

INVESTIGAÇÃO DE *Trypanosoma vivax* EM VACAS LEITEIRAS COM HISTÓRICO CLÍNICO DE TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA NA REGIÃO NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, NO SUL DO BRASIL

MELÂNIA LAZZARI RIGO¹; YAN WAHAST ISLABÃO²; MARJORIE DE GIACOMETI³; KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS⁴; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁵; CAMILA BELMONTE OLIVEIRA⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – melania.rigo@bento.ifrs.edu.br

² Universidade Federal de Pelotas – yanwahast06@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – marjorie.giacometi@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br

⁶ Universidade Federal de Pelotas – camilabelmontevet@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A tripanossomose bovina, originária da África, apresenta distribuição mundial e importância econômica. O *Trypanosoma vivax* é o agente mais patogênico e importante para as espécies bovinas (GARDINER, 1989). No Brasil, o *T. vivax* foi identificado pela primeira vez em bovinos no Pará em 1946 (SHAW; LAISON, 1972); no entanto, a maioria dos surtos foi relatado recentemente (BARBIERI *et al.*, 2016; BASTOS *et al.*, 2017), causando grandes perdas econômicas devido à queda na produção, desempenho reprodutivo, tratamento, custos veterinários e morte dos animais em casos graves (LOPES *et al.*, 2018).

No Brasil, a transmissão ocorre mecanicamente através da picada de dípteros hematófagos, como tabanídeos, moscas-dos-estáboulos (*Stomoxyx calcitrans*) e moscas-do-chifre (*Haemotobia irritans*), na forma iatrogênica, através do uso de agulhas contaminadas e contato com animais positivos (BASTOS *et al.*, 2020). Os principais sinais clínicos observados em animais naturalmente infectados são: febre, anemia, letargia, diminuição da produtividade, aborto espontâneo, sinais nervosos e, em casos graves, podendo levar à morte (PEREIRA *et al.*, 2018). Estes sinais clínicos são semelhantes aos observados na Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (BATISTA *et al.*, 2008). No Rio Grande do Sul, há um relato da ocorrência de *T. vivax* em bovinos (SILVA *et al.*, 2009). Portanto, mais informações sobre a prevalência e distribuição desta doença no estado são necessárias para desenvolver estratégias adequadas de tratamento e controle, para a redução de perdas econômicas na bovinocultura. Este estudo, teve como objetivo investigar a presença de *T. vivax* em vacas leiteiras com histórico clínico de TPB na região norte do estado do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

O estudo foi conduzido nas mesorregiões noroeste e nordeste do estado do Rio Grande do Sul de outubro de 2020 a janeiro de 2022 em 35 fazendas leiteiras em 19 municípios da região norte do Rio Grande do Sul.

As amostras de sangue foram coletadas de bovinos leiteiros apresentavam sinais clínicos de TPB, recorrência da doença e/ou problemas reprodutivos, totalizando 155 amostras. Para as análises 3 mL de sangue foram coletados com anticoagulante de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 20%, e 7 mL de sangue foram coletados com gel ativador de coagulação para obtenção de soro, através de punção da veia jugular ou caudal. As amostras foram armazenadas a -20 °C para análise molecular e sorológica.

Das 155 amostras o diagnóstico molecular foi realizado em 143 amostras usando a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). O DNA foi extraído e analisado quanto à quantidade e pureza, determinadas por análise espectrofotométrica (relação 260/280 nm) com NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, EUA), sendo 12 amostras excluídas devido à baixa pureza. O DNA foi diluído e congelado para o diagnóstico molecular.

A qPCR foi realizada utilizando o primer específico para o agente, o DNA de vacas experimentalmente infectadas foi usado como controle positivo para *T. vivax* (BASTOS *et al.*, 2020) e como controle negativo foi utilizada água ultrapura. A análise foi realizada usando o CFX Opus 96 (Bio-Rad, BR) em duas etapas (desnaturação e anelamento/extensão), com ciclos específicos para o agente. A curva de fusão foi analisada para determinar a especificidade das reações. As porcentagens de amostras positivas e negativas foram calculadas.

O diagnóstico sorológico foi realizado em 155 amostras usando a técnica de IFA (ensaio de fluorescência indireta) com o anticorpo anti-IgG bovino (Sigma-Aldrich Brasil Ltd.). A leitura foi realizada usando um microscópio de epifluorescência, e a porcentagem de amostras soropositivas foi calculada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DNA de *T. vivax* não foi detectado em nenhuma amostra, a técnica de RIFI revelou que 22,58% (35/155) das amostras foram soropositivas para IgGs anti-*T. vivax*, incluindo animais reativos de ambas as mesorregiões. O protozoário é comumente diagnosticado em gado leiteiro no Brasil (BATISTA *et al.*, 2008; GUERRA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2018). No entanto, pouco se sabe sobre a ocorrência deste parasito no Rio Grande do Sul. *T. vivax* foi previamente identificado através de esfregaços sanguíneos em um caso suspeito de gado na região central do estado, e confirmado na análise molecular (SILVA *et al.*, 2009). Neste estudo, pela primeira vez, a presença de anticorpos anti-*T. vivax* foi detectado em gado leiteiro da região norte do Rio Grande do Sul, este resultado sugere que os animais analisados foram expostos ao agente.

O exame sorológico de RIFI confirmou a infecção por *T. vivax* no rebanho analisado na região norte do Rio Grande do Sul, Brasil. Em estudos sorológicos realizados em outros estados brasileiros foi observado uma variação na prevalência. Um estudo realizado no município de Timon, no estado do Maranhão, relatou que 82,51% dos animais eram soropositivos para *T. vivax* usando a técnica de RIFI (PEREIRA *et al.*, 2018), mostrando uma porcentagem maior do que a encontrada no presente estudo. Além disso, BARBIERI *et al.* (2016) relataram 49,6% de soropositividade para o agente usando a mesma técnica de diagnóstico para propriedades leiteiras na região sul de Minas Gerais. Em outro estudo no estado de Pernambuco, a porcentagem de animais reativos para IgGs anti-*T. vivax* foi de 13,93% (GUERRA *et al.*, 2013), que é menor do que a observada no presente estudo. Essas variações podem ser devido a diferenças no manejo, tratamentos antiparasitários utilizados, ocorrência de vetores e forma de transmissão em cada região devido à diversidade climática (SALAS *et al.*, 2017).

BASSI *et al.* (2018) conduziram um estudo usando animais experimentalmente infectados e relataram o pico de parasitemia no 18º dia pós-infecção, e mesmo após o tratamento com diminazeno aceturato e redução da parasitemia, IgGs anti-*T. vivax* foram detectadas nos animais. Este fato poderia explicar a ocorrência de animais soropositivos no presente estudo, mesmo naqueles que não apresentavam sinais clínicos característicos, pois a coleta de sangue foi realizada em animais com sinais clínicos de TPB que haviam recebido tratamento antes da coleta de amostras.

Embora técnicas moleculares, como a PCR, sejam consideradas mais sensíveis, mesmo em casos de baixa parasitemia (PEREIRA *et al.*, 2018), *T. vivax* não foi detectado usando este método nas amostras avaliadas. Estudos demonstram a ocorrência de flutuações na parasitemia com fases aparasitemicas na fase crônica da doença, e pode haver falhas no diagnóstico molecular, amostras conhecidas por serem positivas testaram negativo usando técnicas moleculares durante a fase crônica da doença (CADIOLI *et al.*, 2015; FIDELIS JR. *et al.*, 2019). Como este foi um estudo *in vivo*, a curva de parasitemia dos animais estudados é desconhecida. Estes, poderiam estar na fase crônica da doença, dificultando o diagnóstico molecular. Além disso, dos 155 animais analisados, 121 não apresentaram sinais clínicos no momento da coleta das amostras, e o histórico clínico da recorrência do quadro clínico da TPB também pode ser indicativo de casos crônicos. GONZALES *et al.*, 2003 observaram discordância em estudo para diagnosticar tripanossomose bovina, os resultados obtidos usando técnicas parasitológicas, moleculares (PCR) e sorológicas, indicando a importância de realizar mais de uma técnica de diagnóstico.

Na América do Sul, a principal forma de disseminação de *T. vivax* é por vetores mecânicos, embora o uso de agulhas contaminadas e animais infectados também tenha sido relatada (BASTOS *et al.*, 2020). Considerando que em todas as propriedades estudadas foi observada a presença de vetores, principalmente *Stomoxys calcitrans*, este pode ser o principal fator para a disseminação desse parasito na região Norte do Rio Grande do Sul. Além disso, 75,48% dos animais estudados nasceram na propriedade e apenas 24,52% foram adquiridos de outros locais, reduzindo a probabilidade para a introdução de animais infectados nas propriedades. Houve relatos de reutilização de agulhas para aplicar medicamentos em algumas propriedades, BASTOS *et al.* (2020) descreveram que a compra de animais positivos e o uso compartilhado de agulhas infectadas como as causas mais prováveis para a disseminação do agente na região central do Brasil.

A queda acentuada e repentina na produção de leite no momento do aparecimento dos sinais clínicos foi muito enfatizada pelos produtores durante a realização deste estudo. Em Minas Gerais, CARVALHO *et al.* (2008) relataram uma redução de 27% na produção de leite e uma diminuição de 45% nas taxas de prenhez durante um surto da doença. Além disso, uma queda acentuada na produção de leite foi observada em vacas infectadas com *T. vivax* em São José, Paraíba, de 15 litros diários para 2 litros, em média (BATISTA *et al.*, 2008). Os dados supracitados corroboram com este estudo, pois 47% dos animais apresentavam problemas reprodutivos, como retorno ao estro e aborto, além de queda na produção de leite. Outros estudos sobre surtos de tripanossomose bovina no Brasil também relataram dados semelhantes (VIEIRA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018). Além disso, aborto, retorno ao estro, retenção de placenta e mortalidade perinatal podem ser graves, especialmente quando a doença ocorre durante o terceiro trimestre de gestação (HURTADO *et al.*, 2016).

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, não identificamos a presença de DNA de *T. vivax* em nenhuma amostra. Na análise sorológica pela técnica de RIFI detectou amostras positivas para IgGs anti-*T. vivax*, incluindo animais reativos de ambas as mesorregiões em rebanhos de gado leiteiro da região norte do Rio Grande do Sul através do diagnóstico. Nossos achados sugerem que este protozoário está se disseminando na região sul do Brasil.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBIERI, J. M., et al. Soroprevalência de *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em bovinos leiteiros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 564-573, 2016.
- BASSI, P. B., et al. Avaliação parasitológica e imunológica de bovinos infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Parasitologia experimental**, v. 185, p. 98-106, 2018.
- BASTOS, T. S. A., et al. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 366-371, 2017.
- BASTOS, T. S. A., et al. Comparison of therapeutic efficacy of different drugs Against *Trypanosoma vivax* on experimentally infected cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.181, ago. 2020.
- BATISTA, J. S., et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.1, p.63-69, jan. 2008.
- CADIOLI, F. A., et al. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. **Veterinary Parasitology**, v. 214, p.174-177, nov. 2015.
- CARVALHO, A. U., et al. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.769-771, 2008.
- FIDELIS JUNIOR, O. L., et al. Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v.28, n.2, p.1-7, 2019.
- GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, v.28, p.229-317, 1989.
- GONZALES, J. L., et al. Avaliação de um ensaio de reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico da tripanossomíase bovina e vigilância epidemiológica na Bolívia. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 2, p. 1-14, 2003.
- GUERRA, N. R., et al. Detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de Imunofluorescência indireta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1423-1426, 2013.
- HURTADO, O. J. B; CASTRO, P. D. G. & RÍOS, C. G. Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. **Veterinary Parasitology**, v.229, p.54-59, 2016.
- LOPES, S. T. P., et al. *Trypanosoma vivax* em bovinos leiteiros. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.46, sup 1, p.287, 2018.
- PEREIRA, H. D., et al. Aspectos clínicos epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n.5, p.896-901, mai. 2018.
- SALAS, R. Z., et al. Tripanosomiasis bovina en ganadería lechera de trópico alto: primer informe de Haematobia irritans como principal vector de *T. vivax* y *T. evansi* en Colombia. **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 33, p. 21-34, 2017.
- SHAW, J. J; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 66, n. 1, p. 25-32, 1972.
- SILVA, A. S., et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2550-2554, nov. 2009.
- VIEIRA, O. L. E., et al. Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. **Brasilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.26, n.4, p.516-520, 2017.