

IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Estimativa do Nível de Infecção por *Babesia bigemina* Utilizando a qPCR em Bovinos de Corte de Diferentes Grupos Genéticos¹

Talita Barban Bilhassi², Manuela Pires Monteiro da Gama³, Rodrigo Giglioti⁴, Adriana Mércia Guaratini Ibelli⁵, Márcia Cristina de Sena Oliveira⁶, Henrique Nunes de Oliveira⁷

¹Parte da Dissertação de Mestrado do Primeiro Autor

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

³Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal - FCAV/UNESP-Jaboticabal. Bolsista CNPq

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

⁵Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução - UFSCAR-São Carlos. Bolsista CAPES

⁶Pesquisadora da Embrapa 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 que possibilitasse estimar o nível de infecção por de *Babesia bigemina* em bovinos de corte de três grupos genéticos e faixas etárias diferentes. Foram colhidas amostras de sangue de 149 animais, criados em regiões endêmicas para as babesioses. Após a extração do DNA, foi realizada a técnica de qPCR em todos os indivíduos. A curva padrão foi elaborada a partir da purificação e quantificação dos produtos de PCR. A análise estatística foi realizada com os dados transformados por logaritmos, empregando-se o programa computacional Statistical Analysis System v.9.1 (SAS). A metodologia empregada não permitiu estimar o nível de infecção na raça Nelore, entretanto, para animais Angus e cruzados, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) em nível de infecção entre grupos genéticos e categorias etárias estudadas.

Palavras-chave: bovinos, hemoparasita, suscetibilidade

Estimated Level of *Babesia bigemina* Infection Using qPCR in Beef Cattle of Different Genetic Groups

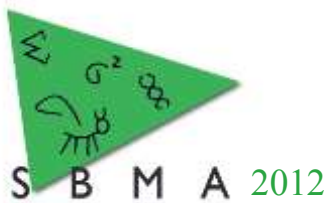
Abstract: The objective of this study was to standardize a protocol for quantification of *Babesia bigemina* that would enable to estimative the level of infection in cattle from three genetic groups and different age groups. Were collected blood samples from 149 animals in regions endemic for babesiosis. After DNA extraction was performed qPCR technique in all subjects. 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). The methodology employed did not estimate the level of infection in the Nelore breed, however, for animals Angus and crossbred, significant differences were observed ($P < 0,05$) in level of infection among genetic groups and age categories studied.

Keywords: beef cattle, haemoparasite, susceptibility

Introdução

A bovinocultura de corte é uma atividade econômica de grande importância para o agronegócio brasileiro. No entanto, as enfermidades parasitárias são consideradas fatores que limitam o seu desenvolvimento nas regiões dos trópicos. No Brasil, a *Babesia bovis* e a *Babesia bigemina*, são os agentes etiológicos das babesioses bovinas e causam enormes prejuízos aos produtores devido às restrições quanto à introdução de animais *Bos Taurus*, considerados mais sensíveis tanto ao vetor, o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, quanto aos hemoparasitas. Estas restrições constituem-se num obstáculo à intensificação e aumento da produtividade da pecuária nacional.

A maior resistência dos *Bos indicus* e animais oriundos de cruzamentos com *Bos taurus* à essas doenças tem sido verificada, constituindo-se numa área de pesquisa de grande interesse em



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

melhoramento genético e parasitologia veterinária (Jonsson et al., 2008). A identificação de animais e raças mais resistentes pode ajudar no desenvolvimento de estratégias de melhoramento que visem o aumento da resistência genética dos rebanhos, possibilitando a maximização da produção na pecuária. Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar um protocolo de quantificação que possibilitasse a estimativa do nível de infecção por *Babesia bigemina* em bovinos de corte de grupos genéticos e faixas etárias diferentes.

Material e Métodos

Foram utilizados 149 animais, sendo 74 bezerros e 75 vacas de três grupos genéticos diferentes (puros *Bos indicus*, $\frac{1}{2}$ *Bos indicus* + $\frac{1}{2}$ *Bos taurus* e puros *Bos taurus*), criados em regiões endêmicas para as babesioses. Foram colhidas amostras de sangue da veia jugular, sendo o DNA extraído com o Kit DNA Easy (Invitrogen) de acordo com as informações do fabricante, porém com algumas modificações. Posteriormente, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação pela técnica de qPCR, utilizando sequências iniciadoras específicas para *B. bigemina*. O protocolo empregado para estimar a quantidade de cópias do DNA do parasita nas amostras foi uma adaptação daquela descrita por Buling et al. (2007). A qPCR foi realizada com Power Sybr Master Mix (Applied Biosystems), com volume final de 15 μ L e DNA na concentração de 10 ng. As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 2 minutos, 54°C por 0,30 segundos, 60°C por 30 segundos, seguidas da curva de dissociação de 60°C 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 estimativa da quantidade de cópias/amostra de sangue, a seguinte fórmula foi utilizada: quantidade (cópias/ μ L) = $10^{(Cq-b)/m}$, onde b é o intercepto e m é o coeficiente de angulação da reta. A análise estatística foi realizada com os dados transformados em log, utilizando-se o programa computacional Statistical Analysis System v.9.1 (SAS), por meio da utilização do PROC GLM e PROC UNIVARIATE, considerando os efeitos de grupo genético, categoria animal e interação grupo genético vs categoria animal.

Resultados e Discussão

A Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) possibilitou a estimativa do nível de infecção por *B. bigemina*, em bovinos da raça Angus e em animais cruzados, entretanto, não foi possível estimar o nível de infecção no Nelore, devido provavelmente à pequena quantidade de DNA alvo presente nas amostras. A curva de regressão linear apresentou o coeficiente de angulação de -3,15 e coeficiente de determinação de 0,98 indicando boa padronização dos primers e ótima qualidade das amostras de DNA, conforme a figura 1.

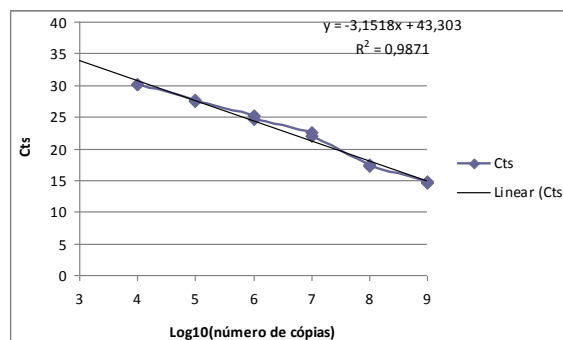
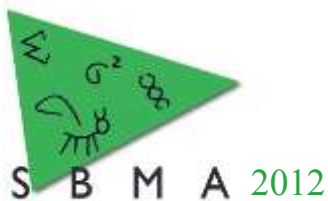


Figura 1. Curva padrão obtida a partir da regressão linear para *B. bigemina*.



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Os DNAs de bovinos Angus e cruzados foram avaliados por qPCR e a análise estatística do nível de infecção estimado pelo número de cópia de DNA alvo presentes nas amostras, mostrou diferenças significativas ($P < 0,05$) para os três fatores considerados: grupo genético, categoria e a interação entre ambos. Os resultados observados por esta técnica molecular mostraram ainda que a taxa de infecção por *B. bigemina* para os 99 animais considerados foi de 100%. A quantidade de DNA alvo destes hemoparasitas em bezerros foi superior ao detectado em vacas ($P < 0,05$). Os animais cruzados apresentaram menor nível de infecção quando comparado com Angus, que por sua vez, mostraram alta suscetibilidade às infecções por babesias, conforme a Tabela 1. É interessante notar que as diferenças entre os grupos genéticos nos bezerros foram maiores que nas vacas, evidenciando o efeito da interação.

Tabela 1. Médias dos quadrados mínimos do logaritmo (base 10) do número de cópias de DNA alvo de *Babesia bigemina* obtidos pela técnica de qPCR e respectivos erros padrão, de acordo com os grupos genéticos e categorias.

Cruzado	Bezerro	Vaca	Média
Angus	4,80 ^{a,A} ± 0,17	3,58 ^{a,B} ± 0,15	4,18 ^a ± 0,11
Cruzado	3,62 ^{b,A} ± 0,15	3,32 ^{a,A} ± 0,15	3,47 ^b ± 0,11
Média	4,20 ^A ± 0,11	3,45 ^B ± 0,11	

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas e letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem significativamente ($P < 0,05$).

Estes resultados mostraram que animais cruzados apresentaram um nível de infecção menor quando comparados aos puros Angus, que por sua vez mostraram maior suscetibilidade às infecções por *B. bigemina*, especialmente nos animais jovens.

Com relação à idade, embora os bezerros sejam considerados a categoria menos suscetível dentre os animais do rebanho, inúmeros casos clínicos foram registrados nesta faixa etária. A ocorrência da forma clínica das babesioses nos animais jovens pode ser explicada pela queda na imunidade passiva, que ocorre a partir do 28º dia após o nascimento (Madruga et al., 1984). Desta maneira, é imprescindível que os mesmos sejam expostos aos carrapatos desde o nascimento, estimulando o sistema imunológico por meio das inoculações dos agentes infecciosos.

Conclusões

Os resultados obtidos nos permitem concluir que existe diferença no nível de infecção dos bovinos dos diferentes grupos genéticos e categorias observadas. Os níveis elevados de infecção em animais da raça Angus demonstram a suscetibilidade deste grupo genético aos agentes das doenças, sendo que Nelore e cruzados apresentam alta e moderada resistência, respectivamente. Existe a perspectiva que futuramente haja a possibilidade de selecionarmos animais resistentes às babesioses baseando-se no nível de infecção dos bovinos.

Literatura citada

- 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 cyclers real time RT-PCR for detection of avian reovirus. *Journal of Virological Methods*, 6-13, 2006.
- JONSSON, N.N.; BOCK, R.E.; JORGENSEN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesioses on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet. Parasitol.*, v. 155, p.1-9, 2008.
- MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; KESLLER, R.H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEIREDO, G. R.; CURVO, J. B. E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.19, p.1163-1168, 1984.
- SAS, Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, version 6.11, 4ed., v.2, Cary, SAS Institute Inc., 842p, 1996.