

# Diagnóstico molecular de *Trypanosoma vivax* em amostras de sangue total bovinas enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Vassouras

Molecular diagnosis of *Trypanosoma vivax* in bovine whole blood samples sent to the Molecular Biology Laboratory of the University of Vassouras

Luiz Carlos Moutinho Gonçalves<sup>1</sup>, Natália Elida Gama Nascimento<sup>1</sup>, Thiago Dutra Dias<sup>2</sup>, Erica Cristina Rocha Roier<sup>3</sup>, Renata Fernandes Ferreira de Moraes<sup>3</sup>, Ana Paula Martinez de Abreu<sup>3</sup>

Como citar esse artigo. Gonçalves LCM; Nascimento NEG; Dias TD; Roier ECR; Moraes RFF; Abreu APM. Diagnóstico molecular de *Trypanosoma vivax* em amostras de sangue total bovinas enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Vassouras. Rev Fluminense de Extensão Universitária. 2023;13(2):28-32.



## Resumo

Os tripanosomas são seres unicelulares e flagelados, se subdividem em salivária e estercorária. O *Trypanosoma vivax* pertence a seção salivária, têm larga distribuição e importância econômica na África, principalmente em áreas ocupadas pelo seu vetor biológico, a mosca tsé-tsé. A transmissão também pode ser iatrogênica com agulhas contaminadas. Insetos hematófagos como tabanídeos e *Stomoxys* spp. permitiram a expansão de *T. vivax* na América Latina. No pantanal da região de Poconé, estado de Mato Grosso um surto se caracterizou por manifestações de febre, anemia profunda, lacrimejamento, queratite, edema, perda de peso, óbito, podendo ainda ocorrer, diarreia, aborto, nascimento de bezerros fracos com morte perinatal. A doença causa grandes perdas econômicas, com a redução na produção leiteira, queda no desempenho produtivo, associada ao amplo espectro de vetores e hospedeiros suscetíveis, e à imunodeficiência dos animais, em sua maioria subnutrida, além de gastos com tratamento e honorários veterinários e mortes de animais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência de *Trypanosoma vivax* em amostras de sangue total de bovinos nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais por diagnóstico molecular no Laboratório de Biologia Molecular do Mestrado Profissional em Diagnóstico em Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras.

**Palavras-chave:** Bovino; PCR; *T. vivax*.

## Abstract

Trypanosomes are unicellular and flagellated beings, subdivided into salivary and stercoraria. *Trypanosoma vivax* belongs to the salivary section, has wide distribution and economic importance in Africa, mainly in areas occupied by its biological vector, the tsetse fly. Transmission can also be iatrogenic with contaminated needles. Hematophagous insects such as tabanids and *Stomoxys* spp. allowed the expansion of *T. vivax* in Latin America. In the swampland of the Poconé region, state of Mato Grosso, the outbreak was characterized by manifestations of fever, profound anemia, tearing, keratitis, edema, weight loss, death, and diarrhea, abortion, birth of weak calves with perinatal death. The disease causes great economic losses, with a reduction in milk production, a drop in productive performance, associated with the wide spectrum of susceptible vectors and hosts, and the immunodeficiency of animals, most of whom are undernourished, in addition to expenses with treatment and veterinary fees and deaths. of animals. Aiming to evaluate the frequency of *Trypanosoma vivax* in whole blood samples from cattle in the states of Rio de Janeiro and Minas Gerais by molecular diagnosis at the Molecular Biology Laboratory of the Professional Master's Degree in Diagnosis in Veterinary Medicine at the University of Vassouras.

**Keywords:** Bovine; PCR; *T. vivax*.

## Introdução

Protozoários do gênero *Trypanosoma* são seres unicelulares e flagelados que pertencem ao Reino Protista, Filo Euglenozoa, Subfilo Sarcomastigophora, Superclasse Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Trypanosoma*, o qual se subdivide em seção Salivária (transmissão inoculativa) e Stercorária

(transmissão contaminativa)<sup>1</sup>.

*Trypanosoma vivax* pertence à seção Salivária. Tem larga distribuição e importância econômica na África, principalmente em áreas ocupadas pelo seu vetor biológico, a mosca tsé-tsé. A transmissão também pode ser iatrogênica com agulhas contaminadas durante a aplicação de medicamentos ou vacinações<sup>2</sup>. Além disso, adaptação à transmissão mecânica por insetos hematófagos (tabanídeos e *Stomoxys*spp.), permitiu a expansão de *T. vivax* para América Central, América do

Afiliação dos autores:

<sup>1</sup>Discentes do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras, Vassouras – RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Doutorando pelo programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Seropédica – RJ;

<sup>3</sup>Docentes do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras, Vassouras - RJ, Brasil. 3 Docentes do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras, Vassouras - RJ, Brasil.

\* Email de correspondência: luizinho.moutinho@gmail.com

Recebido em: 17/10/2023. Aceito em: 12/12/2023.

Sul e Caribe<sup>3</sup>.

A ocorrência *T. vivax* no Brasil foi registrada pela primeira vez em búfalos no Estado do Pará, no ano de 1972. No pantanal da região de Poconé, estado de Mato Grosso o surto se caracterizou por manifestações de febre, anemia profunda, lacrimejamento, queratite, edema, perda de peso, óbito, diarreia, aborto, nascimento de bezerras fracas com morte perinatal<sup>4</sup>. No Rio de Janeiro foi detectado a primeira vez por Costa<sup>5</sup> e em Minas Gerais por Carvalho<sup>6</sup>.

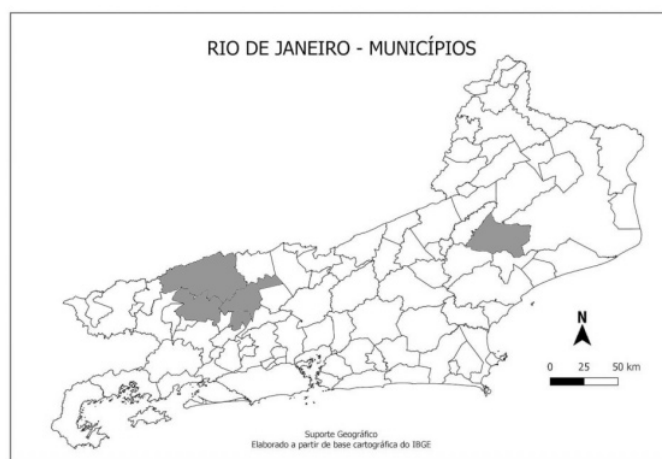
Nos últimos anos tem-se observado registros de surtos da enfermidade ocasionada por *T. vivax* em diversos estados do Brasil, ocasionando mortes de animais e graves perdas econômicas<sup>6</sup>, como a redução na produção leiteira, queda no desempenho produtivo, associada ao amplo espectro de vetores e hospedeiros susceptíveis e à imunodeficiência dos animais, em sua maioria subnutrida, além de gastos com tratamento e honorários veterinários e mortes de animais<sup>7-8</sup>.

Este trabalho tem como objetivo consistir em

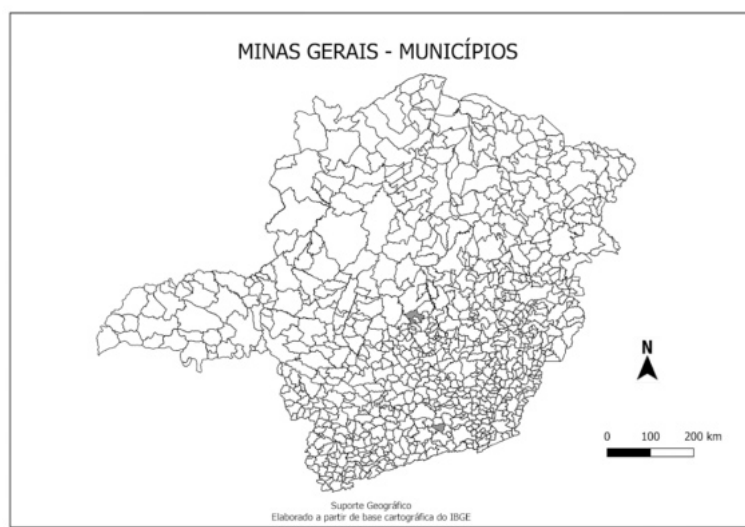
avaliar a frequência de *Trypanosoma vivax* em amostras de sangue total procedente de bovinos dos municípios de Barra do Piraí, Vassouras, Morro Azul – Engenheiro Paulo de Frontin, Valença, Santa Maria Madalena, Paraopeba – MG e Santa Rita do Ibitipoca – MG por PCR convencional no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Vassouras.

## Material e métodos

Para este estudo, 100 amostras de sangue de bovinos foram enviadas de 5 municípios do estado do Rio de Janeiro e 2 municípios do estado de Minas Gerais, onde ocorreram casos suspeitos de *T. vivax*: sendo 3 em Barra do Piraí (22°28'14"S e 43°49'36"L), 54 em Vassouras (22°24'16"S e 43°39'48"O), 4 em Morro Azul – Engenheiro Paulo de Frontin (22°28'45"S e 43°35'2"O), 5 em Valença (22°14'46"S e 43°42'11"L), 14 em Santa Maria Madalena (21°57'19"S e 42°00'29"O) (Figura 1), 5 em Paraopeba - MG (19°16'41"S 44°23'56"O) e 15 em Santa Rita do Ibitipoca - MG (21°35'27"S



**Figura 1.** Mapa do estado do Rio de Janeiro com origens geográficas de casos de *Trypanosoma vivax* (Fonte: <https://www.gestaoeducacional.com.br/mapa-do-rio-de-janeiro-tipos-de-mapa-e-curiosidades/>).



**Figura 2.** Mapa do estado de Minas Gerais com origens geográficas de casos de *Trypanosoma vivax* (Fonte: <https://www.gestaoeducacional.com.br/mapa-de-minas-gerais-tipos-de-mapa/>).

43°57'10"O) (Figura 2) para o laboratório de biologia molecular da Universidade de Vassouras.

As coletas não foram categorizadas por idade, sexo ou raça, portanto, trata-se apenas de amostras de sangue total de bovinos, com as quais foram realizados os diagnósticos, sem informações adicionais da epidemiologia.

No período de outubro de 2021 a setembro de 2022, amostras de sangue total foram coletadas em tubos com anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) 10% e enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Mestrado Profissional em Diagnóstico em Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras, de animais sadios ou sem histórico clínico de doença

As amostras de sangue foram alíquotadas em microtubos de polipropileno de 1,5 ml, identificadas por numeração sequencial e mantidas a -20°C até o momento da extração do DNA total.

O DNA genômico foi extraído a partir de 300 µL de cada amostra sanguínea de bovino usando kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, e eluído em 100 µL da solução de reidratação que acompanha o kit, sendo acondicionada em microtubos de 0,6mL em três alíquotas e mantida à -20°C.

As amostras de DNA bovino foram submetidas à amplificação por PCR padrão do gene *CatL-Like* (*CatepsinaL-Like*) no termociclador T100 ThermalCycler (BioRad®, Hercules, CA, USA) com condições de termociclagem de: 95 °C durante 3 min seguido por 40 ciclos de 94 °C durante 1 min, 56°C durante 1 min e 72 °C durante 1 min, e extensão final 72 °C por 10 min<sup>1</sup>.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% a 100 V por 40 min, corados com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) e fotografados no transiluminador Gel Doc EZ Imagem (BioRad®, Hercules, CA, USA) (Tabela 1).

Os resultados foram obtidos do banco de dados do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Vassouras, onde foi realizada a frequência de positividade através de porcentagem e relação direta com o total amostrado. No qual os resultados serão melhor apresentados no tópico seguinte.

## Resultados

O laboratório de biologia Molecular do Mestrado Profissional em Diagnóstico em Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras é o único na mesorregião Sul Fluminense- RJ, realizando pesquisa e diagnóstico molecular sem fundos do Estado, apenas como iniciativa privada e tem apenas um ano de funcionamento.

As amostras de sangue total testadas tiveram origem de bovinos na grande maioria sem histórico prévio, alguns doentes e outros sadios, que foram encaminhados para o laboratório. Vale ressaltar que hoje a biologia molecular é de grande importância na medicina veterinária, pois tem sido aplicada no diagnóstico de doenças parasitárias e infecciosas, tecnologia de vacinas e proteínas recombinantes, terapia gênica, filogenia de patógenos resistentes a doenças e genotipagem de diversos agentes<sup>9</sup>.

Foram recebidas 100 amostras de sangue total de bovinos, em um ano de funcionamento, sendo que destas 80 tem origem do estado do Rio de Janeiro (Vassouras,

**Tabela 1.** Lista de primer usado no PCR

Organismo	Marcador DNA	Primer	Sequência de Oligo nucleotídeo (5' -3')	Tamanho do amplicom (bp)	Temperatura de anelamento
<i>T. vivax</i>	CatL-Like	DTO 154	ACAGAATTCCAGGGCCAATGCGGCTCGTGCTGG	500pb	56 °C
		DTO 155	TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA		

Fonte: (17)

Barra do Pirai, Valença, Engenheiro Paulo de Frontin e Santa Maria Madalena) e 20, são de Minas Gerais (Santa Rita do Ibitipoca e Paraopeba) (Gráfico1)

A frequência de *T. vivax* encontrada na PCR convencional para o gene CatL foi de 14,5% de bovinos positivos (n = 16/100). Destes animais, 56,25% (n = 9/16) pertenciam ao município de Vassouras-RJ, 6,25% (n = 1/16) pertenciam a Barra do Pirai-RJ e 37,5% (n = 6/16) pertenciam a Santa Rita do Ibitipoca - MG (Tabela 2).

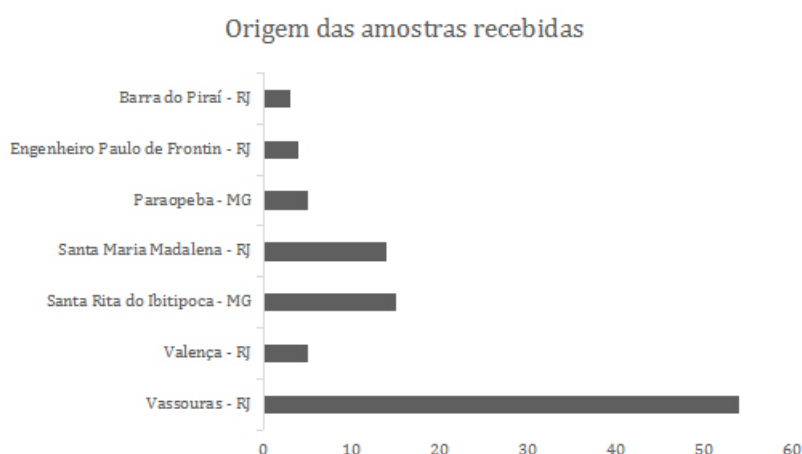
Apesar de no Brasil o *T. vivax* ter sido descrito a primeira vez por Floch e Lajudie (1944), apenas recentemente, a presença deste protozoário foi descrita pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro em 2018<sup>5</sup> em surto em bovinos da raça Holandesa. Logo, apenas 6 anos se passaram até o presente estudo, considerando assim muito recente a introdução deste agente no estado

do Rio de Janeiro, havendo ainda muita subnotificação ou confusão no diagnóstico deste parasito. Além disso, muitos proprietários preferem realizar o tratamento assim que ocorre a suspeita de infecção. Isso se deve ao fato dos dois medicamentos mais comuns no Brasil (aceturato de diminazeno e cloreto de isometamídio) serem de fácil acesso, porém, se não seguir o protocolo corretamente, podem tornar os animais portadores clínicos assintomáticos, sendo capazes de espalhar e perpetuar a doença para o resto do rebanho<sup>10</sup>.

## Discussão

Em 2016, Costa et al. identificaram pela primeira vez a presença de *T. vivax* no estado do Rio de Janeiro em surto em bovinos da raça Holandesa, nos municípios

**Gráfico 1.** Origem das amostras recebidas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Vassouras - RJ



**Tabela 2.** Frequência de *Trypanosoma vivax* através de PCR convencional com o geneCatL (n=100).

Municípios	N Negativo (%)	N Positivo (%)	Total
Vassouras	45 (53,57%)	9 (56,25%)	54
Barra do Pirai	2 (2,38%)	1 (6,25%)	3
Valença	5 (5,95%)	0	5
Engenheiro Paulo de Frontin	4 (4,76%)	0	4
Santa Maria Madalena	14 (16,67%)	0	14
Santa Rita do Ibitipoca - MG	9 (10,71%)	6 (37,5%)	15
Paraopeba - MG	5 (5,95%)	0	5
<b>TOTAL</b>	<b>84</b>	<b>16</b>	<b>100</b>

de Pirai, Vassouras e Areal, o que ocasionou prejuízos econômicos nas fazendas devido a perda na produção leiteira e óbito de alguns animais<sup>5</sup>. Nestas áreas, a transmissão foi relacionada principalmente à via mecânica de disseminação do agente através de agulhas utilizadas para aplicação de ocitocina e vacinação. Logo depois, foi relatado a ocorrência de positividade para *T. vivax* no estado do Rio de Janeiro em 2020, pela técnica de esfregaço sanguíneo foi de 4,4% de bovinos positivos (n = 17/389), enquanto na PCR foi de 12,8% (50/384)<sup>1</sup>. Dos municípios em que houve animais diagnosticados para *T. vivax* podemos citar: Areal, Cantagalo, Paraíba do Sul, Pirai, Rio Claro, Santo Antônio de Pádua e Trajano de Moraes. Portanto, este estudo é o primeiro a diagnosticar a doença de *Trypanosoma vivax* em animais, no município de Barra do Pirai.

Em estudo que utilizou métodos moleculares, observou que o ensaio de PCR convencional possuía uma capacidade de detecção de DNA de *T. vivax* idêntica à do ensaio de qPCR, e ambas as técnicas foram superiores comparadas a técnica de centrifugação do hematócrito (capa leucocitária), que é o melhor método parasitológico, devido a visualização da forma tripomastigota de *T. vivax* em esfregaços de sangue<sup>11</sup>. Outra técnica muito utilizada é o ELISA, uma das vantagens em estudos sorológicos na América do Sul é a ausência de espécies de tripanossoma que induzam resposta imune que gere fortes reações cruzadas com os antígenos crus de *T. vivax*, fato este que ocorre na África com *T. congolense*<sup>12</sup>.

No presente trabalho observamos que apesar de 5 municípios terem enviado amostras suspeitas, apenas dois tiveram animais confirmados positivos por PCR convencional no estado do Rio de Janeiro. A PCR é uma técnica tão sensível e específica, que auxilia no diagnóstico mesmo tendo sido feito o tratamento precoce antes da coleta de sangue, sendo possível diagnosticar com 3 a 4 dias pós administração do cloreto de isometamídio, droga mais frequentemente administrada<sup>13</sup>.

Neste estudo, nos dois municípios de Minas Gerais, um deles apresentou amostras positivas (Santa Rita do Ibitipoca), não tendo sido relatada antes a ocorrência da doença em animais na literatura. Sabe-se que este protozoário começou a ser relatado em Minas Gerais em 2007 no município de Igarapé<sup>7</sup>. Desde então, uma equipe da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG) tem diagnosticado rotineiramente quadros agudos da doença, com redução acentuada na produção de leite, ocorrência de vários abortos, animais com sinais nervosos, além de alta mortalidade em diversas regiões do estado<sup>14</sup>.

Novos surtos surgem periodicamente em Minas Gerais como em uma propriedade do município de Veríssimo, localizada na microrregião de Uberaba-MG em 2012<sup>15</sup>. Existe a hipótese de que em uma fazenda na

cidade de Ipameri – GO ocorreram surtos logo após a introdução de novos animais vindos de Minas Gerais, já que todos esses municípios goianos estão muito próximos da divisa desse estado com Minas Gerais, e os municípios do outro lado da fronteira, em Minas Gerais, já possuem diagnósticos confirmados desse protozoário<sup>16</sup>.

## Considerações finais

Através deste estudo pudemos determinar que a infecção ainda ocorre em Vassouras e Minas Gerais, sendo a primeira vez relatado em Barra do Pirai – RJ e Santa Rita do Ibitipoca – MG. O diagnóstico molecular de *Trypanosoma vivax* é de extrema sensibilidade e especificidade, sendo fundamental para as regiões endêmicas como Rio de Janeiro e Minas Gerais como ferramenta diagnóstica ao médico veterinário.

## Referências

1. Abreu APM de. Caracterização molecular e avaliação bioquímica de *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma theileri* no estado do Rio de Janeiro baseado nos genes 18S rDNA e Cathepsina L-like. 2020; 113.
2. Souza AL de, Alves AL, Rocha AR, Borges AVF, Reis KB dos, Souza e Silva LC de, et al. Tripanossomose bovina em um rebanho leiteiro no município de Monte Carmelo, Minas Gerais: relato de caso. Pubvet. 2019; 13(10):1-5.
3. Batista JS, Bezerra FSB, Lira RA, Carvalho JRG, Rosado Neto AM, Petri AA, et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. Pesq Vet Bras. 2008; 28(1):63-9.
4. Madruga CR. EPIDEMIOLOGIA DO *Trypanosoma vivax* NO BRASIL. Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science. 2009; 10.
5. Costa RVC. *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Rio de Janeiro. TEDE. 2018; 83.
6. Pereira HD, Simões SVD, Souza FAL, Silveira JAG, Ribeiro MFB, Cadioli FA, et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. Pesq Vet Bras. 2018; 38(5):896-901.
7. Carvalho AU, Abrão DC, Facury Filho EJ, Paes PRO, Ribeiro MFB. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008; 60(3):769-71.
8. Germano PHV, Silva AA, Edler GEC, Lopes MC, Modesto TC, Reis JA dos. Tripanossomose bovina: Revisão. Pubvet. 2018; 12(8):1-6.
9. Alves LC, Kaplan RM, Faustino MAG. Molecular biology in Veterinary Medicine: concepts and application. 2007; 1(1):74-80.
10. Betancur Hurtado OJ, Jimenez Castro PD, Giraldo-Ríos C. Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. Veterinary parasitology. 2016; (229):54-9.
11. Fidelis Junior OL, Sampaio PH, Gonçalves LR, André MR, Machado RZ, Wijffels G, et al. Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. Rev Bras Parasitol Vet. 2019; 28(2):203-9.
12. Madruga CR, Araújo 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(7):801-7.
13. Sampaio PH, Fidelis Junior OL, Marques LC, Machado RZ, Barnabé

P, André MR, et al. Acute-phase protein behavior in dairy cattle herd naturally infected with *Trypanosoma vivax*. *Veterinary parasitology*. 2015; 211(3–4):141–5.

14. Meneses RM. TRIPANOSSOMOSE BOVINA EM MINAS GERAIS, 2011: SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO. 2016; 62.

15. Frange RCDC. Tripanossomíase em vacas da microrregião de Uberaba – MG: estudo soroepidemiológico e relato de surto. 2013; 76.

16. Bastos TSA, Faria AM, Madrid DM de C, Bessa LC de, Linhares GFC, Fidelis Junior OL, et al. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2017; 26(3):366–71.

17. Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia HA, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, et al. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America--characterization, relationships and diagnostic implications. *PubMed*. 2009; 23(1):44–51.