

## INVESTIGAÇÃO DE *TRYPANOSOMA VIVAX* E *BABESIA BOVIS* EM ENCÉFALOS DE BOVINOS LEITEIROS NO RIO GRANDE DO SUL

MELÂNIA LAZARRI RIGO<sup>1</sup>; FILIPE OBELAR MARTINS<sup>2</sup>, RODRIGO CUNHA CASQUEIRO<sup>3</sup>, KAUÊ RODRIGUEZ<sup>4</sup>, YAN WAHAST ISLABÃO<sup>5</sup>, CAMILA BELMONTE OLIVEIRA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [memevet@yahoo.com.br](mailto:memevet@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [obelar05@gmail.com](mailto:obelar05@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - [rodrigo.cunha@ufpel.edu.br](mailto:rodrigo.cunha@ufpel.edu.br)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - [kauerodriguez@gmail.com](mailto:kauerodriguez@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - [yanwahast06@gmail.com](mailto:yanwahast06@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [camilabelmontevet@yahoo.com.br](mailto:camilabelmontevet@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A tripanossomose bovina é causada por algumas espécies de protozoário do gênero *Trypanosoma*, o qual tem distribuição mundial, causando prejuízos para produtores de bovinocultura em todo mundo (GERMANO, et al., 2018). Dentre as espécies do gênero, o *T. vivax* é considerado o mais patogênico para a criação de bovinos causando diversos prejuízos econômicos para os produtores de carne e leite (BASTOS, 2019). Os principais sinais clínicos são: febre, anemia, letargia, queda de produção, sinais nervosos, aborto espontâneo podendo inclusive levar o animal a morte (OSÓRIO et al., 2008).

O agente está presente no Brasil há muitos anos e vem sendo diagnosticado cada vez mais em diferentes regiões do país, sendo transmitido através de tabanídeos e pela mosca dos estábulos (*Stomoxys. spp*), causando perdas econômicas significativas na produção de carne e leite (DAGNACHEW & BEZIE, 2015). Embora tenha sido detectado *T. vivax* na região central do Rio Grande do Sul, não há relatos sobre a presença e prevalência do agente no rebanho bovino do estado. No entanto, é comum encontrar rebanhos bovinos com sintomas semelhantes aos da TPB ao causado por este protozoário, sendo tratados para tristeza parasitária, sem um diagnóstico definitivo, e conseqüentemente, a tripanossomose pode estar se expandindo pelo estado pois não há uma forma adequada para o combate (SILVA et al, 2009).

Deste modo, o intuito deste trabalho é verificar a presença de *Trypanosoma vivax* em encéfalo bovinos abatidos em no Rio Grande do Sul, contribuindo para o controle sanitário e integridade dos rebanhos, diminuindo as perdas econômicas e entender sobre a distribuição da tripanossomose bovina no estado.

## 2. METODOLOGIA

Para este estudo, foram coletados fragmentos de 1 cm de encéfalo de 65 bovinos leiteiros de descarte, abatidos em abatedouro na Região Nordeste do Estado. Os animais eram oriundos de propriedades leiteiras (35) situadas em 22 diferentes municípios localizados no Norte do Rio Grande do Sul.

As coletas foram realizadas entre os meses de fevereiro e março de 2022, diretamente na linha de abate, juntamente à inspeção veterinária. Para a remoção do fragmento, a caixa craniana foi aberta com uma serra de frigorífico apropriada, após a coleta, as amostras foram embaladas em papel alumínio e imediatamente refrigeradas em caixa térmica com gelo para o transporte, para preservação do material genético. Posteriormente, foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análise molecular.

A extração do DNA dos tecidos coletados, através da utilização de reagente a base de fenol para extração de ácidos nucleicos e proteínas (Brazol) para posterior análise de diagnóstico molecular por PCR. Para as amostras de encéfalo, foi feita a detecção do DNA de *Trypanosoma vivax* e *Babesia bovis* com primers específicos: *Trypanosoma vivax*: (*T. vivax* F AATGGCTTCTCCATTGGGTTC; *T. vivax* R ATGGAGCAGGCAAAGAGACC) e; *Babesia bovis*: (B bov F TGTTCTGGAAGCGTTGATTC; B bov R AGCGTGAAAATAACGCATTGC).

A detecção do DNA de *Trypanosoma vivax* e *Babesia bovis*, foi realizada através de PCR em tempo real (Step One Plus, Applied Biosystems) pela amplificação do gene Glucose transporter protein (HT1; Genbank: L47540.1) com primers específicos. Os primers (iniciadores) utilizados neste projeto foram desenhados no software Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine), com base nas sequências dos genes depositados no banco de dados GenBank. A reação de qPCR foi realizada em duas etapas, com desnaturação inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos e anelamento/extensão a  $58^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos. A análise da curva de melting foi realizada e o produto do PCR sequenciado.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados preliminares relacionados a primeira parte do trabalho mostram que das 65 amostras cerebrais coletadas, nenhuma delas foram positivas para o flagelado *Trypanosoma vivax*, o que corroborando com o estudo de SILVA et al, 2018, no qual relataram um caso positivo em um bovino na região central do Rio Grande do Sul, o animal parasitado apresentava sinais clínicos e o diagnóstico por PCR confirmou a presença de *T. vivax* no animal, além disso, no mesmo estudo foram analisados amostras de outros 04 bovinos que compartilhavam a mesma área de pastagem e ambos foram negativos para a hemoparasitose. Este único registro, pode indicar a baixa prevalência do protozoário no Estado do RS.

No entanto, 14% das amostras analisadas foram positivas para *Babesia bovis*. Este parasito é transmitido através das larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado um dos agentes do complexo conhecido como Tristeza Parasitária Bovina ou (TPB) (TRINDADE, ALMEIDA & FREITAS, 2011). A prevalência deste protozoário tem grande variação nos estados brasileiros, DA CUNHA et al, 2017, analisaram 156 amostras de bezerras de aptidão leiteira na região Sul do RS, e encontraram 4% (06) amostras positivas para, em outro estudo realizado por Souza et al., 2013 foram analisadas 202 amostras com 33% de positividade. Os estudos supracitados possuem resultados similares ao desta pesquisa.

A infecção por *Babesia bovis* também é conhecida por causar a Babesiose cerebral, enfermidade reconhecida por provocar sinais neurológicos que se caracterizam por transtornos da locomoção, tremores musculares, agressividade e quedas com movimentos de pedalagem, podendo levar o animal à morte em menos de 24 horas (FARIAS, 1995; SANTAROSA et al., 2013).

Por este motivo, o estudo optou pela coleta de material cerebral para as análises de PCR, visto que o *Trypanosoma vivax* e a *Babesia bovis*, ambos protozoários podem ser encontrados no sistema nervoso, podendo atravessar a barreira hematoencefálica, provocando uma série de alterações neurológicas (FREITAS et al, 2018), deste modo pudemos utilizar a mesma amostra de tecido para realizar nossa pesquisa com o uso dos respectivos *primers*.

#### 4. CONCLUSÕES

Concluimos que o presente estudo não encontrou o protozoário *Trypanosoma vivax* que é o objeto de enfoque principal em nossa pesquisa, porém no processo, foi diagnosticado outro parasito de interesse, a *Babesia bovis* um dos agentes da TPB. Este estudo é uma parte de um experimento, que analisará amostras de sangue de bovinos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, T. S. A. Aspectos clínico-epidemiológicos e tratamento da tripanossomose bovina por *Trypanosoma vivax* no estado de Goiás. Tese de doutorado, Universidade Federal de Goiás, 2019.

DA CUNHA, Laís et al. PREVALÊNCIA DE HEMOPARASITOS EM BEZERRAS DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DA REGIÃO SUL DO RS, BRASIL. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 2, 2017.

DAGNACHEW, S. & BEZIE, M. Review on *Trypanosoma vivax*. African Journal of Basic & Applied Sciences, v.7, n.1, p.41-64, 2015.

FARIAS, N. A. R. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. Guaíba, Porto Alegre: Agropecuária. 80p.1995.

FREITAS, L. E. V. de et al. Babesiose cerebral e Salmonelose. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFLA, 31., 2018, Lavras. Anais... Lavras: UFLA, 2018.

GERMANO, P. H. V., et al. Tripanossomose bovina: revisão. PUBVET Medicina Veterinária e Zootecnia, v.12, n.8, p.1-6, ago. 2018.

OSÓRIO, A.L., A. L. A. R., et al. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World – A Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.103, n.1, p.1-12, fev. 2008.

SOUZA, Francisco de A.L. et al. Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira [online]. 2013, v. 33, n. 9

SILVA, Aleksandro Schafer da et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2550-2554, 2009.

TRINDADE, H. I. ALMEIDA, K. S. & FREITAS, F. L. C. Tristeza parasitária bovina - revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, n.16, jan. 2011.