



# A PRODUÇÃO ANIMAL E O FOCO NO AGRONEGÓCIO

42ª Reunião Anual da SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECIA

25 a 28 de Julho de 2005 - Goiânia, Goiás

[Voltar](#)

## DETECÇÃO MOLECULAR DE "BABESIA BIGEMINA" EM BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS<sup>1</sup>

MÁRCIA CRISTINA DE SENA OLIVEIRA<sup>2</sup>, LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO<sup>3</sup>, MAURÍCIO MELLO DE ALENCAR<sup>3</sup>, ANA MARY DA SILVA<sup>3</sup>, HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA<sup>4</sup>, THALITA ATHIÊ NÉO<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Projeto financiado pelo CNPq

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz km 234, São Carlos, SP. marcia@cppse.embrapa.br.

<sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste.

<sup>4</sup> FMVZ/UNESP-Botucatu

<sup>5</sup> Aluna de graduação UNIARA

**RESUMO** A taxa de infecção por "Babesia bigemina" foi estudada em bovinos de diferentes grupos genéticos, criados em área endêmica do estado de São Paulo. Amostras de sangue obtidas de 213 animais (52 Nelore, 55 Canchim/Nelore, 54 Angus/Nelore e 52 Simental/Nelore) foram utilizadas para confecção de esfregaços, determinação do hematócrito e para extração de DNA. Os esfregaços de sangue foram fixados, corados com Giemsa e examinados em microscópio óptico. Todas as amostras de DNA foram submetidas a amplificação pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e "Nested"-PCR usando "primes" específicos para "Babesia bigemina". Pelo exame microscópico foram detectadas parasitemias somente nos animais mais jovens (até 15 meses), sendo quatro em Nelore (11,8%), um em Canchim/Nelore (3,0%), dois em Angus/Nelore (11,8) e dois em Simental/Nelore (6,5%), não sendo significativa a diferença entre os animais Nelore e cruzados. Não foram observados sinais clínicos de babesioses assim como qualquer associação entre a presença de hemoparasitas e os valores de hematócrito. Utilizando-se a técnica de amplificação do DNA parasitário, foram verificadas taxas de infecção de 96,1% para o grupo Nelore, 98,2% para o Canchim/Nelore, 87% para o Angus/Nelore e 90% para o Simental/Nelore, não havendo diferenças significativas em função da idade ou raça dos animais.

**PALAVRAS-CHAVE** Suscetibilidade genética, babesioses, bovinos, PCR, "Nested" PCR

MOLECULAR DETECTION OF "BABESIA BIGEMINA" INFECTION IN CATTLE OF DIFFERENT GENETIC GROUPS

**ABSTRACT** The infection rate for "Babesia bigemina" was estimated in cattle of different genetic groups reared in a endemic area of São Paulo State. Blood samples obtained from 213 animals were used for perform thick blood films, determination of packed cell volume (PCV) and for DNA extraction. Thick blood films were fixed, stained by Giemsa and examined in an optical microscope. All of the DNA samples were submitted to amplification by Polimerase Chain Reaction (PCR) and Nested-PCR methods using specific primers for and "B. bigemina". Babesia merozoites were only detected in young animals. Clinical signs of babesiosis were not observed as well any association between the presence of hemoparasites and PCV values. Analysis of PCR and N-PCR blood products reveled infections rates of 96,1% for Nelore group,

98,2% for Canchim/Nelore, 87% for Angus/Nelore and 90% for Simental/Nelore. The infection rates did not differed significantly among genetic groups or age of the animals.

**KEYWORDS** Breed susceptibility, babesiosis, cattle, PCR, "nested" PCR

## INTRODUÇÃO

A babesiose bovina é considerada a doença de maior impacto econômico entre as que acometem bovinos criados em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Guglielmone, 1997). A utilização de animais de raças zebuínas tem sido uma alternativa para minimizar os prejuízos provocados por esses parasitas. Animais puros "Bos indicus" são muito resistentes a "B. bigemina" e relativamente resistentes a "B. bovis". No entanto animais cruzados "Bos taurus"/ "Bos indicus" podem sofrer risco severo de mortalidade quando expostos a cepas virulentas (Bock et al., 1997). Os métodos de diagnósticos normalmente utilizados não são adequados para determinar a prevalência de portadores entre os animais assintomáticos, razão pela qual não existem no Brasil dados relativos à prevalência desse protozoário entre os animais dos diversos grupos genéticos explorados para produção de carne. Técnicas de amplificação de DNA têm se mostrado altamente sensíveis para esse fim, detectando parasitemias da ordem de 0,00000017% (Oliveira-Sequeira et al., 2005). Dessa maneira o presente trabalho foi delineado, com o propósito de investigar as diferenças nas taxas de infecção por "Babesia bigemina" em bovinos da raça Nelore e seus cruzamentos com raças taurinas, em faixas etárias onde normalmente não ocorrem manifestações clínicas da doença, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas amostras de sangue de 212 fêmeas, sendo 52 da raça Nelore, 55 cruzadas Canchim/Nelore, 52 Simental/Nelore e 53 Angus/Nelore com idades variando entre 8 e 72 meses. Esfregaços de sangue periférico corados com Giemsa, foram examinados em microscópio para pesquisa de hemoparasitas. O volume globular foi determinado por meio da técnica de microhematócrito. A extração de DNA das amostras de sangue foi feita empregando-se o kit para extração GFX (Amersham Biosciences) e as reações de PCR e N-PCR foram realizadas empregando-se "primers" específicos para "Babesia bigemina" (Figuroa et al.1993). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio e visualizados em transiluminador UV. Foram consideradas positivas as amostras cujos fragmentos amplificados apresentaram tamanho aproximado de 278 pb. As amostras negativas foram submetidas a uma segunda reação ("Nested"-PCR) bem mais sensível e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram à eletroforese fragmentos com 170 pb. A análise estatística foi realizada utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas SAS (1996), sendo utilizados o teste exato de Fischer para determinar as associações entre taxas de infecção e raça e o procedimento GLM para determinar o efeito da infecção sobre o hematócrito. Para fins de análise os animais foram separados por faixa etária em três grupos: até 15 meses; entre 16 e 40 meses; e mais que 40 meses.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo exame microscópico foram detectadas parasitemias somente nos animais mais jovens (até 15 meses), sendo quatro em Nelore (11,8%), um em Canchim/Nelore (3,0%), dois em Angus/Nelore (11,8) e dois em Simental/Nelore (6,5%), não sendo significativa a diferença entre os animais Nelore e cruzados. Não foram observados sinais clínicos de babesioses assim como qualquer associação entre a presença de hemoparasitas neste exame e os valores de hematócrito. Talvez devido ao pequeno número de animais positivos no exame microscópico.

A Tabela 1 apresenta os resultados da taxa de infecção por “Babesia bigemina” de acordo com os resultados do exame molecular para os animais da primeira e segunda classes de idade. Os animais acima de 40 meses foram eliminados das análises devido à irregularidade da distribuição por raça. Verifica-se na tabela que pelo exame de menor sensibilidade (PCR) as taxas de infecção ficam próximas de 55% para o Nelore, 41% para o Canchim/Nelore e 27% para os outros dois cruzamentos. A análise estatística mostrou associação significativa entre grupo genético e taxa de infecção ( $p < 0,05$ ). A segunda reação (N-PCR), detecta níveis de parasitemia mais baixos e foi aplicada apenas aos animais negativos na primeira análise. Acumulando com os resultados da primeira reação, os resultados mostram uma proporção semelhante ( $p > 0,05$ ) de animais infectados em todos os grupos genéticos (96,1% para o grupo Nelore, 98,2% para o Canchim/Nelore, 87% para o Angus/Nelore e 90% para o Simental/Nelore). Sendo a probabilidade de detecção no PCR proporcional a presença do parasita no sangue, este resultado parece indicar que a parasitemia é maior quando mais genes zebuínos estão presentes no animal. Dessa maneira, parece que a maior resistência às babesias verificada por Bock et al.(1997) nesse grupo genético, não é consequência de menor parasitemia.

Os animais positivos na primeira reação (PCR) apresentavam valores de hematócrito significativamente menores que os animais negativos (37,28% vs 39,13%). Não houve efeitos de idade e grupo genético para este parâmetro, e tampouco houve efeito significativo da interação entre grupo genético e diagnóstico, indicando que a influência foi semelhante em todos os grupos genéticos. Quando foram comparados animais positivos e negativos na segunda reação (resultado acumulado), não foram verificadas diferenças significativas. Mas neste caso, o número de animais negativos era muito pequeno.

Estes resultados parecem sugerir que embora nas faixas etárias estudadas os animais não apresentem sintomas clínicos com frequência, a prevalência do parasita é muito alta, e mesmo não sem casos clínicos os animais zebuínos e seus cruzamentos podem ter seu desenvolvimento prejudicado devido a esta parasitose. Estudos posteriores utilizando métodos que permitam quantificar de maneira mais precisa a parasitemia por babesias poderão elucidar os efeitos deste parasita sobre o desenvolvimento dos animais.

## CONCLUSÕES

Não existem diferenças na prevalência da infecção por “Babesia bigemina” entre os diversos grupos genéticos estudados. Apesar de serem mais resistentes às babesioses os zebuínos são infectados, permanecem portadores e sofrem efeitos da parasitemia quando criados em um área endêmica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GUGLIELMONE, A.A.. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**. v.57, p.109-119, 1997.

2. BOCK, R.; DEVOS, A.J.; KINGSTON, T.G. et al. 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.
3. OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.; OLIVEIRA, M. C. S.; ARAUJO JR. et al. **Erro! Indicador não definido.**
4. FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON. G.S. et al. **Erro! Indicador não definido.**
5. SAS, Institute Inc. SAS/STAT. User's Guide, version 6.11, 4 ed., v.2, Cary: SAS Institute INC., 1996. 842p.

Tabela 1 – Taxas de infecção por “*Babesia bigemina*” determinadas pelo exame molecular de acordo com o grupo genético para animais entre oito e 40 meses de idade.

Diagnóstico	Grupo Genético				Total
	Nelore	Can/Nel	Angus/Nel	Sim/Nel	
N	2 (4,1%)	0 (0,0%)	1 (2,5,0%)	5 (12,8%)	8 ( 3,0%)
PCR	27 (55,1%)	16 (41,0%)	10 (25,0%)	12 (30,8%)	65 (38,2%)
NPCR	20 (40,8%)	23(59,0%)	29 (72,5%)	22 (56,4%)	94 (56,3%)
Total	49	39	40	39	167