

DETECÇÃO DE *Babesia bovis* E *Babesia bigemina* PELA TÉCNICA DE N-PCR EM BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS

M. C. OLIVEIRA, DE SENA,¹, L. DE ALMEIDA-REGITANO, CORREIA¹; M. DE ALENCAR, MELLO¹; A. M., SILVA², M. STEIN RUSSO³, T. DE OLIVEIRA RODRIGUES⁴, H. DE OLIVEIRA, NUNES⁴

¹Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil, ²Ufscar, ³UnB, ⁴Unesp, Botucatu.
marcia@cnpse.embrapa.br

RESUMO

As taxas de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* foram estimadas em bovinos de diferentes grupos genéticos, criadas em área de estabilidade endêmica do Estado de São Paulo - Brasil. Amostras de sangue obtidas de 212 animais foram usadas para determinar o volume globular (VG) e extração de DNA. Todas as amostras de DNA foram submetidas a amplificação por PCR e N-PCR para *B. bovis* e *B. bigemina*. As taxas de infecção foram altas e não diferiram significativamente ($P>0,05$) nos grupos genéticos estudados. Não foram observadas associações entre presença de hemoparasitas e valores de VG. Os resultados das reações de PCR e N-PCR indicaram que a disponibilidade de DNA parasitário foi inversamente proporcional à idade dos animais.

Palavras chave: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, suscetibilidade genética, PCR, N-PCR.

ABSTRACT

The infection rates for *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* were estimated in cattle of different genetic groups from a endemic area of babesiosis in São Paulo State - Brazil. Blood samples obtained from 212 animals were used for determination of packed cell volume (PCV) and DNA extraction. All of the extracted DNA samples were submitted to amplification by PCR and N-PCR for *B. bovis* e *B. bigemina*. The infection rates were high and did not differ significantly ($P>0,05$) in the genetic groups studied. Associations between the presence of hemoparasites and PCV values were not observed. The results of PCR and N-PCR reactions indicated that the availability of parasitic DNA was contrariwise proportional of age of the animals.

Key word: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, breed susceptibility, PCR, N-PCR.

INTRODUÇÃO

No Brasil as babesioses bovinas ocorrem predominantemente sob a forma de endemia estável. Se por um lado a resistência dos bovinos de raças zebuínas às babesioses constitui uma das razões pelas quais estes animais mantêm altos índices de produtividade sob condições de endemicidade, a alta resistência que apresentam contra os carrapatos pode influir na taxa de inoculação (Uilenberg, 1995). Cruzamentos de raças zebuínas e taurinas podem originar animais suscetíveis a cepas virulentas desses protozoários (Bock et al., 1997). Como a detecção de portadores sadios, depende de métodos de diagnóstico mais sensíveis (Böse, 1995, Oliveira, 2002) as técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e "nested" PCR (N-PCR) foram utilizadas no presente estudo, com a finalidade de verificar se existem diferenças nas prevalências desses protozoários em fêmeas zebuínas e cruzadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas amostras de sangue de 212 fêmeas (52 Nelore, 55 Canchim/Nelore, 54 Angus/Nelore e 52 Simental/Nelore), divididos em 3 classes de idade : 9 a 15 meses (classe 1), de 16 a 50 meses (classe 2) e de 51 meses a 72 meses (classe 3). O volume globular foi determinado pela técnica do microhematócrito. O DNA foi extraído utilizando-se o kit GFX (Amersham Biosciences) e as reações de amplificação foram realizadas conforme Figueroa et al., (1993). Foram consideradas positivas as amostras cujos fragmentos amplificados apresentaram tamanho de 278 pb para *B. bigemina* e 350 pb para *B. bovis*. As amostras negativas foram submetidas a segunda reação (N-PCR) e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram

fragmentos com 170 pb e 290 pb para *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente. A análise estatística foi realizada utilizando-se o procedimento GLM do SAS (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores do VG variaram entre 30 e 48% e não houve associação entre esses dados e resultados de PCR e N-PCR. As frequências de infecções por *B. bovis* e *B. bigemina* determinadas por amplificação de DNA, foram altas e semelhantes ($P>0,05$) nos quatro grupos genéticos, assim como nas três faixas etárias avaliadas, confirmando a condição de endemia estável da região estudada (Oliveira *et al.*, 2005). Considerando-se o nível de sensibilidade das reações de PCR e N-PCR, verifica-se que a disponibilidade de DNA de *B. bovis* e de *B. bigemina* foi inversamente proporcional à idade dos animais ($P<0,05$), conforme apresentado na Tabela 1. Para *Babesia bovis*, apenas um animal foi negativo após a N-PCR. Os resultados dos testes de PCR e N-PCR para *B. bigemina*, foram semelhantes aos observados para *B. bovis* e mostraram novamente associação significativa pelo teste de qui-quadrado entre idade e parasitemia.

Tabela 1. Detecção de *B. bovis* e *B. bigemina* em sangue de 212 bovinos de diferentes grupos genéticos por amplificação do DNA (PCR/N-PCR)*.

Idade (meses)	<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>	
	PCR (%)	N-PCR (%)	PCR (%)	N-PCR (%)
9 a 15	82,5	16,7	88,6	11,4
16-50	12,8	87,2	23,5	74,4
51-72	0	99,5	0	92,3

*A sensibilidade estimada para os testes de PCR e N-PCR para *B. bigemina* correspondeu a parasitemias de 0.00003% e 0.000003%, respectivamente. Para *B. bovis*, essa sensibilidade correspondeu a parasitemias de 0.000017% (PCR) e 0.0000017% (N-PCR).

A necessidade de uma segunda reação de PCR (N-PCR) foi fundamental para detecção de todos os portadores, como já observado anteriormente (Oliveira, 2002., Oliveira *et al.*, 2005). Considerando-se apenas o resultado do PCR, não houve efeito significativo do resultado do diagnóstico para as duas espécies de protozoários sobre o hematócrito, dentro de classe de idade. Este resultado sugere que o limiar de parasitemia a partir do qual o PCR detecta a presença do parasita no sangue não permite discriminar entre aqueles que sofrem ou não os efeitos da parasitose. Embora seja reconhecida a maior resistência dos bovinos de origem zebuína às babesias (Bock *et al.*, 1997), os dados mostraram que ela não se traduz em menor parasitemia e que todas as raças contribuem de maneira similar para a manutenção da endemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bock, R.E., de VOS, A.J., Kingston, T.G., Mc Lellan, D.J., 1997. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale*. *Aust. Vet. J.*, 75 (5), 337-40.
- Bose, R., Jorgensen, W.K., Dalgliesh, R.J., Friedhoff, K.T., DeVos, A.J., 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.* (57), 61-74.
- Figueroa, J.V.; Chieves, L.P.; Johnson, G.S.; Buening, G.M., 1993. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.* 50, 69-81.
- Uilenberg, G., 1995. International collaborative research significance of tick-borne hemoparasitic disease to world animal Health. *Vet. Parasitol.* 57, 19-41.
- Oliveira, M.C.S., Oliveira-Sequeira, T.C.G., Araujo-Jr. J.P., Amarante, A.F.T., Oliveira, H.N., 2005. *Babesia* spp. Infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 130, 61-67.
- SAS, Institute Inc., SAS/STAT, 1996. User's Guide, version 6.11, 4ed., v. 2, Cary: SAS Institute Inc., 842p.