



Estimativa da taxa de infecção por *Babesia bovis* usando a técnica de RT-PCR em animais de diferentes grupos genéticos¹

Talita Barban Bilhassi², Adriana Mércia Guaratini Ibelli³, Rodrigo Giglioti⁴, Wilson Malagó Júnior⁵, Luciana Correia de Almeida Regitano⁵, Márcia Cristina de Sena Oliveira⁵, Henrique Nunes de Oliveira⁶

¹Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal - FCAV/UNESP-Jaboticabal. Bolsista FAPESP. e-mail: talitabarban@yahoo.com.br

³Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução – UFSCAR-São Carlos. Bolsista CAPES

⁴Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal - FCAV/UNESP-Jaboticabal. Bolsista CAPES

⁵Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos – Rodovia Washington Luiz, Km 234, Caixa Postal 339

⁷Departamento de Zootecnia- UNESP-Jaboticabal. Bolsista do CNPq

Resumo: O objetivo deste trabalho foi padronizar um protocolo de quantificação de *Babesia bovis* que possibilitasse comparar o nível de infecção dos animais de diferentes grupos genéticos e faixas etárias. Foram utilizadas amostras de sangue colhidas de 150 bovinos, criados em regiões endêmicas para as babesioses. Após a extração do DNA, foram realizadas reações de RT-PCR para todos os indivíduos. A curva padrão foi elaborada a partir da purificação e quantificação dos produtos de PCR. Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) no nível de infecção entre os grupos genéticos e categorias estudadas. O nível de infecção dos animais da raça Angus foram maiores, seguidas pelos animais cruzados e o Nelore. Os bezerros também apresentaram maiores níveis de infecção.

Palavras-chave: babesioses, gado de corte, método, resistência

Estimate of the rate of infection by *Babesia bovis* using the technique of RT-PCR in animals of different genetic groups

Abstract: The objective was to standardize a protocol for quantification of *Babesia bovis* that would allow estimating the rate of infection in animal genetic groups and different age groups. We collected blood samples from 150 cattle in regions endemic for babesiosis. After DNA extraction, reactions were performed by RT-PCR for all individuals. The standard curve was drawn from the purification and quantification of PCR products. Statistical analysis was performed with data transformed by logarithms, using the computer program Statistical Analysis System V.9.1 (SAS). At the 5% level of significance, significant differences were observed in the infection rate in animals of different genetic groups and categories.

Keywords: babesiosis, beef cattle, method, resistance

Introdução

O controle das babesioses bovinas é baseado principalmente no combate ao carrapato vetor, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. No entanto, o uso de acaricidas como ferramenta exclusiva de controle tem seu futuro comprometido, devido ao progressivo aumento no número de casos de resistência aos princípios químicos usados e a falta de perspectivas para o desenvolvimento de novas moléculas. Além disto, a presença de resíduos de medicamentos nos produtos de origem animal é apontada como um grave problema para a saúde pública e para a comercialização dos produtos de origem animal. Desta maneira, é de extrema importância a adoção de medidas alternativas que possam auxiliar no controle efetivo destas doenças. A identificação de animais e raças mais resistentes pode ajudar no desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético que visem o aumento da resistência dos rebanhos às babesioses, possibilitando a maximização da produção na pecuária de corte. Vários estudos mostraram que animais zebuínos são mais resistentes às babesioses, quando comparados aos taurinos (Bock et al., 2004). OLIVEIRA et al. (2008) estudaram a taxa de infecção por *B. bigemina* em animais



48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

O Desenvolvimento da Produção Animal e a Responsabilidade Frente a Novos Desafios

Belém - PA, 18 a 21 de Julho de 2011



de diferentes grupos genéticos, usando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Estes estudos mostraram que em sistemas endêmicos estáveis, não havia diferença na taxa de infecção para os diferentes grupos genéticos estudados. A técnica utilizada naquele estudo não permitia a estimativa do nível de infecção de cada animal. Assim o objetivo do presente trabalho foi padronizar um protocolo de quantificação do número de cópias do DNA alvo (de *Babesia bovis*) presente nas amostras testadas de forma que possibilitasse comparar o nível de infecção em animais de diferentes grupos genéticos e faixas etárias.

Material e Métodos

Foram utilizados grupos de 25 vacas e 25 bezerros de corte, para cada um dos três grupos genéticos diferentes (50 Nelores, 51 ½Nelores + ½ Angus e 49 Angus), criados em regiões endêmicas para as babesioses. Foram colhidas amostras de sangue da veia jugular de cada animal, e o DNA, foi extraído utilizando o Kit DNA Easy (Invitrogen) de acordo com as informações do fabricante. A técnica adotada para estimar a quantidade de cópias de DNA de *Babesia bovis* nas amostras, foi uma adaptação daquela descrita por BULING et al. (2007). As reações de RT-PCR foram realizadas com Power Sybr Master Mix (Applied Biosystems), com volume final de 15 uL e DNA na concentração de 10 ng. As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 min, 35 ciclos de 95°C por 2 min, 50°C por 0.30s 60°C por 30s, seguidas da curva de dissociação de 60 a 95°C por 15 segundos. Para a quantificação absoluta, uma curva padrão foi construída a partir dos produtos de PCR do amplicon de interesse (88 pares de base). As amostras foram quantificadas empregando-se o aparelho Nano Drop ND-1000 spectrophotometer. Logo após, foram feitas diluições seriadas na proporção de 1:10. Em cada diluição, o número de cópias foi mensurado utilizando-se a seguinte fórmula: $6 \times 10^{23} \times \text{concentração em g/uL} / \text{MW (g/mol)}$, de acordo com Ke et al. (2006). Em seguida, uma análise de regressão linear foi realizada, obtendo-se o coeficiente de angulação da reta e o intercepto. Para a estimação da quantidade de cópias/amostra de sangue, a seguinte fórmula foi utilizada: quantidade (cópias/uL) = $10^{(C_q - b)/m}$, onde b é o intercepto e m é o coeficiente de angulação da reta. A análise estatística foi realizada por análise de variância, considerando os efeitos de grupo genético, categoria animal e interação grupo genético vs categoria animal. Devido à dependência observada entre a média e variância, os dados foram transformados em logaritmo na base 10. As análises foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM do programa computacional Statistical Analysis System v.9.1 (SAS).

Resultados e Discussão

Com a utilização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), foi possível obter-se uma estimativa da intensidade de infecção por *B. bovis*, em bovinos de diferentes grupos genéticos e idades. A regressão linear do número de cópias no logaritmo da concentração apresentou o coeficiente de angulação de -3.21, e coeficiente de determinação de 0.99, indicando boa padronização dos primers e ótima qualidade das amostras de DNA, conforme a figura 1.

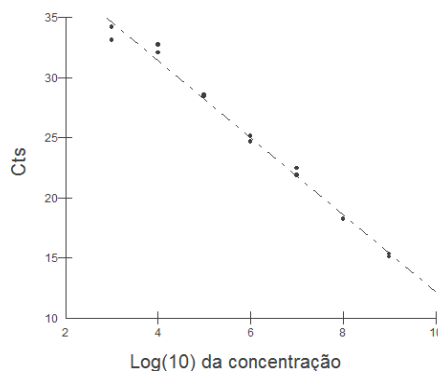




Figura 1. Curva padrão obtida a partir da regressão linear

Os resultados obtidos pela técnica RT-PCR demonstraram que, a taxa de infecção por *B. bovis* para os 150 bovinos estudados foi de 97,7%. As taxas de infecção apresentadas pelos animais dos três grupos genéticos foram de 100%, 96% e 93,8% respectivamente, para os grupos genéticos Angus, ½ Angus + ½ Nelore e Nelore. As análises estatísticas do nível de infecção, medido pelo número de cópias de DNA alvo na amostra, mostraram significância ($P < 0,05$) dos três fatores avaliados: grupo genético, categoria e a interação. Os três grupos genéticos apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$).

As médias do log do número de cópias do DNA alvo, conforme o grupo genético e a categoria, estão apresentados na Tabela 1. Como um número variável de cópias do DNA alvo está presente em cada merozoíta de *Babesia bovis*, o número de cópias na amostra não representa exatamente o número de parasitas na amostra, apesar disto, podem representar uma boa estimativa do nível de infecção de cada animal.

Tabela 1. Média do número de cópias de DNA alvo (*Babesia bovis*) obtidos pela RT-PCR nos diferentes grupos genéticos e categorias

GRUPO GENÉTICO	CATEGORIA	MÉDIA*	ERRO PADRÃO
Angus	Bezerro	5,7699A	0,19387317
Angus	Vaca	5,6859A	0,18595661
Cruzado	Bezerro	4,7269B	0,18234546
Cruzado	Vaca	3,6951C	0,1859661
Nelore	Bezerro	3,9585C	0,18234546
Nelore	Vaca	3,5489C	0,1859661

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$)

Os resultados mostram que os zebuínos apresentaram taxa de infecção ligeiramente menor, mas principalmente, um nível de infecção consideravelmente menor quando comparados aos taurinos, sendo que os mestiços encontram-se em posição intermediária, porém bem mais próximos dos zebuínos do que dos taurinos. Mostram ainda que os taurinos apresentam susceptibilidade alta às infecções por *Babesia bovis*.

Com relação à categoria animal, os bezerras em decorrência da baixa imunidade são mais susceptíveis às hemoparasitoses. Desta maneira, é imprescindível que os mesmos sejam expostos aos carrapatos desde o nascimento, para que desenvolvam anticorpos e se tornem portadores saudáveis da doença, estimulando o sistema imunológico através das inoculações dos agentes infecciosos.

Conclusões

Os resultados obtidos nos permitem concluir que o método padronizado é eficaz para detectar diferenças nos níveis de infecção dos animais por *Babesia bovis* e que as diferenças entre taurinos e zebuínos quanto à resistência à babesiose, é muito mais relacionada com o nível de infecção do que com a taxa de infecção pelo parasito.

Literatura citada

- BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; et al. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129, S247-S269, 2004.
- BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ACENZO, G.; et al. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Veterinary Parasitology*, V.147, p. 16-25, 2007.
- GUAN M. KE.; HUSEN L. CHENG.; LIANG Y. KE.; et al. Development of a quantitative light cycler real time RT-PCR for detection of avian reovirus. *Journal of Virological Methods*, 6-13, 2006.
- OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C.; REGITANO, L. C. A.; et al. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Tick. *Veterinary Parasitology*, V.155, p.281-286, 2008.



**48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira
de Zootecnia**

*O Desenvolvimento da Produção Animal e a
Responsabilidade Frente a Novos Desafios*

Belém - PA, 18 a 21 de Julho de 2011



SAS, Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, version 6.11, 4ed., v.2, Cary, SAS Institute Inc., 842p, 1996.