



ESTUDO DA INFECÇÃO POR

MÁRCIA CRISTINA DE SENA OLIVEIRA¹, LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO², TERESA CRISTINA GOULART DE OLIVEIRA-SEQUEIRA³, MAURÍCIO MELLO DE ALENCAR³, ANA MARY DA SILVA⁵, HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA⁴ THALITA ATHIÊ NÉO⁶

- 1) Projeto financiado pelo CNPq
- 2) Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz km 234, São Carlos, SP. marcia@cppse.embrapa.br.
- 3) Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste.
- 4) Professor da UNESP-Botucatu
- 5) Aluna de pós-graduação da UFSCAR
- 6) Aluna de graduação UNIARA

RESUMO

A taxa de infecção por "B. bigemina" foi estudada em bovinos de diferentes grupos genéticos e em teleóginas de "B. microplus". Amostras de sangue foram obtidas de 15 vacas e 15 bezerros dos grupos genéticos: Nelore, Canchim/Nelore, Angus/Nelore e Simental/Nelore. Essas amostras foram utilizadas para confecção de esfregaços de sangue, para extração de DNA e determinação do volume globular. Todas as amostras de DNA foram submetidas a amplificação pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR usando primers específicos para "B. bigemina". Simultaneamente foram colhidas teleóginas de vacas e bezerros, a fim de se verificar a taxa de infecção por "Babesia bigemina" (por meio de exame direto da hemolinfa e por N-PCR). A amplificação do DNA de "B. bigemina" (N-PCR) detectou que 100% dos animais são positivos em todos os grupos genéticos estudados. Nos bezerros foi possível detectar parasitemias por meio da reação de PCR (primeira reação), fato que mostra que esses animais apresentam maior disponibilidade de DNA de "B. bigemina", quando comparado aos adultos. Os bezerros apresentaram menor nível de hematócrito, quando comparado às vacas. Por meio de N-PCR foi possível detectar 186 (16,9%) carrapatos infectados por "B. bigemina" distribuídos em todos os grupos genéticos e categorias de idades. Porém, novamente foi verificada uma forte associação entre idade e taxa de infecção dos carrapatos, mas não houve diferenças significativas entre os grupos genéticos.

PALAVRAS-CHAVE

suscetibilidade genética, babesioses, bovinos, PCR, N-PCR,

STUDY OF BABESIA BIGEMINA INFECTION IN CATTLE OF DIFFERENT GENETIC GROUPS AND IN BOOPHILUS MICROPLUS ENGORGED FEMALES IN SÃO PAULO STATE.

ABSTRACT

The "Babesia bigemina" infection rate and the effects of animal breed on infection were estimated in cattle of different genetic groups raised in the São Paulo State. Blood samples were obtained from 15 cows and 15 calves from the following genetic groups: Nelore, Canchim/Nelore, Angus/Nelore and

Simental/Nelore. Blood samples were used to produce thick blood films, for DNA extraction and for determination of packed cell volume (PCV). All DNA samples were submitted to amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Nested -PCR using primers specific for *B. bigemina*. Engorged *Boophilus microplus* females were simultaneously collected from cows and calves, to determine the *B. bigemina* infection rate by microscopic detection and N-PCR. The amplification of parasitic DNA (N-PCR) detected that 100% of animals were positives in all genetic groups. In calves it was possible to detect positive animals by PCR (first reaction). This fact shows that these animals had more DNA of *B. bigemina*, when compared to cows. It was observed an association between the PCV values and animals age. By using N-PCR it was possible to detected 186 (16,9%) infected ticks in calves as well as cows from all genetic groups and again a strong association between age of host and rate of *Babesia* infection on ticks.

KEYWORDS

genetic suscetibility, babesiosis, bovine, PCR, N-PCR

INTRODUÇÃO

Infestações por *Boophilus microplus* são responsáveis por drástica redução na produtividade dos bovinos. Independente dos hemoparasitas que o carrapato transmite, pode ocorrer anemia, imunossupressão e perda de peso. As babesias também provocam efeitos graves na produtividade do gado (Guglielmone et al., 1997). Como métodos de controle efetivos ainda não são disponíveis, a utilização de raças zebuínas tem sido uma alternativa para reduzir as perdas devido a esses problemas (Bock, 1997). Pouco se conhece sobre as possíveis diferenças nas taxas de infecção por babesias nos animais sensíveis e resistentes e os fatores que afetam as taxas de infecção dos carrapatos colhidos desses hospedeiros. Novas técnicas de amplificação de DNA parasitário são capazes de detectar a presença de babesias, mesmo em quantidades muito pequenas (Oliveira et al., 2005). Desse modo o presente trabalho foi delineado, com o propósito de verificar se existe diferença entre as taxas de infecção por *Babesia bigemina* em animais puros *Bos indicus* (Nelore) e cruzados com raças taurinas (Canchim/Nelore, Angus/Nelore e Simental/Nelore) utilizando a Reação de PCR/ N-PCR e exames diretos de esfregaços de sangue e ainda, verificar se existe diferença nas taxas de infecção por *Babesia bigemina* em fêmeas adultas de *Boophilus microplus* colhidas desses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas amostras de sangue de 15 vacas e 15 bezerros, de cada um dos grupos genéticos: Nelore, Canchim/Nelore, Angus/Nelore e Simental/Nelore. Essas amostras foram utilizadas para confecção de esfregaços de sangue, determinação do volume globular e para extração de DNA. Os esfregaços de sangue foram fixados, corados com Giemsa e examinados em microscópio óptico com aumento de 1000X. Todas as amostras de DNA foram submetidas a amplificação pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR (N-PCR) utilizando primers específicos para *Babesia bigemina* (Figuroa et al., 1993). De cada animal, foram colhidas até 10 fêmeas adultas (diâmetro superior a 4,5 mm) de *Boophilus microplus*, que foram colocadas em placas escavadas de polietileno, individualmente e incubadas em BOD a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade superior a 70% por quinze dias, para realização da postura. Após esse período, as teleóginas foram examinadas, individualmente, para a pesquisa de babesias na hemolinfa. Para esse fim amostras de hemolinfa foram obtidas por meio da secção de uma das patas e recolhidas em lâminas de vidro, fixadas com metanol, coradas com Giemsa e examinados em microscópio (aumento de 1000X). Após a obtenção das amostras de hemolinfa, as teleóginas foram submetidas a extração de DNA. As reações de PCR/N-PCR para *B. bigemina* foram feitas utilizando a mesma técnica desenvolvida para as amostras de sangue. Os testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher foram utilizados para verificar associações entre grupos genéticos e idade com as taxas de infecção por *B. bigemina* nos animais e

nos carrapatos, empregando-se para os testes o procedimento FREQ do sistema de análises estatísticas SAS (SAS, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise microscópica dos esfregaços de sangue periférico dos bovinos permitiu a detecção de babesias somente em esfregaços de sangue de bezerros (3 Nelore e 2 Angus/Nelore), enquanto nenhuma vaca foi detectada positiva. A amplificação do DNA do parasita pela sequencia de PCR/N-PCR detectou que 100% dos animais (bezerros e vacas) são positivos para "B. bigemina" em todos os grupos genéticos estudados. Esses achados mostram que a maior resistência dos zebuínos às babesioses não pode ser interpretada como uma capacidade de se manter livre ou com um baixo nível de infecção e desse modo, os prejuízos advindos do estado de portador afeta todas as raças estudadas. O fator que mais afetou a presença de babesias no sangue dos animais foi a idade. Somente nos bezerros foi possível detectar parasitemias por meio da reação de PCR (primeira reação) em todos os grupos genéticos estudados, fato que mostra que esses animais apresentam maior disponibilidade de DNA do parasita, quando comparado aos adultos. Esse fato confirma em parte a observação feita por meio dos exames diretos, quando somente bezerros foram detectados com parasitemia. Os bezerros apresentaram menor nível de hematócrito, consequência provavelmente da maior parasitemia por "B. bigemina". A forte relação idade/ parasitemia por babesias foi verificada em animais mestiços leiteiros criados na mesma região de São Carlos (Oliveira-Sequeira et al., 2005). Pelo exame direto de hemolinfa foi possível detectar infecção apenas em carrapatos colhidos em bezerros, sendo : 4 em Nelore, 1 em Angus/Nelore, 2 em Canchim/Nelore e 3 em Simental/Nelore. Por meio de N-PCR foi possível detectar um número maior de carrapatos infectados, tanto em vacas como em bezerros de todos os grupos genéticos, sendo também verificada uma forte associação entre idade e taxa de infecção dos carrapatos (Tabela 1). Já é conhecido o fato que a parasitemia do hospedeiro afeta a taxa de infecção dos carrapatos vetores (Oliveira et al., 2005). Desse modo, carrapatos que se alimentam em animais com parasitemia detectada pelo exame direto apresentam maior taxa de infecção por babesias. Foi verificada uma forte associação entre a detecção da parasitemia pelo PCR (primeira reação) nos bovinos e a taxa de infecção por "B. bigemina" nos carrapatos colhidos nesses animais. Este resultado indica que embora a técnica de amplificação de DNA dos protozoários empregada não possa ser utilizada para quantificar a parasitemia, parece evidente que os animais positivos na primeira reação apresentam um número maior de parasitas.

CONCLUSÕES

As taxas de infecção por "B. bigemina" nos quatro grupos genéticos estudados não diferiram, o que mostra que a maior resistência às babesias atribuídas aos animais zebuínos não é convertida em um menor nível de parasitas que cada animal portador alberga. Desta forma parece que todos os grupos genéticos estudados contribuem de igual forma para a manutenção da endemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Bock, R.; DeVos, A.J.; Kingston, T.G.; McLellan, D.J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*. Australian Veterinary Journal. v.75, n.5, 1997.
- 2-Figueroa, J.V.; Chieves, L.P.; Johnson, G.S.; Buening, G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. Veterinary Parasitology, v.50, p. 69-81, 1993
- 3-Guglielmone, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Veterinary Parasitology. v.57, p.109-119, 1997.
- 4-Oliveira, M.C.S., Oliveira-Sequeira, T.C., Araujo Jr., J.P., Amarante, A. F.T., Oliveira, H.N. *Babesia* spp. Infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. Veterinary

Parasitology. v.130, p.61-67, 2005.

4-Oliveira-Sequeira, T.C.; Oliveira, M. C. S.; Araujo Jr., J.P.; Amarante, A. F.T. PCR-based detection of Babesia bovis and Babesia bigemina in their natural host Boophilus microplus and cattle. International Journal for Parasitology. v. 35, p. 105-111, 2005.

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

Tabela 1- Taxa de infecção por "Babesia bigemina" e em fêmeas de "B. microplus" colhidas de bovinos de acordo com o grupo genético e a idade dos bovinos*

	Angus/Nelore	Canchim/Nelore	Simental/Nelore	Nelore	Total
Bezerros	33/125	33/140	32/150	36/134	134/549
Vacas	13/133	14/150	12/150	13/120	52/553
Total	46/258	47/290	49/254	44/300	186/1102

* número de infectados/ total de carrapatos examinados