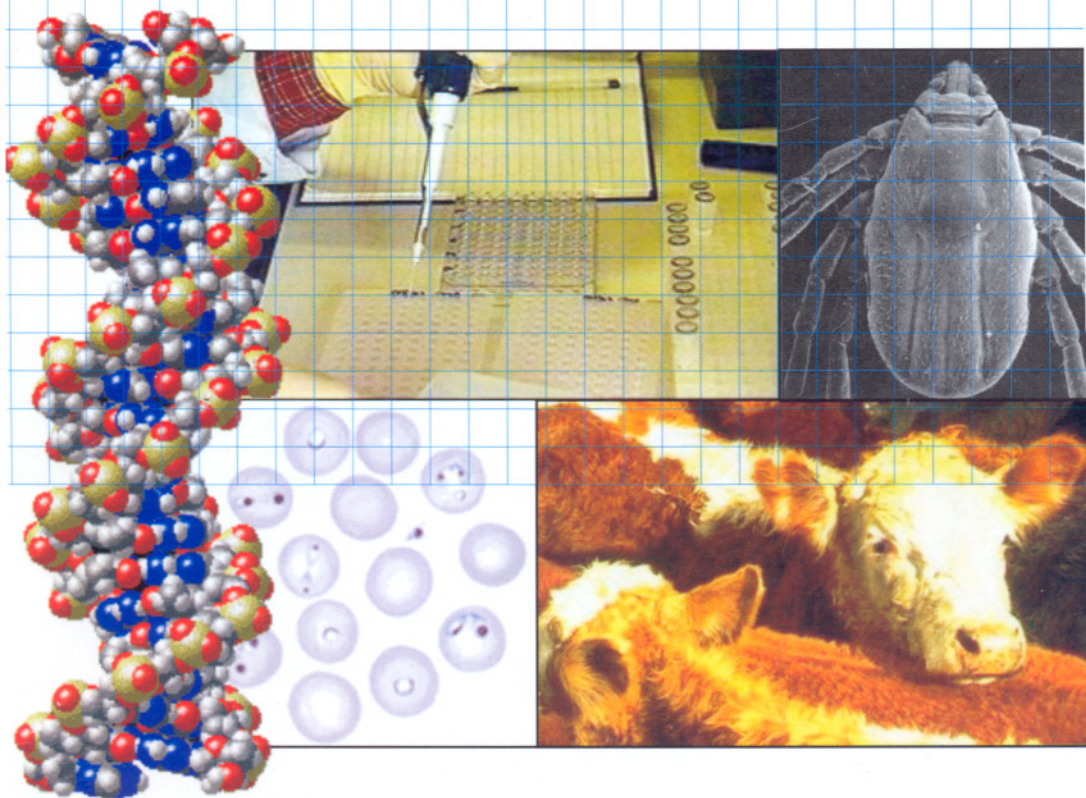


Identificação de Bovinos Portadores Sadios de *Babesia* spp Através da Técnica de PCR



República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Bonifácio Hideyuki Nakasu
Dante Daniel Giacomelli Scolari
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Pecuária Sul

Eduardo Salomoni
Chefe-Geral

Laudo Orestes Antunes Del Duca
Chefe-Adjunto de Administração

Roberto Silveira Collares
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Documentos30

Identificação de Bovinos Portadores Sadios de *Babesia* spp Através da Técnica de PCR

Magda Vieira Benavides
Ana Maria Sastre Sacco
Tania de Azevedo Weimer
Patrícia Dutra Valente
Bernardo Macke Franck

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul
BR 153, km 595 - Caixa Postal 242
96401-970 - Bagé, RS
Fone/Fax: (0XX53) 242-8499
<http://www.cppsul.embrapa.br>
sac@cppsul.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Roberto Silveira Collares*
Secretário-Executivo: *Nelson Manzoni de Oliveira*
Membros: *Klecius Ellera Gomes*
Sérgio Silveira Gonzaga
Carlos Miguel Jaime Eggleton
Ana Mirtes de Sousa Trindade
Vicente Celestino Pires Silveira

Supervisor editorial: *Sérgio Silveira Gonzaga*
Tratamento editorial: *Ana Mirtes de Sousa Trindade*
Tratamento de ilustrações: *Roberto Cimirro Alves*
Editoração eletrônica: *Gráfica do Instituto de Menores*

1ª edição

1ª impressão (2001): 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).

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros. Identificação de bovinos portadores sadios de *Babesia* através da técnica de PCR. [por] Benavides, M. V.; Sacco, A. M. S.; Weimer, T. de A.; Valente, P. D. [e] Franck, B. M. Bagé: CPPSul, 2001.

22p. (Embrapa CPPSul, Documentos, 30)

1. Bovinos de corte. 2. Tristeza parasitária. 3. *Babesia bovis*. 4. *Babesia bigemina*. 5. Diagnóstico por PRC. 6. Benavides, M. V. 7. Sacco, A. M. S. 8. Weimer, T. de A. I. Título. II. Série.

CDD 570.28

Autores

Magda Vieira Benavides

Pesquisador Visitante - CNPq
magda@cppsul.embrapa.br

Ana Maria Sastre Sacco

Pesquisador III - Embrapa Pecuária Sul
anasacco@cppsul.embrapa.br

Tania de Azevedo Weimer

Professor Titular - Departamento de Genética - UFRGS
weimer@vortex.ufrgs.br

Patrícia Dutra Valente

Laboratorista - Embrapa Pecuária Sul
patricia@cpact.embrapa.br

Bernardo Macke Franck

Técnico Agrícola - Embrapa Pecuária Sul
bernardo@cppsul.embrapa.br

Sumário

Introdução	9
Material e Métodos	16
Resultados Parciais	17
Conclusão	20
Referências Bibliográficas	20

Apresentação

A Tristeza Parasitária Bovina (complexo babesiose-anaplasmose), enfermidade transmitida pelo carrapato *Boophilus microplus*, é responsável por alta morbidade e mortalidade nos rebanhos de corte e leite da Região Sul do Brasil.

Estudos epidemiológicos identificam zonas de risco e são essenciais para a determinação de estratégias de controle efetivas na profilaxia da doença. Um dos entraves para isto é a identificação dos animais portadores sadios, ou seja, indivíduos que possuem o hemoparasito mas não apresentam sintomatologia da doença. A presença destes indivíduos mantem o reservatório de parasitos no rebanho e faz com que os carrapatos se infectem, transmitindo estes hemoparasitos para bovinos sensíveis, perpetuando a presença do patógeno no ambiente.

As técnicas de identificação de animais portadores sadios atualmente em uso não são as mais adequadas e por isso estão sendo desenvolvidos métodos moleculares para esta determinação. O diagnóstico molecular das enfermidades dos animais domésticos vem crescendo de forma exponencial e sua aplicação direta oferece resultados rápidos e sensíveis. A rapidez e agilidade no diagnóstico da Tristeza Parasitária Bovina possibilita um controle sanitário efetivo e uma redução de perdas produtivas na pecuária bovina.

Eduardo Salomoni
Chefe Geral da Embrapa Pecuária Sul

Identificação de Bovinos Portadores Sadios de *Babesia* spp Através da Técnica de PCR

Magda Vieira Benavides
Ana Maria Sastre Sacco
Tania de Azevedo Weimer
Patrícia Dutra Valente
Bernardo Macke Franck

Introdução

A babesiose bovina, doença que faz parte do complexo Tristeza Parasitária, é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina*. Esta doença provoca grandes perdas produtivas (McCosker, 1981) e, em rebanhos sensíveis, são comuns taxas de mortalidade de mais de 50% (Wright, 1991). A ocorrência de babesiose está relacionada à distribuição de seu vetor, no nosso meio, o carrapato *Boophilus microplus*.

Nas regiões tropicais e subtropicais, áreas permanentemente infestadas pelo carrapato, há um estado de equilíbrio entre os bovinos e os parasitos, criando a situação de estabilidade enzoótica - a doença clínica ocorreria principalmente em animais vindos de áreas onde não existe o carrapato (Madruga *et al.*, 1987). Nos lugares adjacentes a esta zona enzoótica (áreas marginais), as condições climáticas não são continuamente favoráveis ao carrapato, cuja infestação varia muito conforme a estação, mas tanto a *Babesia* quanto o *Boophilus* são mantidos no ambiente e, neste caso, suas presenças são caracterizadas pela ocorrência de surtos irregulares da doença clínica, numa situação de desequilíbrio ou de instabilidade enzoótica (Solari & Quintana, 1994). Muitas regiões do Brasil apresentam características de instabilidade enzoótica, dentre elas o Rio Grande do Sul (Brasil *et al.*, 1982).

Nas regiões de instabilidade enzoótica, para se evitar perdas por TPB é muito importante, entre outras informações, que se conheça o estado imunológico do rebanho para poder decidir pela utilização, ou não, de métodos de controle e imunização (Young, 1988). O estado imunológico do rebanho é determinado pela presença, de maneira constante e estável ou não, do parasito nos bovinos. Estes bovinos que abrigam os parasitos em seu organismo e não apresentam a doença clínica são chamados de "animais portadores sadios", que possuem infecção subclínica e são os responsáveis, juntamente com o carrapato, pela manutenção e propagação dos agentes causadores da doença no meio ambiente. Portanto, para se conhecer o estado imunológico do rebanho, é necessário que se identifique a presença e se determine a quantidade de animais portadores sadios.

Como nos portadores sadios a presença do parasito dificilmente é detectada através de técnica convencional (esfregaço sangüíneo fino ou gota espessa), esta identificação foi desenvolvida, de maneira indireta, através de testes sorológicos, que determinam a presença de anticorpos específicos no soro dos animais. Indiretamente se conclui que os animais que tem presença de anticorpos específicos são portadores do agente que induz a formação destes anticorpos.

Por muito tempo a determinação do estado imunológico de rebanhos tem sido feita através do imunodiagnóstico por Imunofluorescência Indireta (IFI), um teste que indica a presença de anticorpos específicos no soro dos animais e, indiretamente, a presença do parasito. Entretanto, esta técnica apresenta inconvenientes como: (a) resultados positivos em ausência de infecção, como no caso de anticorpos colostrais ou animais que tenham sido esterelizados por quimioterapia, (b) técnica extenuante para o operador, o que limita o número de amostras a serem processadas, (c) técnica de difícil padronização pois seus resultados são influenciados por julgamento subjetivo do operador e (d) nem sempre é muito específica (Wright, 1991 e Böse *et al.*, 1995). Conseqüentemente é necessário que se estabeleça uma técnica específica e simples para a determinação da presença do agente no

meio ambiente, através da detecção de portadores sadios, e a classificação dos rebanhos como estáveis ou instáveis.

Esta presença pode ser determinada através do cultivo *in vitro* do sangue de animais suspeitos, de subinoculação de sangue destes animais em animais susceptíveis ou por provas de ELISA de captura (Morzaria *et al.*, 1992), porém estes métodos são demorados e/ou caros ou simplesmente impraticáveis em trabalhos epidemiológicos (Böse *et al.*, 1995).

O uso de técnicas moleculares como ferramenta para o diagnóstico de parasitos na área de Veterinária tem tido um rápido desenvolvimento nesta última década, entretanto permanece mais como uma técnica de pesquisa do que de rotina para fins de diagnóstico (Comes *et al.*, 1996). Thompson (1999) cita que recentes metodologias de diagnóstico têm sido desenvolvidas para *Trypanosoma* spp e *Toxoplasma* spp, entre outros, entretanto enfatiza a necessidade de se desenvolver métodos de detecção sensíveis e rápidos para a utilização em levantamentos epidemiológicos de *Babesia* spp.

Dentre estas técnicas, a de reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) se destaca por permitir a amplificação de genes ou de fragmentos destes a partir de pequenas quantidades de DNA possibilitando assim o diagnóstico direto do parasito no sangue de animais portadores sadios. A técnica amplifica o gene de interesse em 1×10^{12} vezes o que é possível ser visualizado em gel de agarose e permitir um diagnóstico da presença/ausência do parasito no hospedeiro.

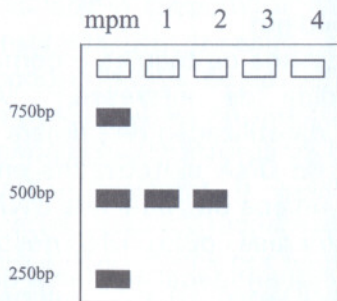
Os diagramas abaixo mostram os passos da técnica e como esta amplifica a seqüência nucleotídica de interesse. A especificidade da técnica é dada através da utilização de primers - oligonucleotídeos ou seqüências curtas de DNA sintetizadas em laboratório - que se hibridizam em locais únicos da cadeia de DNA do parasito e permitem que uma DNA polimerase copie o DNA desta região duplicando-o a cada ciclo e gerando quantidade suficiente de DNA do gene de interesse para ser visualizado em gel de agarose.



Amostra de sangue

Amplificação do DNA de *Babesia* spp das hemácias parasitadas através da técnica de PCR

Gene de interesse: seqüência de *Babesia* spp com 500bp de tamanho

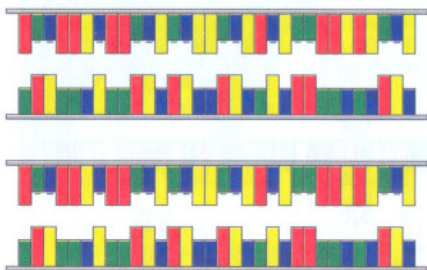


Eletroforese e visualização do resultado em gel de agarose

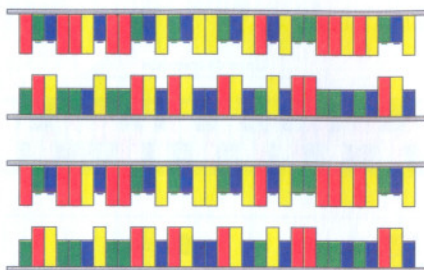
Amostra	Resultado
1	Positivo
2	Positivo
3	Negativo
4	Negativo

mpm = marcador de peso molecular

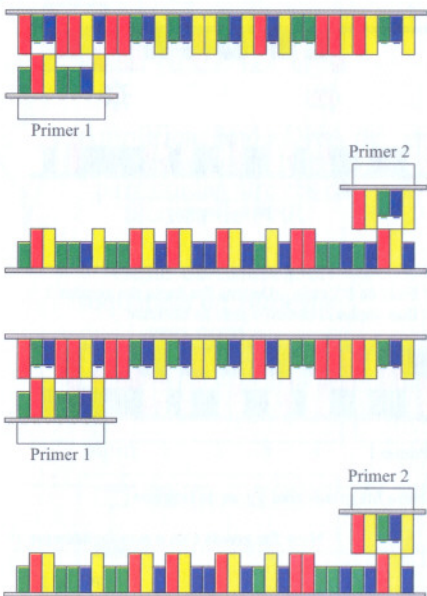
f. Início 2º. ciclo - Desnaturação



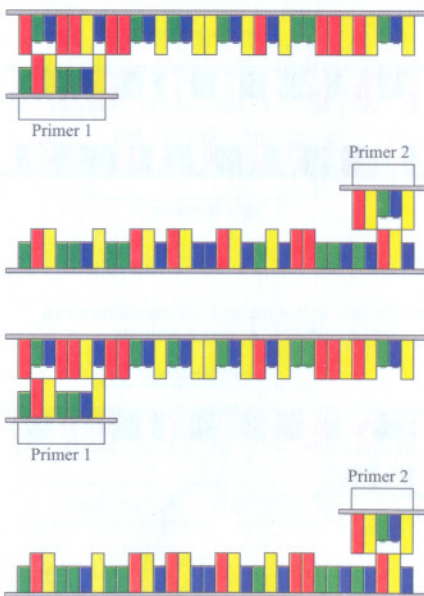
f. Início 2º. ciclo - Desnaturação



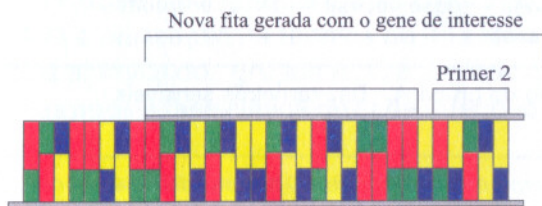
g. Anelamento dos primers 1 e 2 específicos para a seqüência de DNA do gene de interesse



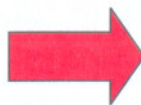
g. Anelamento dos primers 1 e 2 específicos para a seqüência de DNA do gene de interesse



- i. Final do 2º. ciclo - De duas fitas duplas são geradas 4 fitas duplas contendo o gene de interesse



- j. Ao final de 40 ciclos serão geradas 1×10^{12} cópias da seqüência de DNA que contém o gene de interesse



... após 30-40 ciclos inúmeras cópias de DNA são geradas



Embora a presença/ausência de *Babesia* spp. através da técnica de PCR já tenha sido demonstrada em sangue bovino (Figuroa *et al.*, 1993, Calder *et al.*, 1996 e Salem *et al.*, 1999) cabe padronizar e implantar a técnica como meio de diagnóstico de *Babesia* spp. existentes na Região Sul do Estado. A técnica de PCR, por sua sensibilidade e especificidade, tem um grande potencial de utilização no diagnóstico das condições epidemiológicas de rebanhos e pode ser empregada na otimização de programas estratégicos de controle.

Neste sentido, em 1999 foi iniciado, na Embrapa Pecuária Sul, um trabalho de pesquisa cujo objetivo é testar, e se necessário, desenvolver, um procedimento por meio de PCR para diagnosticar eficientemente animais portadores sadios de *Babesia* spp. Tal diagnóstico auxiliará futuros estudos epidemiológicos da doença na Região Sul do Brasil.

Material e Métodos

O experimento proposto será realizado na Embrapa Pecuária Sul e no Laboratório de Genética da UFRGS. Serão utilizados 48 bovinos divididos nos seguintes grupos:

A. Portadores sadios de *B. bovis*. Bovinos da raça Hereford inoculados com dose vacinal de *B. bovis* atenuada - (dose vacinal = 1×10^7 eritrócitos parasitados por *B. bovis* atenuada).

B. Receptores de subinoculação do grupo A. Dez terneiros sensíveis esplenectomizados.

C. Portadores sadios de *B. bigemina*. Dez bovinos de campo, carrapateados, de aproximadamente um ano de idade, sem sintomatologia clínica de tristeza parasitária bovina.

D. Receptores de subinoculação do grupo B. Dez terneiros sensíveis esplenectomizados.

E. Controle positivo de *B. bovis* (portador clínico). Dois terneiros sensíveis, esplenectomizados, inoculados com 1×10^7 eritrócitos parasitados por *B. bovis*.

F. Controle positivo de *B. bigemina* (portador clínico). Dois terneiros sensíveis, esplenectomizados, inoculados com 1×10^7 eritrócitos parasitados por *B. bigemina*.

G. Controle negativo. Dois bovinos sensíveis - não portadores de *Babesia* spp. Resultado negativo em teste de subinoculação em terneiro esplenectomizado.

H. Receptores de subinoculação do grupo G. Dois terneiros sensíveis esplenectomizados.

A confirmação da condição de bovinos portadores sadios e negativos (grupos A, C e G) será efetuada através da subinoculação de 500 ml de sangue de cada um destes animais em terneiros sensíveis esplenectomizados (grupos B, D e H). Os animais inoculados e subinoculados (grupos B, D, E, F e H) serão monitorados em relação a 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 será efetuada por punção da jugular utilizando tubos com EDTA para a posterior extração de DNA e sem anticoagulante para obtenção de soro. Para a realização da técnica de PCR serão utilizadas amostras de sangue dos animais dos grupos E e F (durante a fase clínica de cada infecção) e dos grupos A, C e G. Para a realização da técnica de IFI serão utilizadas amostras de soro dos animais dos grupos A, C e G e dos grupos E e F aos 15, 30 e 60 dias após a fase clínica de cada infecção.

Resultados Parciais

Até o momento foram realizados os desafios para a *Babesia bovis* e os resultados do acompanhamento dos animais receptores são mostrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Relação de animais doadores (identificações) com seus respectivos receptores.

Doadora (Grupo A)	Receptor (Grupo B)
217	663
227	654
249	645
253	667
295	659
315	641
326	668

Tabela 2. Animais receptores (Grupo B) que comprovaram a positividade dos portadores sadios.

Ident if.	663	Dias após a subinoculação										
		P.N.	5	6	7	8	9	10	12	13	14	19
T ^o C	39.0	39.7	41.0	41.1	39.4	39.4	40.9	38.7	38.6	38.7	39.1	
VG (%)	31	31	28	28	23	22	20	20	21	21	21	
%Parst	0	0	Bbo	Bbo Tmt	Bbo 0.04	*	Bbo	0	0	0	*	

Ident if.	654	Dias após a subinoculação										
		P.N.	5	6	7	8	9	10	12	13	14	19
T ^o C	39.4	39.2	39.5	40.2	39.0	39.0	38.7	39.1	38.8	39.3	39.1	
VG (%)	27	25	26	24	21	21	21	22	22	22	21	
%Parst	0	0	Bbo	Bbo Tmt	0	*	0	0	0	0	*	

Ident if.	645	Dias após a subinoculação										
		P.N.	5	6	7	8	9	10	12	13	14	19
T ^o C	39.2	39.0	39.0	38.7	38.8	38.6	39.1	41.5	39.6	39.3	39.5	
VG (%)	32	32	32	34	31	31	32	29	25	21	26	
%Parst	0	0	Bbo	Bbo	0	Bbo	Bbo	Bbo Tmt	Bbo++	0	*	

Ident	667	Dias após a subinoculação									
		PN.	5	6	7	8	9	10	12	13	14
T ^o C	39.5	39.4	39.9	40.7	41.1	39.2	39.0	39.6	39.2	39.0	39.0
VG (%)	30	30	30	30	26	22	21	21	21	21	24
%Parst	0	0	Bbo	Bbo	Bbo++	Bbo++	Bbo	0	0	0	*
+ Tmt											

Ident	659	Dias após a subinoculação									
		PN.	5	6	7	8	9	10	12	13	14
T ^o C	39.1	40.5	39.9	41.3	38.7	38.6	38.6	38.5	38.6	38.8	39.9
VG (%)	31	29	27	26	21	21	20	20	19	21	21
%Parst	0	0	Bbo	Bbo	Bbo	*	0	0	0	0	*
Tmt											

Ident	641	Dias após a subinoculação									
		PN.	5	6	7	8	9	10	12	13	14
T ^o C	39.3	39.0	41.0	39.5	38.6	38.7	38.8	38.9	39.1	39.1	39.0
VG (%)	30	28	25	26	23	22	22	21	22	21	21
%Parst	0	0	Bbo	0	0	0	0	0	0	0	*

P.N. - parâmetros normais

Bbo + + - babesias mortas, esturricadas

Bbo + + + - parasitemia alta, ainda não quantificada

* - parasitemia ainda não determinada

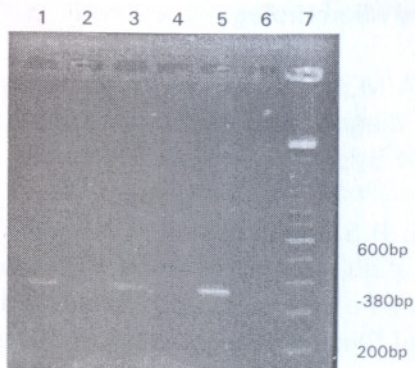
Tmt - Tratamento veterinário

As amplificações com DNA de animais *B. bovis* positivo e animais portadores sadios resultaram em uma banda de aproximadamente 380bp de tamanho (Figura 1).

Figura 1. Visualização de fragmento de aprox. 380bp resultante da amplificação com os primers específicos para *Babesia bovis*.

Legenda:

- 1 DNA de portador sadio
- 2 DNA de portador sadio
- 3 DNA de portador sadio
- 4 *B. bovis* Controle negativo
- 5 *B. bovis* Controle positivo
- 6 PCR sem DNA (Ctrl neg.)
- 7 Marcador de peso molecular



Conclusão

A identificação dos animais portadores sadios para *Babesia bovis* foi possível através da técnica de PCR. Este método laboratorial proporcionará um diagnóstico rápido e sensível para detectar a presença deste hemoparasito no sangue de animais assintomáticos.

Referências bibliográficas

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**, v. 3, n.1, p. 1-4. 1994.

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**, v. 57, p. 61-74. 1995.

Brasil, A.G.; Monmany, L.F., Sá, M.L.G.; Sá, N.F. Premunção contra a tristeza parasitária em bovinos a campo. **A Hora Veterinária**, v. 2, n. 10, p. 4-8. 1982.

Calder, J.A.; Reddy, G.R.; Chieves, L.; Courtney, C.H.; Littell, R.; Livengood, J.R.; Norval, R.A.; Smith, C.; Dame, J.B. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2748-55. 1996.

Comes, A.M.; Humbert, J.F.; Cabaret, J.; Elard, L. Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. **Veterinary Research**, v. 27, n. 4-5, p. 333-342. 1996.

Felleisen, R.S.J.; Lambelet, N.; Bachmann, P.; Nicolet, J.; Muller, N.; Gottstein, B. Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 513-519. 1998.

Figuroa, 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**, v. 30, n. 10, p. 2576-82. 1992.

Figuroa, 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, n. 1-2, p. 69-81. 1993.

IICA. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. **Técnicas para el diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis bovina**. 2a. Ed. San José, Costa Rica: IICA, 1987. 79p.

Madruga, C.R.; Honer, M.R.; Schenk, M.A.M.; Curvo, J.B.E. Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da tristeza parasitária bovina no Mato Grosso do Sul. (**Pesquisa em andamento nº 38**). Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC, 1987.

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

Salem, G.H.; Liu, X.; Johnsrude, J.D.; Dame, J.B.; Reddy, R.G. Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis. **Molecular Cell Probes**, v. 13, n. 2, p. 107-13. 1999.

Solari, M.A.; Quintana, S. Epidemiologia y prevención de los hemoparasitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. In: Nari, A. & Fiel, C. **Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Basis epidemiológicas para su prevención y control**. Montevideo: Editorial Agropecuária Hemisferio Sur, S.R.L., Cap. 24. 1994. p. 481-507.

Thompson, R.C.A. Veterinary Parasitology: Looking to the next millennium. **Parasitology Today**, v. 15, n. 8, p. 320-325. 1999.

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

Young, A.S. Epidemiology of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc. Cap. 5. 1988. p.81-98.