



BJGH

Brazilian Journal
of Global Health

Revista Brasileira
de Saúde Global

Diagnóstico parasitológico e molecular de *Trypanosoma theileri* em bovinos amostrados no extremo sul de São Paulo, SP, Brasil

Dayvid dos Santos Amaral¹, Ryan Emiliano da Silva², Fernanda Ap. Nieri-Bastos³, Arlei Marcili^{1,2*}

¹Programa de Medicina e Bem-Estar Animal e Saúde Única - Universidade de Santo Amaro, São Paulo, SP, Brasil. ²Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. ³Faculdade Anclivepa, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

OBJETIVO

O *Trypanosoma theileri* é a espécie-tipo do subgênero *Megatrypanum*, foi registrado pela primeira vez em bovinos na África do Sul e na África Oriental. As criações de bovinos no extremo sul do município de São Paulo e de Embú-Guaçu, são caracterizadas como de subsistência em propriedades pequenas, foram registradas 500 cabeças de gado no ano de 2019. Esse trabalho objetivou avaliar a ocorrência de *T. theileri* em bovinos de criações familiares no extremo sul do município de São Paulo e do município de Embu-Guaçu, SP, Brasil.

MÉTODOS

Realizou-se diagnóstico parasitológico e molecular em amostras colhidas de 68 bovinos em propriedades de pequeno porte no extremo sul de São Paulo.

RESULTADOS

O diagnóstico molecular específico para *T. theileri* apresentou positividade de 17,6% (12/68) e o diagnóstico parasitológico de 5,8% (4/68).

CONCLUSÕES

Apesar de considerado não patogênico, sua presença no hospedeiro pode favorecer outras doenças parasitárias e infecciosas.

DESCRITORES

Tripanossomíases, Tabanídeos, Ruminantes, PCR.

Corresponding author:

Arlei Marcili. Universidade de Santo Amaro (UNISA).
Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 - Jardim das
Imbuías, São Paulo - SP, 04829-300. Tel: +55-11-99891.
E-mail: amarcili@prof.unisa.br /ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0478-6771>

Copyright: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original author and source are credited.

DOI: <https://doi.org/10.56242/globalhealth;2021;1;3;32-34>

INTRODUÇÃO

Os tripanossomas infectam diversos grupos de vertebrados, contudo, a maior parte não causa doença em seu hospedeiro e circula apenas no meio silvestre. Um mesmo animal pode ser parasitado por várias espécies de tripanossomas e pode ainda apresentar infecções mistas. Nos bovinos, as espécies infectantes são *Trypanosoma brucei brucei*, *T. vivax*, *T. congolense* e *T. evansi* encontrados na África e *T. vivax* e *T. evansi* das Américas^{1,2,3}. *T. theileri* possui distribuição cosmopolita, entretanto, não possuem patogenicidade comprovada ao seu hospedeiro.

O clado *T. Theileri* do subgênero *Megatrypanum* possui o *Trypanosoma theileri* é a espécie-tipo do subgênero *Megatrypanum* e foi registrado pela primeira vez em bovinos na África do Sul e na África Oriental em 1902³. A transmissão do *T. theileri* ocorre durante o repasto sanguíneo de tabanídeos, através da eliminação de fezes que liberam formas tripomastigotas metacíclicas^{1,2}.

Todos os tripanossomas do gado e dos búfalos, de acordo com Hoare³ são considerados *T. theileri*. Todavia, segundo Wells⁴, somente os isolados de gado devem ser considerados sinônimos de *T. theileri*, já isolados de *Megatrypanum* de espécies de *Artiodactyla* que não bovino, incluindo os de outros *Bovidae* spp., exceto caprinos (*T. theodori*) e ovelhas (*T. melophagium*), devem ser classificadas como *T. theileri-like*.⁵

Estudos demonstram a separação de *T. theileri* de bovinos e *T. theileri-like* de búfalos⁵. Assim, duas linhagens filogenéticas principais no subgênero *Megatrypanum* (TthI e TthII) foram propostas a partir de análises filogenéticas de *T. theileri* de bovinos e *T. theileri-like* de búfalos⁵.

A utilização de diferentes metodologias para a análise de variabilidade dos isolados de *T. theileri*, como RAPD e análises filogenéticas baseadas em diversos marcadores moleculares como SSUrDNA, ITS1 SSUrDNA, Citocromo B, Mini-exon e Catepsina *L-Like*, confirmaram a presença de dos dois grandes grupos TthI e TthII e linhagens associadas de acordo com a origem geográfica dos isolados de *T. theileri*^{6,7,8}. A ocorrência e/ou prevalência de *T. theileri* por diferentes metodologias (exames parasitológicos e moleculares) já foi registrada em regiões produtoras de gado em todo o Brasil^{5,6,7,8}.

As criações de bovinos no extremo sul do município de São Paulo e de Embú-Guaçu, são caracterizadas como de subsistência em propriedades pequenas, foram registradas 500 cabeças de gado no ano de 2019⁹. Esse trabalho objetivou avaliar a ocorrência de *T. theileri* em bovinos de criações familiares no extremo sul do município de São Paulo e do município de Embu-Guaçu, SP, Brasil.

MÉTODOS

Amostragem

As amostras obtidas são oriundas de rebanho bovino criado no extremo sul da região metropolitana de São Paulo, em propriedades de pequeno porte com sistema de criação extensivo de bovinos, com produção leiteira e de corte. No distrito de Parelheiros foram amostrados 20 animais (raças Girolanda e Holandesa) com idade entre 2 e 6 anos, em Marsilac foram 18 animais (Girolanda, Gir e Holandesa) com idade de 4 e 6 anos, em Cipó-Guaçu foram 12 animais (Girolanda e Holandesa) com idade entre 2 e 4 anos e em Embú-Guaçu foram 18 animais (Girolanda, Holandesa e Nelore) com idade entre 2 e 4 anos.

A região escolhida para a realização do presente estudo possui áreas florestadas, úmidas, alagadas e com clima quente, sendo favoráveis para o desenvolvimento do inseto vetor (tabanídeos).

Coleta e processamento das amostras de sangue

As amostras sanguíneas foram coletadas por venopunção jugular externa em tubos siliconizados vacutainer® contendo ácido dietileno diamino tetracético (EDTA). As amostras de sangue foram fracionadas em tubos plásticos tipo eppendorf e congeladas a -20°C para posterior análise molecular.

Diagnóstico parasitológico

Amostras de sangue coletadas por punção da veia jugular ou caudal foram inoculadas em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (blood agar base com 10% sangue de coelho) e fase líquida de meio LIT (contendo soro fetal bovino e antibióticos)⁶. As amostras foram examinadas semanalmente por um período de 2 meses.

Diagnóstico molecular

Foi utilizado o kit comercial Purelink Genomic DNA (Thermo-Fisher) para a extração de DNA diretamente de sangue e quantificados fotometricamente por meio do Nanodrop (Thermo-Fisher). Os oligonucleotídeos e condições das reações para o diagnóstico molecular baseado no gene de catepsina *L-like* seguiram o protocolo proposto por Rodrigues e colaboradores¹⁰. Como controle positivo foi utilizada amostra de DNA do isolado de *T. theileri* CBT 111 criopreservado na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

RESULTADOS

Foram colhidas amostras de 68 bovinos em propriedades de pequeno porte no extremo sul de São Paulo. Dos animais amostrados 5,8% (4/68) foram positivos para *T. theileri* em hemocultura. As hemoculturas positiveram com 8 dias após sementeadas e não foi possível o estabelecimento e criopreservação das culturas. As formas epimastigotas de cultura apresentavam morfologia compatível com *T. theileri* (dados não mostrados).

O diagnóstico molecular específico para *T. theileri* baseado no gene de catepsina *L-like* apresentou positividade de 17,6% (12/68) em animais provenientes dos distritos de Parelheiros e Marsilac. Todas as amostras positivas na hemocultura também foram positivas no diagnóstico molecular e são provenientes da mesma propriedade em Parelheiros.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram, tanto por hemocultura quanto PCR, a presença do *T. theileri* na região extremo sul do município de São Paulo, sendo todas as amostras positivas da mesma propriedade. Os animais testados são da raça Girolanda e Holandesa, adquiridos de regiões próximas. A propriedade é de pequeno porte, situada às margens de um fragmento de Mata Atlântica ainda preservada, além de estar próximo ao Parque Estadual da Serra do Mar. O clima da região é composto por dias quentes de muito sol, seguidos de noites frias com garoas e chuvas constantes (tropicais e neotropicais), favorecendo a prevalência dos vetores (tabanídeos e hipoboscídeos)¹¹. Além disso, o rebanho é criado em sistema extensivo, estabulados somente no momento da ordenha, facilitando o contato com os ectoparasitos.

Segundo Hoare³, *T. theileri* é a espécie tipo do subgênero (*Megatrypanum*), no qual inclui espécies que, segundo crité-

rios tradicionais, possuem em comum a presença de grandes tripomastigostas sanguíneos, transmissão por contaminação pelos vetores tabanídeos e/ou hipoboscídeos (hospedeiros intermediários), restrição a hospedeiros mamíferos ungulados, patogenicidade limitada e ampla distribuição mundial, corroborando os resultados encontrados neste trabalho, no qual os animais positivos apresentavam-se em bom estado geral, sem apresentar nenhuma alteração patológica. A presença de insetos da família Tabanidae foi relatada em todas as propriedades em que foram colhidas amostras para hemocultura e PCR.

Durante o repasto sanguíneo, o hospedeiro invertebrado (vetor) ingere formas tripomastigotas sanguíneas do hospedeiro definitivo, que se desenvolvem na porção final do intestino desses vetores em epimastigotas e defecam formas tripomastigotas metacíclicas, que por meio de soluções de continuidade da pele ou mucosa, infectam um novo hospedeiro definitivo. A enorme diversidade de hospedeiros reflete a ampla distribuição geográfica dele, variedade de ecossistemas e nichos ecológicos, além dos mecanismos de transmissão descritos¹².

Trabalhos anteriores relatam o isolamento de *T. theileri* em bovinos e búfalos (*T. theileri*-Like), na região do Vale do Ribeira, estado de São Paulo⁴. Contudo, o presente estudo é o primeiro a demonstrar a presença e a ocorrência de *T. theileri* na região metropolitana de São Paulo. A ocorrência de *T. theileri* no Brasil é estimada em 90%, sendo registrados isolados de *T. theileri* nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Pará e Rio Grande do Sul^{6,7,8,13}.

O fato de *T. theileri* possuir distribuição mundial e ser ciclicamente transmitidos por tabanídeos, que geograficamente estão difundidos e bem adaptados ao clima brasileiro junto a grande oferta de hospedeiros no país, que são criados em sistema extensivo, somada a importação de animais de áreas endêmicas, podem explicar a presença do *T. theileri* na região extremo sul município de São Paulo.

A região estudada possui duas grandes represas, Guarapiranga e Billings, utilizadas no abastecimento de água da população da região metropolitana de São Paulo com remanescentes de Mata Atlântica. Apresenta propriedades com características rurais e pequenas propriedades com produção familiar, sendo, estes poucos animais a fonte de leite disponível. Apesar de considerado não patogênico, a presença *T. theileri* no hospedeiro, pode favorecer outras doenças parasitárias e infecciosas⁵. Novos estudos devem ser conduzidos para o isolamento e tipagem das linhagens que ocorrem na área.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.
2. Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol. 2006;22(4):168-74.
3. Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Molecular phylogenetics and evolution 2007 Jul;44(1):15-25.
4. Wells EA. Subgenus Megatrypanum. In: Biology of the Kinetoplastida. Academic Press. London. P.25 7-275.

5. Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Dell'Porto A, 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(3):185-207.
6. Pacheco TDA, Marcili A, Costa APD, Witter R, Melo ALT, Boas RV, Chitarra CS, Dutra V, Nakazato L, Pacheco RC. Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in cattle in Brazil's western Amazon region. Rev Bras Parasitol Vet. 2018 Oct-Dec;27(4):579-583. doi: 10.1590/S1984-296120180049. Epub 2018 Aug 16. PMID: 30133593.
7. Garcia HA, Rodrigues AC, Martinkovic F, Minervino AHH, Campaner M, Nunes VLB, et al. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma (Megatrypanum)* genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. Int J Parasitol 2011b; 41(13-14): 1385-1396. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.09.001>. PMID:22051399
8. Yokoyama N, Sivakumar T, Fukushi S, Tattiyapong M, Tuvshintulga B, Kothalawala H, et al. Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. Vet Parasitol 2015; 207(3-4): 335- 341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.006>. PMID:25554063.
9. Censo agropecuário de 2019. [internet] [Acessado em abril 2021] Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br>.
10. Rodrigues AC, Garcia HA, Ortiz PA, Cortez AP, Martinkovic F, Paiva F, et al. Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. Parasitol Int. 2010b; 59:318-325.
11. Guimaraes AE, Gentile C, Lopes CM, Mello RP. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil III. Daily biting rhythms and lunas cycle influence. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95:753-60.
12. Bose R, Heister NC. Development of *Trypanosoma (M.) theileri* in tabanids. J Eukaryot Microbiol. 1993;40(6):788-92.
13. Rodrigues AC, Garcia HA, Batista JS, Minervino AH, Goés-Cavalcante G, Maia da Silva F, et al. Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. Parasitology 2010b; 137(1): 111-122. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182009991053>. PMID:19765336