carinho, educação e sabedoria que me forneceram durante toda a vida e minha irmã Camila Sant' Anna Donadon por sempre estar presente em minha vida incentivando e apoiando.

A minha namorada Brenda Mendonça de Alcântara, pelo imenso apoio e paciência comigo nos momentos mais difíceis.

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

Aos colegas da pós-graduação, pela amizade.

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

À IMUNODOT, pelo fornecimento dos dados para o desenvolvimento do trabalho.

À CEVA Saúde Animal S.A, pelo envio de amostras para a realização dos testes sorológicos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias por terem me acolhido para a realização do curso de Mestrado Acadêmico.

À CAPES, pela bolsa de Mestrado concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Análise de indicadores econômicos e produtivos em propriedades com surto de *Trypanosoma vivax* na região Sudeste do Brasil**", protocolo nº 010276/19, 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 julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de 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 15 de agosto de 2019.

| | |
|---------------------|-------------------------|
| Vigência do Projeto | 01/09/2019 a 01/05/2020 |
| Espécie / Linhagem | Bovina |
| Nº de animais | 400 animais |
| Peso / Idade | 400 kg / Média 4 anos |
| Sexo | Fêmeas |
| Origem | Estância Nogueira |

Jaboticabal, 15 de agosto de 2019.

Fabiana Pilarski
Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellano, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/SP - Brasil
tel. 13 3209 7100 - www.fcv.unesp.br

LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE *Trypanosoma Vivax* EM BOVINOS NO BRASIL

RESUMO- O *Trypanosoma vivax* é responsável por significativas perdas econômicas na bovinocultura da América do Sul e África. No Brasil, observa-se a disseminação da doença em bovinos nos países, através dos relatos de surtos que encontramos na literatura. Durante o ciclo de vida do parasita, observam-se diferentes fases. Onde ocorrem períodos de alta parasitemia com a presença na circulação sanguínea e baixa parasitemia podendo estar em órgãos, gordura e pele. Os métodos de diagnósticos utilizados são: parasitológico necessitando a presença do parasita circulante, métodos imunológicos realizando a detecção de anticorpos no soro dos animais e métodos moleculares detectando a presença do DNA do parasita. Nos métodos imunológicos o Elisa teste é o mais indicado devido sua sensibilidade e especificidade. Neste estudo, foi utilizado para o Elisa teste a proteína recombinante Tv (Imunodot®). O estudo avaliou amostras de soros bovinos de propriedades com suspeita de infecção de *T. vivax*, no período de junho de 2020 a julho de 2021. As amostras de soros foram coletadas e enviadas de 14 estados brasileiros, provenientes de 287 municípios, totalizando 5.114 amostras, das quais 2.886 positivas (56,5%) e 2.228 amostras negativas (43,5%). As positivas foram classificadas em positivas fracas, médias e fortes. Dessa forma, foi possível obter um panorama de como o *T. vivax* vem se disseminando pelos estados e pelos municípios do território nacional desde os primeiros relatos até os dias de hoje.

Palavras-chave: Elisa-teste, *Trypanosoma vivax*, tripanossomíase, sorologia, proteína recombinante e epidemiologia.

SEROEPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF *Trypanosoma Vivax* IN CATTLE IN BRAZIL

ABSTRACT- *Trypanosoma vivax* is responsible for significant economic losses in cattle in South America and Africa. In Brazil, the spread across the country is observed due to reports of outbreaks found in the literature. Due to the life cycle of the parasite, different phases are observed, where there are phases of high parasitaemia with the presence in the circulation and low parasitaemia that may be in organs, fat and skin. The diagnostic methods used are: parasitological requiring the presence of the circulating parasite, immunological methods performing the detection of antibodies in the serum of the animals and molecular methods detecting the presence of the parasite's DNA. In immunological methods, the Elisa test is the most indicated due to its sensitivity and specificity. In this study, we used the recombinant protein Tv (Imunodot®) for the Elisa test. The study evaluated samples of bovine sera from properties with suspected *T. vivax* infection, from June 2020 to July 2021. Samples were collected and sent from fourteen Brazilian states, from 287 municipalities, totaling 5.114 samples, from of which 2.228 negative samples (43.5%) and 2.886 positive (56.5%) positive samples were divided into weak positive, medium positive and strong positive. In this way, it was possible to obtain an overview of how *T. vivax* is spreading through the states and municipalities of the national territory from the first reports to the present day.

Keywords: Elisa test, *Trypanosoma vivax*, trypanosomiasis, serology, recombinant protein and epidemiology.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

Hemoparasitas do gênero *Trypanosoma* acometem humanos e espécies de animais domésticos e silvestres nos continentes africano, asiático e americano (Dávila et al., 2003). No continente africano, as espécies *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma congolense* são as principais causadoras de enfermidades em bovinos, porém, as espécies *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma brucei brucei* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* também são encontrados em bovinos (Haji et al., 2015; Morrison et al., 2016). No continente americano, a espécie *T. vivax* é o principal agente da tripanosomíase, causando sinais clínicos da doença em ruminantes (Jones e Dávila, 2001). Há relatos de surtos da doença no Brasil desde os anos de 1972 chegando aos últimos anos (Shaw e Lainson, 1972; Batista et al., 2017; Lopes et al., 2018).

A transmissão desse protozoário no continente africano é cíclica, e se dá principalmente pela picada das moscas do gênero *Glossina* spp. (tsé-tsé) (Cuglocivi et al., 2010; Laohasinnarong et al., 2015), e há relatos de transmissão mecânica em regiões que não se encontra a presença da *Glossina* spp. (Giordani et al., 2016).

No continente americano, não há moscas do gênero *Glossina*, a forma de transmissão é mecânica ou não cíclica em outros insetos picadores e sugadores sendo *Tabanus nebulosus*, *Tabanus importunus* e *Cryptotylus unicolor*, principalmente em regiões inundáveis do pantanal brasileiro e boliviano, Colômbia e Guiana Francesa (Madruga, 2004; Osório et al., 2008). Localidades não inundáveis, *Stomoxys calcitrans* tem papel fundamental na transmissão do parasita nos rebanhos bovinos, devido ao aumento de sua população na estação chuvosa ou pela utilização de resíduos de usinas de álcool e açúcar nos canaviais que estão em torno das propriedades, em conjunto com temperaturas ambientes acima de 20°C (Batista et al., 2007; Cadioli et al., 2012; Cuglovici et al., 2010). Outra espécie *Haematobia irritans*, possui grande importância na transmissão de *T. vivax*, visto que o parasita já foi detectado na probóscide e tórax-abdômen da mosca (Salas et al., 2017).

No decorrer da infecção causada por *T. vivax*, observam-se flutuações da parasitemia, ocorrendo até mesmo intervalos aparasitêmicos (Moraes, 2001;

Almeida et al., 2010; Fidelis Junior et al., 2016). Recentemente Machado et al. (2021) apresentaram em seu estudo com caprinos experimentalmente infectados por *T. vivax*, o achado de lesões em muitos tecidos inclusive tecido adiposo e pele, podendo justificar as fases de baixa parasitemia ou aparasitemia. Devido aos sinais clínicos inespecíficos e períodos de baixa parasitemia ou aparasitêmicos, realizar o diagnóstico do parasita é desafiador, podendo este ser realizado por métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (Fidelis Junior et al., 2016).

Os métodos parasitológicos utilizados são a técnica 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), demonstrando baixa sensibilidade em hospedeiros na fase crônica da infecção, devido a baixa parasitemia (Rebeski et al., 1999; Waal, 2012; Haji et al., 2015, Fidelis Junior et al., 2016). Nas fases de baixa parasitemia ou aparasitemia, o diagnóstico baseado na resposta imunológica humoral, como ELISA, se torna uma ferramenta de extrema importância, por apresentar maior sensibilidade, tornando-se a principal forma para a realização de “screening” de rebanhos suspeitos tanto no continente americano (Osório et al., 2008), quanto africano (Dagnachew e Bezie, 2015). Os métodos sorológicos indiretos indicam o contato do hospedeiro com o parasita, impossibilitando identificar se a doença está ativa ou não (Nantulya, 1990). A persistência de anticorpos contra *T. vivax* no hospedeiro pode ocorrer ou não por longos períodos após o tratamento, e esta detecção pode variar de acordo com a natureza do antígeno utilizado nos ensaios, apresentando permanência por trinta a cem dias (Bengaly et al., 2001; Pillay et al., 2013). Um fator a ser considerado sobre métodos de diagnóstico imunológicos indiretos são que esses métodos tendem a não detectar animais soropositivos no início da infecção (Sampaio, 2017). Deste modo o presente estudo teve como objetivo avaliar resultados de Elisa teste de amostras de soros bovinos de propriedades com suspeita de infecção natural e assim buscando o entendimento sobre como o *T. vivax* vem se disseminando pelo país.

relatado em 2017 (Bastos et al., 2017) onde foram introduzidos animais oriundos de outro estado infectados por *T. vivax*. Em nosso estudo, o estado de Goiás enviou amostras de vários municípios, demonstrando que o parasita vem se disseminando rapidamente.

O primeiro relato de surto de *T. vivax* em Minas Gerais foi descrito por

Referências

André MR, Calchi AC, Herrera HM, Zanatto DCS, Horta BCLS, Tasso JB, Ramos IAS, Mello VVC, Machado RZ. The co-infection with *Ehrlichia minasensis*, *Anaplasma marginale* and *Anaplasma platys* is not associated with anemia in beef cattle in the Brazilian Pantanal. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 21 2020; 100437

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

Auty H, Anderson NE, Picozzi K, Lembo T, Mubanga J et al. Trypanosome diversity in wildlife species from the serengeti and luangwa valley ecosystems. *PLoS Negl Trop. Drosophila* 2012; Inf Serv (6): e1828.

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

Batista JS, Freitas CIA, Silva JB, Cavalcante TV, Paiva KAR, Lopes FC, Lira R. Clinical evaluation and reproductive indices of dairy cows naturally infected with *Trypanosoma vivax*. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 38, n. 5, p. 3031-3038, 2017. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n5p3031

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

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

Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG et al. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 1999; (102):249-261. doi:[10.1016/S0166-6851\(99\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00098-5). PubMed: [10498181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10498181/).

Brener Z. *Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas*. [Tese] Belo Horizonte:Universidade Federal de Minas Gerais; 1961.

Cadioli FA, Barnabé PA, Machado RZ, Teixeira MCA, André MR, Sampaio PH, Fidelis Junior OL, Teixeira MMG, Marques LC. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21:118-124.

Castilho Neto KJGA, Garcia ABCF, Fidelis Junior OL, Nagata WB, André MR, Teixeira MMG, et al. Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(1): e020220. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021019>

Coppel RL, Cowman AF, Anders RF, Bianco AE, Saint RB et al. Immune sera recognize on erythrocytes *Plasmodium falciparum* antigen composed of repeated amino acid sequences. *Nature* 1984; (310): 789-792. doi:[10.1038/310789a0](https://doi.org/10.1038/310789a0). PubMed: [6382025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6382025/)

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

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

Dagnachew S, Bezie M. Review on *Trypanosoma vivax*. *ABJAS*, 2015; (7):41-64.

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

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

Desquesnes M, Bengaly Z, Dia ML. Evaluation de la persistance des anticorps détectés par Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* après traitement trypanocide chez des bovins naturellement infectés. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 2003;(56):141–4

Desquesnes M. *Livestock trypanosomes and their vectors in Latin America*. Paris: OIE (World Organisation for animal health), 2004.

Desquesnes M, Gonzatti M, Sazmand A, Thévenon S, Bossard G, Boulangé A, et al. A review on the diagnosis of animal trypanosomoses, *Parasit Vectors* 2022; (15):64 <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1>

Echeverria JT. *Trypanosoma* spp. em bovinos no pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil. [Tese] Campo Grande: Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2021.

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

Garcia HA, Rodrigues AC, Rodrigues CM, Bengaly Z, Minervino AH, Riet-Correa F, et al. Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. *Parasit Vectors* 2014; 7(210): 1-13. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-210>. PMID:24885708

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

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

Goto Y, Carter D, Guderian J, Inoue N, Kawazu S et al. Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania* amastigotes. *Infect Immun* 2010;(78): 2138-2145. doi:[10.1128/ IAI.01102-09](https://doi.org/10.1128/IAI.01102-09). PubMed: [20160013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20160013/).

Gruber A, Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp Parasitol* 1993; (76): 1-12. doi:[10.1006/expr.1993.1001](https://doi.org/10.1006/expr.1993.1001). PubMed: [8467895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8467895/).

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

Hamilton PB. Is *Trypanosoma vivax* genetically diverse? *Trends Parasitol* 2012; (28): 173. doi:[10.1016/j.pt.2012.02.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.02.003). PubMed: [22459431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22459431/).

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

Júnior RBD. *Trypanossoma vivax: aspectos sobre diagnóstico, persistência, transmissão e viabilidade em medicamentos* [Tese] Goiânia : Universidade Federal de Goiás; 2022.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-685. <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>. PMID:5432063

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

Luckins AG. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop Anim Health Prod* 1977; 9:53-62.

Madruga CR. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanossoma (Duttonella) vivax* no Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004; 13:46-47.

Madruga CR, Araujo FR, Cavalcante-Goes G, Martins C, Pfeifer IB, Ribeiro LR, et al. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:801–7. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000700016>

Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos EG, Machado MRF, Valadão IFF, Barci LG, Malheiros EB. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet Parasitol*, 1997; 71 (1): 17-26.

Machado et al. - Relatório Técnico - contrato 1027/2018 - Universidade de Liverpool – Funep

Machado RZ, Neto KJGAC, Gonçalves LR, Machado GF, Luvizotto MCR, Vasconcelos RO, et al. Detection of *Trypanosoma vivax* in tissues of experimentally infected goats: what is the role of adipose tissue in the life cycle of this protozoon?. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(4):e017721.

Moraes MAV. *Trypanosoma vivax: Infecção experimental em bovinos (Bos indicus)*. [Dissertação] Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2001

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

Müller N, Hemphill A, Imboden M, Duvallet G, Dwinger RH et al. Identification and characterization of two repetitive non-variable antigens from African trypanosomes which are recognized early during infection. *Parasitology*, 1992; 104 (1):111-120. doi:[10.1017/S0031182000060856](https://doi.org/10.1017/S0031182000060856). PubMed: [1614728](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1614728/).

Murray M, Murray PK, McIntyre WIM. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; (71):317–318.

Ndao M, Kelly N, Normandin D, Maclean JD, Whiteman A, Kokoskin E, Arevalo I, Ward BJ. *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. *Comp Med* 2000; 50:658-665.

Nantulya VM. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. *Rev Sci Tech* 1990; 9:357-367.

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

Pillay D, Izotte J et al. *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomiasis in Cattle. *PLoS One* 2013; 8:e78565.

Pimentel SP, Ramos CAN, Ramos RAN, Araújo FRB, Faustino MAG, Alves LC. First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. *Vet Parasitol* 2012; 185:286-289 (n2-4)

Pochini LR. *Infecção Experimental em bovinos com Trypanosoma evansi Steel, 1885*. [Dissertação] Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2000

Ramírez-Iglesias JR, Eleizalde MC, Reyna-Bello A, Mendoza M. Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *J Parasit Dis* 2017; 41:450-458.

Rebeski DE, Winger EM, Rogovic B, Robinson MM, Crowther JR, Dwinger RH. Improved methods for the diagnosis of african trypanosomosis. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 1999; 94:249-253.

Rodrigues AC, Campaner M, Takana CSA, A Dell' Porto, Milder RV, Takeda GF, Teixeira MMG. 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. *Vet Parasitol* 2003; 116:185-207.

Sampaio PH. *Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação da efetividade do tratamento contra Trypanosoma vivax em caprinos experimentalmente infectados*. [Tese] Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2017.

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

Smuts CM. *Development of tools to improve the detection of Trypanosoma evansi in Australia* [PhD Tese]. Perth: Murdoch University; 2009.

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

Taylor KA, Authié E. Pathogenesis of African Trypanosomiasis. In: Maudlin I, Holmes PH, Miles MA, editors. *The Trypanosomiasis*. Wallingford: CAB International; 2004. p. 331-353.

Thuy NT, Goto Y, Lun ZR, Kawazu SI, Inoue N. Tandem repeat protein as potential diagnostic antigen for *Trypanosoma evansi* infection. *Parasitol Res*, 2011; 110: 733-739. PubMed: [21927872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21927872/).

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76(9): 4350-4354. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>. PMID:388439

Van den Bossche P, Chigoma D, Shumba W. The decline of anti-trypanosomal antibody levels in cattle after treatment with trypanocidal drugs and in the absence of tsetse challenge. *Acta Trop* 2000;77:263–70. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00138-8)

Waal T. Advances in diagnosis of protozoan diseases. *Vet Parasitol* 2012; 189:65-74.

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

Yadav SC, Kumar R, Manuja A, Goyal L, Gupta AK. Early detection of *Trypanosoma evansi* infection and monitoring of antibody levels by ELISA following treatment. *J Parasit Dis* 2014;38:124–7. <https://doi.org/10.1007/s12639-012-0204-2>

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