

Detecção de *Babesia bigemina* por PCR



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 65

Detecção de *Babesia bigemina* por PCR

*Magda Vieira Benavides
Ana Maria Sastre Sacco
Fernanda Fernandez Muñoz Delabary
Maria Elizabeth Aires Berne*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul
BR 153, km 603 - Caixa Postal 242
96401-970 - Bagé, RS
Fone/Fax: (0XX53) 3242-8499
<http://www.cppsul.embrapa.br>
sac@cppsul.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Alexandre Varella

Secretário-Executivo: Ana Maria Sastre Sacco

Membros: Eduardo Salomoni, Eliane Mattos Monteiro,
Eliara Freire Quincozes, Graciela Olivella Oliveira,
João Batista Beltrão Marques, Naylor Bastiani Perez,
Magda Vieira Benavides

Supervisor editorial: Comitê Local de Publicações - Embrapa Pecuária Sul

Tratamento de ilustrações: Gráfica Instituto de Menores

Editoração eletrônica: Gráfica Instituto de Menores

Fotos da capa: Magda Vieira Benavides

1ª edição

1ª impressão (2007): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sul

Detecção de Babesia bigemina por PCR / M. V. Benavides, A. M. S. Sacco, F. F. Muñoz, M. E. A. Berne. _ Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2007.

24p. _ (Embrapa Pecuária Sul. Documentos; 65).
ISSN 0103-376X

1. Bovino. 2. Parasito de animal. 3. Babesiose. 4. Tristeza parasitaria.
I. Sacco, A. M. S. II. Muñoz, F. F. III. Berne, M. E. A. IV. Título. V. Série.

CDD 636.0896

Autores

Magda Vieira Benavides

Zoot., PhD, Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Caixa Postal 242, Bagé-RS, CEP 96401-970, (0XX53) 3242-8499, magda@cppsul.embrapa.br

Ana Maria Sastre Sacco

Méd. Vet., Dr., Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Caixa Postal 242, Bagé-RS, CEP 96401-970, (0XX53) 3242-8499, anasacco@cppsul.embrapa.br

Fernanda Fernandez Muñoz Delabary

Méd. Vet., MSc.

Maria Elizabeth Aires Berne

Méd. Vet., Dr., Professora Titular do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFPel, Campus Universitário s/nº, Caixa Postal 354, Pelotas-RS, CEP 96010-900, bernemea@ufpel.tche.br

Apresentação

O Rio Grande do Sul é um Estado com grande vocação pecuária, tendo um rebanho bovino de mais de 12 milhões de cabeça.

Este rebanho é composto por 10 milhões de gado de corte e, 2 milhões de gado leiteiro segundo estimativas de técnicos de campo. O diferencial deste rebanho em relação aos outros Estados do país é a alta qualidade das raças europeias de corte como Hereford e Aberdín Angus, e cruzamentos entre si, com Zebuínos e sintéticos como Braford e Brangus, que são constituídos de 2/3 europeu e 1/3 Zebuíno.

De forma geral estas populações são sensíveis ao complexo Tristeza Parasitária transmitida pelo carrapato, que ocasiona grandes perdas economicas.

Diagnósticos veterinários devem estar sempre em evolução e dentre as técnicas moleculares se destaca a PCR por sua especialidade e sensibilidade.

Roberto Silveira Collares
Chefe Geral do CPPSUL

Sumário

Introdução	9
Desenvolvimento da técnica	11
Conclusão	16
Referências	17

Detecção de *Babesia bigemina* por PCR

Magda Vieira Benavides

Ana Maria Sastre Sacco

Fernanda Fernandez Muñoz Delabary

Maria Elizabeth Aires Berne

Introdução

A *Babesia bigemina* é um protozoário que parasita as hemácias dos bovinos e que é transmitido pelo carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus*. Este hemoparasito, junto com a *Babesia bovis* e o *Anaplasma marginale*, faz parte do complexo Tristeza Parasitária Bovina, que provoca perdas produtivas e alta mortalidade em rebanhos sensíveis (McCOSKER, 1981; WRIGHT, 1991).

O desenvolvimento de técnicas moleculares para o eficiente diagnóstico de animais infectados por *B. bigemina* tem sido um dos focos de pesquisa dos Laboratórios de Hemoparasitologia e de Genética Animal da Embrapa Pecuária Sul e tem por objetivo futuros estudos epidemiológicos da babesiose na Região Sul do Brasil.

A detecção da *B. bigemina* é facilmente obtida em animais com doença clínica através da técnica de esfregaço sangüíneo, onde são observadas hemácias parasitadas em microscópio óptico. No entanto, esta técnica não é sensível o suficiente para detectar o parasito em animais recentemente infectados ou em animais com infecção crônica (portadores sadios).

Nos animais recentemente infectados, a parasitemia é extremamente baixa até o 5º dia pós-inoculação, portanto com poucas chances de detecção através do esfregaço sangüíneo. Este método tampouco é eficiente na detecção de portadores sadios.

Os estudos epidemiológicos são baseados na constatação da presença (ou não) do agente em animais que podem ser portadores sadios (ou não). E é realizada através de métodos que identifiquem o patógeno nestes animais, como por exemplo, o teste de subinoculação. Este teste consiste na inoculação de sangue de animais de campo (doador) em animais sensíveis e esplenectomizados (receptor): quando o receptor apresenta o quadro clínico da doença, indica que o doador é portador sadio. Este teste, além de ser extremamente laborioso e caro, exige a realização de esplenectomia nos animais, o que o limita para estudos amplos de epidemiologia.

Além deste teste, a constatação da presença do agente em animais portadores é realizada rotineiramente através de exames que detectem a presença de anticorpos específicos no soro, tais como a IFI (imunofluorescência indireta) e ELISA ('enzyme-linked immunosorbent assay'). Estes testes, porém, não detectam diretamente a presença do parasito, mas sim, se os animais desenvolveram resposta imune, o que, indiretamente, indica que os animais são portadores do agente ou já tiveram contato com este. Estes testes detectam a presença de anticorpos específicos para *Babesia* em bovinos a partir de 14 dias de infecção, mesmo em animais com baixa parasitemia.

O teste de IFI é o teste de imunodiagnóstico utilizado há mais tempo, tendo servido de base a grande maioria dos estudos epidemiológicos realizados até o momento, mas possui as desvantagens de não ser absolutamente sensível e específico e ser extremamente laborioso. Por outro lado, o teste de ELISA é um teste automatizado, porém possui a desvantagem de difícil obtenção de antígenos padronizados.

Considerando o exposto, o único teste capaz de detectar a presença do parasito vivo nos animais portadores sadios é o teste de subinoculação. No entanto, considerando a impossibilidade do uso deste em larga escala, como em estudos epidemiológicos, tem-se a necessidade de desenvolver técnicas laboratoriais que permitam esta identificação, como a PCR

(reação em cadeia de polimerase), uma técnica molecular que identifica a presença de determinados agentes através do seu DNA.

Diagnósticos veterinários que utilizam técnicas moleculares tiveram um rápido avanço nos últimos 15 anos, embora a pesquisa é quem mais tenha se beneficiado destas novas tecnologias (COMES et al., 1996). Dentre as técnicas moleculares se destaca a PCR por sua sensibilidade e especificidade. Amplificação de fragmentos de DNA do parasito podem ser obtidos de pequenas quantidades de DNA possibilitando assim um diagnóstico direto. Esta técnica também permite rapidez em estudos epidemiológicos (BÖSE et al., 1995). O teste de PCR já é utilizado como método de rotina na identificação de outros agentes como os causadores da tuberculose, leptospirose e leucose (AZAMBUJA et al., 1994) e do mal de Chagas (CARRIAZO et al., 1998).

Dando continuidade a um trabalho de identificação de animais portadores sadios através da técnica de PCR, já realizado com *B. bovis* (BENAVIDES et al., 2001), foi desenvolvido um experimento na Embrapa Pecuária Sul com o objetivo de testar a possibilidade desta identificação em infecções por *B. bigemina*.

Desenvolvimento da técnica

O experimento foi realizado utilizando 22 bovinos divididos nos seguintes grupos:

1. Portadores sadios de *B. bigemina*. Oito bovinos de campo, animais vacinados com cepa atenuada de *B. bigemina* nove meses antes do início deste experimento. Estes animais eram de aproximadamente um ano de idade, sem sintomatologia clínica de tristeza parasitária bovina.
2. Receptores de subinoculação do grupo 1. Oito terneiros sensíveis esplenectomizados.
3. Controle positivo de *B. bigemina* (portador clínico). Dois terneiros sensíveis, esplenectomizados, inoculados com 1×10^7 eritrócitos parasitados por *B. bigemina*.
4. Controle negativo. Dois bovinos sensíveis - não portadores de *Babesia* spp. Resultado negativo em teste de subinoculação em terneiro esplenectomizados.
5. Receptores de subinoculação do grupo 4. Dois terneiros sensíveis esplenectomizados.

Nos diagramas 1 e 2 estão apresentadas as coletas realizadas. O diagrama 3 mostra os controles positivos, bem como o teste de subinoculação realizado para confirmar os controles negativos.

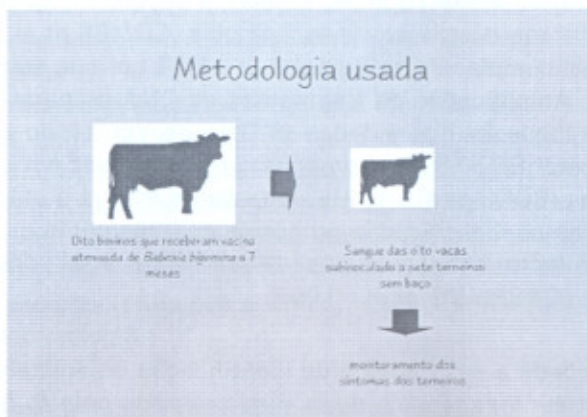


Diagrama 1. Metodologia desenvolvida.

A confirmação da condição de bovinos portadores sadios e negativos (grupos 1 e 4) foi realizada através da subinoculação de 500ml de sangue de cada um destes animais em terneiros sensíveis esplenectomizados (grupos 2 e 5). Os animais inoculados e subinoculados (grupos 2, 3 e 5) foram monitorados quanto aos parâmetros de determinação de temperatura retal, volume globular e nível de parasitemia, do início até 21 dias após cada infecção, para verificar o desenvolvimento de sintomatologia clínica.

A coleta de sangue foi realizada por punção da jugular para a posterior extração de DNA e para obtenção de soro. Para a realização da técnica de PCR foram utilizadas amostras de sangue dos animais do grupo 3 (durante a fase clínica de cada infecção) e dos grupos 1 e 4. Para a realização da técnica de IFI foram utilizadas amostras de soro dos animais dos grupos 1, 3 e 4 aos 15, 30 e 60 dias após a fase clínica de cada infecção.

A parasitemia foi determinada através da análise de esfregaços de sangue periférico corados com Giemsa-May Grünwald. A sorologia foi

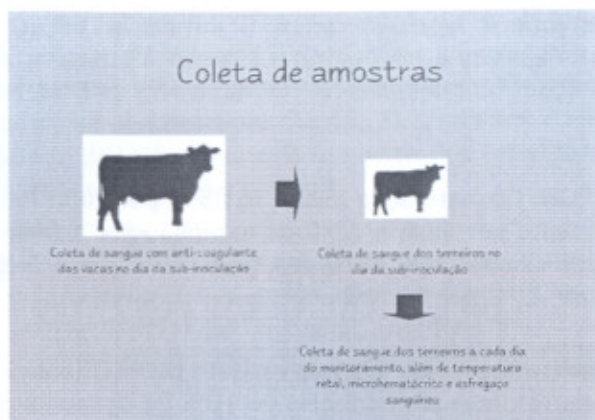


Diagrama 2. Coleta de amostras.

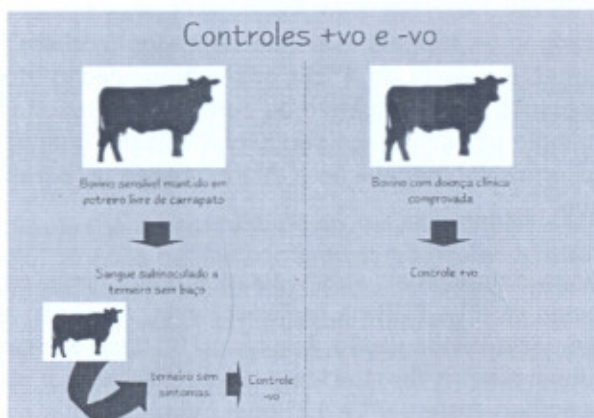


Diagrama 3. Controles positivo e negativo.

realizada pelo teste de imunofluorescência indireta (IICA, 1987) nos soros dos receptores nos períodos de subinoculação e pós-subinoculação.

Reação de PCR. Cada reação foi composta de 2,5U de Taq DNA polimerase, 1,5mM MgCl₂, 1X de tampão de PCR, 200μM dNTPs, 20ng de DNA genômico, 0,32μM de cada um dos primers (forward e reverse) e água estéril até completar 25μl de volume de reação final. Os primers

usados para detectar *B. bigemina* foram: 5' cat cta att tct ctc cat acc cct cc 3' (BilA), Figueroa et al. (1993) e 5' aaa ttc ctc ggc ttc aac tct gag 3' (BilB5 - seqüência desenhada). O fragmento de DNA amplificado foi de 288bp.

Condições de PCR. Desnaturação inicial de 95°C por 2min (hot-start), 55°C de anelamento por 1min e 73°C de extensão por 1,5min, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 1min, 55°C por 1min, 73°C por 1,5min e extensão final de 73°C por 15min.

Condições de eletroforese. Os 25µl de produto de PCR foram submetidos a eletroforese em mini-géis de 10% de poliacrilamida, a 10W por 30min e os géis foram analisados após coloração com nitrato de prata. O marcador molecular de 100bp DNA ladder foi usado para conferir o tamanho dos fragmentos amplificados.

Amostras de sangue de animais esplenectomizados também foram retiradas diariamente a partir do 4º dia pós-subinoculação (dpsi) até tratamento específico com o objetivo de comparar os resultados de PCR com os de detecção por esfregaço sangüíneo e assim quantificar o número de dias entre subinoculação e aparecimento do parasito no animal infectado.

A comprovação que os animais subinoculados eram sensíveis foi obtida através dos testes de IFI e PCR na esplenectomia. A reação ao desafio por *B. bigemina*, via subinoculação, iniciou no 6º dpsi. Somente 50% dos animais subinoculados mostraram parasitemias altas e receberam tratamento específico entre o 7º e 12º dpsi a fim de evitar perdas por morte. A variação de parasitemia nestes animais foi desde mera presença no esfregaço (parasitemia patente) até 7,8% de eritrócitos parasitados. Durante o desafio, o hematócrito teve redução de até 61,3% e a temperatura retal aumentou até 3,2°C. A soroconversão dos receptores foi observada através das altas titulações nos níveis de IgG anti-*B. bigemina*.

Embora somente 50% dos terneiros tenham mostrado parasitemia, os resultados de PCR dos terneiros subinoculados ao longo do monitoramento do desafio mostraram que 100% destes terneiros estavam parasitados por *B. bigemina*.

Das portadoras com PCR-positivo no dia da subinoculação (5/8; 62,5%), todas confirmaram o estado de portador sadio através do resultado de PCR-positivo de seus receptores (Tabela 1). Outro resultado interessante foi a capacidade da PCR detectar a presença dos parasitos em até 5 dias antes do aparecimento de parasitemia.

Tabela 1. Performance dos animais doadores e seus receptores nos testes de subinoculação para esfregaço sangüíneo e PCR.

Bovinos doadores		Receptores		Ocorrência
PCR no dia subinoculação	PCR no dia subinoculação	Parasitemia pós subinoculação	PCR pós subinoculação	
+	-	alta	+	3/8
+	-	-	+	2/8
-	-	-	+	3/8

Neste trabalho foi realizada a comparação dos resultados pela técnica de PCR com os da subinoculação em animais esplenectomizados, teste considerado padrão para a detecção de *Babesia* spp. em animais portadores sadios. Considerando as desvantagens da prova de subinoculação, como a necessidade de utilizar animais esplenectomizados e custo, se fazia necessário a disponibilidade de outra técnica que não apresentasse estes fatores negativos. A idéia de usar o teste de PCR para identificar a presença de parasitos foi primeiramente sugerida por Fahrimal et al. (1992), Figueroa et al. (1992) e Azambuja et al. (1994), porém nunca havia sido testada em cepas de *Babesia* spp. da região Sul do Brasil.

Os resultados mostraram que a PCR foi incapaz de detectar o estado de portador sadio em 3/8 (37,5%) dos animais. O uso de uma só amostra de sangue pode ter sido a causa deste insucesso, uma vez que o resultado da PCR depende exclusivamente da presença de DNA na amostra inicial e, como em portadores sadios a parasitemia é extremamente baixa, é possível que quantidade de amostra coletada não tenha sido suficiente para extrair o DNA do parasito. É necessário esclarecer que, mesmo que o DNA extraído seja visualizado em gel de agarose, é possível que DNA genômico de bovino também tenha sido

extraído junto na amostra, uma vez que é impossível excluir completamente a presença de leucócitos bovinos. Uma forma de evitar este problema, talvez seja a coleta de uma quantidade maior de volume de sangue e a extração de DNA de todo o pellet de hemácias.

Outro fato de interesse é a não detecção de parasitemia patente durante o processo de subinoculação em 4/8 (50%) dos terneiros receptores. Este fato pode ter sido devido a uma resposta subclínica que dificilmente é detectada em esfregaço sangüíneo, mas foi detectada pela PCR. Vale a pena ressaltar que se o teste de PCR não tivesse sido realizado nos receptores na fase de pós-subinoculação, as vacas doadoras de sangue destes animais teriam sido consideradas como não portadoras. Outra possível explicação pode ter sido a existência de variação na resistência genética dos hospedeiros com relação aos parasitos que pode ter resultado em diferenças nas respostas individuais ao processo de subinoculação.

Embora o processo de subinoculação com 500ml de sangue seja considerado como teste padrão para a detecção de portadores sadios (CALLOW, 1967), Löhrr (1972) discute que este procedimento ainda possa ter resultados variáveis.

Este resultado sugere que a PCR é mais sensível que a subinoculação e pode ser utilizado como teste de rotina na identificação de animais portadores sadios, ainda que haja necessidade de maior padronização desta técnica.

Conclusão

A identificação de animais portadores sadios para *Babesia bigemina* através da técnica de PCR foi possível em 62,5% das doadoras estudadas. Ajustes na metodologia deverão ser realizados para atingir uma maior taxa de sucesso na detecção deste parasito.

Referências

- AZAMBUJA, C. J.; GAYO, V.; SOLARI, M.; SUAREZ, M.; STOLL, M. Biotechnology applied to the detection of infectious agents in cattle: diagnosis of *Babesia bovis* by PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 1-4, fev. 1994.
- BENAVIDES, M. V.; SACCO, A. M. S.; WEIMER, T. A.; VALENTE, P. D.; FRANCK, B. M. Identificação de bovinos portadores sadios de *Babesia* spp. através da técnica de PCR. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2001. 22 p. (Embrapa Pecuária Sul. Documentos, 30).
- BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; DE VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 57, p. 61-74, Mar. 1995.
- CALOW, L. L. Sterile immunity, co-infectious immunity and strain differences in *Babesia bigemina* infections. **Parasitology**, New York, v. 57, n. 3, p. 455-465, 1967.
- CARRIAZO, C. P. S.; SEMBAJ, A. P.; AGUERRE, A. M.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; BUÁ, J.; RUIZ, A.; SEGURA, E.; BARRAL, J. M. Polymerase chain reaction to detect *Trypanosoma cruzi* and blood samples from chronic chagasic patients. **Diagnostic Microbiology Infections Disease**, New York, v. 30, n. 3, p. 183-186, Mar. 1998.
- COMES, A. M.; HUMBERT, J. F.; CABARET, J.; ELARD, L. Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. **Veterinary Research**, Paris, v. 27, n. 4-5, p. 333-342, 1996.
- FAHRIMAL, Y.; GOFF, W. L.; JASMER, D. P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 6, p. 1374-1379, June 1992.
- FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.

30, n. 10, p. 2576-2582, Oct. 1992.

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**, Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 69-81, Oct. 1993.

IICA. **Técnicas para el diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis bovina**. 2. ed. San José, Costa Rica: IICA, 1987. 79 p.

LÖHR, K. F. Immunity to *Babesia bigemina* in experimentally infected cattle. **Journal of Protozoology**, Lawrence, v. 19, n. 4, p. 658-660, 1972.

McCOSKER, P. J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M.; KREIER, J. P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 1-24.

WRIGHT, I. G. Towards a synthetic *Babesia* vaccine. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 155-159, Apr. 1991.