

Diagnóstico molecular de *Trypanossoma vivax* em carcaça de bovinos oriundos de frigorífico no município de Barra Mansa - RJ

Molecular diagnosis of *Trypanossoma vivax* in carcass of cattle from a slaughterhouse in the municipality of Barra Mansa - RJ

Natália Élica Gama Nascimento¹; Gabriel Loura Ramalho¹; Thiago Dutra Dias²; Erica Cristina Rocha Roier³; Fabio Sartori³, Ana Paula Martinez de Abreu³

Como citar esse artigo. Nascimento NEG, Ramalho GL, Dias TD, Roier ECR, Sartori F, Abreu APM. Diagnóstico molecular de *Trypanossoma vivax* em carcaça de bovinos oriundos de frigorífico no município de Barra Mansa - RJ. Rev Fluminense de Extensão Universitária. 2025;15(1);01-05.

Resumo

Este estudo teve como objetivo realizar o diagnóstico molecular de *Trypanosoma vivax* através do gene *catl*, a partir de fragmentos de fígado e baço de carcaça de bovinos oriundos de um frigorífico no município de Barra Mansa no estado do Rio de Janeiro. Durante linha de abate foram retirados fragmentos do fígado e baço de 103 bovinos, sendo cada fragmento coletado e acondicionado em tubos de plástico para análise molecular, os quais foram enviados ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Vassouras. Os fragmentos de órgãos permaneceram congelados até o momento da extração do DNA. As amostras de DNA foram extraídas seguindo-se protocolo recomendado pelo fabricante (Promega®) e posteriormente armazenadas em freezer -20°C. A PCR convencional foi realizada através do gene *catl*-like (Cathepsina L-like) para identificação *Trypanosoma vivax*. Os produtos da PCR foram dispostos em gel de agarose à 1,5%, corados com Gel Red diluído na agarose e revelado em transiluminador Gel Doc TM EZ Imager (BIO RAD®). As amostras deste estudo não confirmaram a presença de animais positivos para *Trypanosoma vivax* no momento do abate, no entanto, o número de animais abatidos nestas condições pode estar subestimado. Neste contexto, deve-se haver uma maior investigação dos casos, aprofundamento do conhecimento desta parasitose na proteção sanitária dos alimentos e aprimoramento de uma abordagem de saúde única, que é especialmente importante no caso da tripanossomose.

Palavras-chave: Bovino; PCR; Tripanossomose.



Abstract

This study aim is to perform the molecular diagnosis of *Trypanosoma spp.* using the 18S and *catl* genes, from liver and spleen fragments of cattle from a slaughter in Barra Mansa municipality, state of Rio de Janeiro. During the slaughter line, liver and spleen fragments from 103 cattle were removed, each fragment collected and packed in plastic tubes for molecular analysis and sent to the Molecular Biology Laboratory located in the University of Vassouras. The organ fragments were frozen until DNA extraction occurred. The DNA samples were extracted following the manufacturer's recommended protocol (Promega®), and stored at -20 °C until the molecular analysis occurred. A Conventional PCR was performed using the *catl*-like (Cathepsina L-like) gene for *Trypanosoma vivax* identification. The PCR products were observed in agarose gel at 1.5%, stained with a nucleic acid gel stain (GelRed®) and revealed in Transillon Gel DocTM EZ Imager (BIO RAD®). The samples of this study did not confirm the presence of positive animals for trypanosomiasis at the time of slaughter, the number of animals slaughtered under these conditions may be underestimated. In this context, there should be a greater investigation of the cases, deepen the knowledge of this parasitoids in the sanitary protection of food and improve a One Health approach, which is especially important in the case of trypanosomiasis.

Keywords: Bovine; PCR; Trypanosomiasis.

Afiliação dos autores:

¹Discentes do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras, Vassouras – RJ, Brasil.

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

³Docentes 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.

E-mail de correspondência: nataliaelida142@gmail.com

Recebido em: 14/10/2024. Aceito em: 24/06/2025.

Introdução

Os tripanosomas são seres unicelulares que pertencem ao Reino Protista, Filo Euglenozoa, Subfilo Sarcomastigophora, Superclasse Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Trypanosoma*, o qual se subdivide em duas seções: salivária (transmissão inoculativa) e estecorária (transmissão contaminativa). Os tripanosomas patogênicos da seção Salivária incluem os subgêneros *Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nannomonas* e *Pycnomonas*¹⁻². Como exemplo de tripanosoma apatogênico da seção Stercoraria, destaca-se o subgênero *Megatrypanum*. *Trypanosoma (Duttonella) vivax* é um dos agentes da **Tripanossomiase Animal Africana** (também conhecida como **Nagana**), juntamente com *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma brucei*. Essas espécies causam doenças principalmente em ruminantes de pequeno e grande porte, resultando em significativos prejuízos para a pecuária mundial^{1,3}. A transmissão de *T. vivax*, na África, ocorre através da inoculação de formas infectantes presentes na glândula salivar da mosca Tsé-tsé (*Glossina* sp.), porém nas Américas devido à ausência deste hospedeiro intermediário, é comum a transmissão mecânica através de fômites (agulhas) e dípteros hematófagos, principalmente Tabanídeos e *Stomoxys* sp⁴⁻⁵.

Recentemente, a presença de *T. vivax* já foi observada no estado do Rio de Janeiro em surto em bovinos da raça Holandesa, nos municípios de Piraí, Vassouras e Areal, o que ocasionou prejuízos econômicos nas fazendas devido à perda na produção leiteira e óbito de alguns animais⁶⁻⁷. Nestas áreas, a transmissão foi relacionada principalmente à via mecânica de disseminação do agente através de agulhas utilizadas para aplicação de ocitocina e vacinação. O fígado e baço de camundongos infectados para *T. vivax* foram observados microscopicamente⁸ e notou-se focos discretos, vermelhos pálidos ou às vezes brancos, nitidamente delineados a partir do parênquima adjacente em fígado e baço com esplenomegalia acentuada e focos semelhantes aos do fígado. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma alternativa de diagnóstico direto que tem sensibilidade superior ao exame parasitológico⁹. A análise da sequência de DNA amplificado pela PCR fornece informação para identificação genética, além de permitir que novos tripanosomas sejam organizados dentro de uma árvore filogenética, para que enfim sejam comparados com outras sequências, auxiliando na taxonomia destes parasitos.

Os genes que expressam a steino-protease (*catl*) participam do metabolismo de proteínas da família Trypanosomatidae, hidrolisando ligações peptídicas, e também de funções regulatórias como: a evasão do sistema imune, invasão de células, apoptose, virulência e patogenicidade. No entanto, o papel desta enzima em tripanosomas apatogênicos continua desconhecido¹⁰.

As cepas de *T. vivax* da África Ocidental são mais patogênicas quando comparadas com as do leste Africano, sendo as primeiras mais próximas das cepas observadas na América do Sul¹¹. O gene *catl* foi utilizado anteriormente em estudos para confirmar a relação existente entre amostras oriundas da África Ocidental com sequências da América do Sul, bem como comparar sua patogenicidade¹².

O presente estudo teve como objetivo diagnosticar molecularmente *Trypanosoma vivax* através do gene *catl-like*, em carcaças de bovinos oriundos de um frigorífico no município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro.

Materiais e Métodos

Descrição do Local de Estudo

O presente estudo foi realizado em um frigorífico no município de Barra Mansa, situado na região Centro-Sul Fluminense, que se localiza a uma latitude 22°32'39" sul, longitude 44°10'17" oeste e altitude de 381 metros. Sua população estimada para 1.º de julho de 2019 era de 184 412 habitantes, com uma área de 547,13 km². É uma cidade vizinha dos municípios de Volta Redonda e Pinheiral.

Amostragem

Foram coletadas amostras de fígado e baço de 103 bovinos de ambos os sexos, de todas as faixas

etárias, de diferentes raças e animais de diferentes aptidões zootécnicas (leite e carne) na linha de abate no frigorífico.

Fragmentos do fígado foram coletados com o auxílio de lâmina de bisturi nº 24 e acondicionados em potes de plástico sem nenhum tipo de conservante. As amostras foram mantidas sob refrigeração em isopor hermeticamente fechado até chegar ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Vassouras, onde foram processadas. As amostras foram identificadas por numeração sequencial e mantidas a -20°C até o momento da extração do DNA total.

Extração do DNA Total

O DNA genômico foi extraído de cada fragmento de fígado 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 concentrações das amostras de DNA foram padronizadas em 20 ng/µL nas alíquotas. O DNA total foi armazenado em microtubos de 1,5 mL a -20 °C para análise molecular.

Reação em Cadeia da Polimerase Convencional

As amostras de DNA de fígado e baço de bovino foram submetidas à amplificação do fragmento de DNA por PCR convencional com o objetivo de realizar uma triagem das amostras. Na reação de *T. vivax* com o gene *catl*, os primers DTO 154 (5'-ACAGAATTCAGGGCCAATGCGGCTCGTGCTGG-3') e DTO155 (5'-TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA-3') foram utilizados, amplificando internamente 500 pb¹³, com adaptações na concentração de dNPT, MgCl₂ e Taq, conforme descrito a seguir.

O volume final da reação foi de 13,5 µL contendo: 6,575 µL de água ultrapura, 1X de tampão da enzima, 3 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 0,5 µM de cada iniciador, 1,5U de Taq DNA polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase) e 1 µL de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: 95 °C por 3 min seguido por 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 59 ° por 45 seg e 72 °C por 2 min, e extensão final a 72 °C por 10 min.

Foi utilizado como controle positivo para *T. vivax* (MH184514), amostra com alta carga parasitária em esfregaços de sangue e confirmado por sequenciamento de DNA para o gene *18 S rDNA*, sem co-infecção. Para o controle negativo foi utilizada água ultrapura para PCR, dentro e fora do fluxo laminar. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% a 100 V por 45 min, corados com corante de ácidos nucleicos GelRed® diluído no gel de agarose (1:10.000) e fotografados em transiluminador Gel Doc™ EZ Imager (BIO RAD®).

Resultado e Discussão

As amostras de DNA de fígado e baço de bovino que foram submetidas à amplificação por PCR convencional apresentaram resultado negativo. Embora as amostras deste estudo não confirmem a presença de animais positivos para a tripanossomose no momento do abate, o número de animais abatidos nestas condições pode estar subestimado, uma vez que a tripanossomose no estado do Rio de Janeiro tem se tornado endêmica desde 2016⁶⁻⁷. Além disso, a utilização de amostras de tecido, como fígado e baço, pode não ser a abordagem ideal para um diagnóstico preciso e confiável da infecção. Isso pode ser corroborado pela teoria de que as lesões inflamatórias e degenerativas observadas no fígado e baço de animais infectados por tripanossomas podem estar relacionadas à deposição de imunocomplexos¹⁴.

Deve-se atentar ao fato de que já foram notificadas infecções humanas atípicas causadas por espécies de *Trypanosoma* que normalmente se restringem a animais¹⁵. Os seres humanos possuem uma proteção inata contra a maioria das espécies de *Trypanosoma*. No entanto, alguns casos de tripanossomoses humanas atípicas (a-HT) causadas por *T. b. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense*, *T. evansi* e *T. lewisi*, que foram todos

considerados não infecciosos para os seres humanos, foram relatados¹⁶. Portanto, tendo em vista a ocorrência ainda rara da doença, como representado na sobre os casos relatados de tripanossomoses humanas atípicas em todo o mundo, o número de animais testados nesta pesquisa pode não ter sido suficiente para encontrar animais positivos para *T. vivax* no momento do abate.

A partir de pesquisas com camundongos sobre a resistência de tripanossomas bovinos ao plasma humano, estudos mencionam que existe uma possibilidade do *T. vivax* produzir infecções transitórias no homem¹⁶. Esses casos de tripanossomoses humanas atípicas (a-HT) são principalmente transitórios, mas alguns requerem tratamento e podem ser fatais¹⁶.

A tripanossomose humana atípica (a-HT) ocorre em razão de alguns fatores como a globalização, mudanças climáticas, desmatamento e estreita associação do homem com as espécies animais, junto à seleção genética natural. O desequilíbrio ambiental com aumento da população de insetos hematófagos como *Stomoxys calcitrans*, vetor mecânico de *T. vivax* também pode contribuir para a difusão desse hemoprotozoário¹⁶.

Uma colaboração diagnóstica poderia ajudar a desenvolver ferramentas e estratégias para detectar melhor a infecção e identificar os riscos à saúde humana. Mais estudos são necessários para abordar aspectos relevantes a respeito dos tripanosomas e sua relação com a saúde pública, visto que a Tripanossomíase Humana Atípica já foi observada como uma doença tropical tão negligenciada, talvez em razão da baixa conscientização nas profissões de saúde e na comunidade agrícola. Portanto, é perfeitamente justificado estabelecer uma rede de estudos diagnóstico para avaliar se o aproveitamento condicional do fígado de animais positivos poderia ser uma ameaça emergente e negligenciada à saúde humana.

Comitê de Ética

Esta pesquisa científica foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Vassouras, em reunião de 27/10/2022, registrada com o protocolo nº 026/2022.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse de nenhuma natureza.

Referências

1. Hoare CA. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. 1972.
2. Radwanska M, Vereecke N, Deleeuw V, Pinto J, Magez S. Salivarian trypanosomosis: a review of parasites involved, their global distribution and their interaction with the innate and adaptive mammalian host immune system. *Frontiers in immunology*. 2018 oct. 2; 9:2253.
3. Paiva F, Lemos RA, Nakasato L, Mori AE, Brum KB, Bernardo KC. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. I-Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2000; 9:135-41.
4. Magona JW, Walubengo J, Odimin JT. Acute haemorrhagic syndrome of bovine trypanosomosis in Uganda. *Acta Tropica*. 2008 aug. 1; 107(2):186-91.
5. Batista JS, Rodrigues CM, Olinda RG, Silva TM, Vale RG, Câmara AC, et al. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. *Parasitology Research*. 2012 jan.; 110:73-80.
6. IX Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário. Pesquisa Veterinária Brasileira 36 (Supl.). Salvador, BA, Brasil: UFRRJ Seropédica; 20 de outubro de 2016.

7. XLIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease in Caxambu, Minas Gerais, Brazil, from November 07th to 09th, 2016; Rio de Janeiro.
8. Chamond N, Cosson A, Blom-Potar MC, Jouvion G, d'Archivio S, Medina M, et al. Trypanosoma vivax infections: pushing ahead with mouse models for the study of Nagana. I. Parasitological, hematological and pathological parameters. PLoS neglected tropical diseases. 2010 aug. 10; 4(8):e792.
9. Zarlenga DS, Higgins J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. Veterinary Parasitology. 2001 nov. 22; 101(3-4):215-30.
10. Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. Molecular and biochemical parasitology. 2002 mar. 1; 120(1):1-21.
11. Ortiz PA, Da Silva FM, Cortez AP, Lima L, Campaner M, Pral EM, Alfieri SC, Teixeira MM. Genes of cathepsin L-like proteases in Trypanosoma rangeli isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. Acta tropica. 2009 dec. 1; 112(3):249-59.
12. Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Anez N, Machado RZ, Gibson WC, Teixeira MM. The taxonomic and phylogenetic relationships of Trypanosoma vivax from South America and Africa. Parasitology. 2006 aug.; 133(2):159-69.
13. Nakayima J, Nakao R, Alhassan A, Hayashida K, Namangala B, Mahama C, et al. Genetic diversity among Trypanosoma (Duttonella) vivax strains from Zambia and Ghana, based on cathepsin L-like gene. Parasite. 2013; 20.
14. Fidelis Junior OL. Patogenicidade do isolado "Lins" de Trypanosoma vivax em bovinos natural e experimentalmente infectados. [dissertação] Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2014.
15. 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. Molecular and Cellular probes. 2009 feb. 1; 23(1):44-51.
16. Kumar R, Gupta S, Bhutia WD, Vaid RK, Kumar S. Atypical human trypanosomosis: Potentially emerging disease with lack of understanding. Zoonoses and public health. 2022 jun.; 69(4):259-76.