

PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Babesia bovis* E ESTUDO MOLECULAR DO PARASITA EM BOVINOS DA FAZENDA EXPERIMENTAL DAS FIO

STANDARDIZATION OF DIAGNOSTICS MOLECULAR OF *Babesia bovis* MOLECULAR STUDY THE PARASITES IN CATTLE FROM EXPERIMENTAL FARM OF THE FIO

¹ SILVA, L.E.; ¹ OLIVEIRA, S.L.; ² GATTI, L.L.

¹Graduandas do Curso de Medicina Veterinária –Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

²Professor Doutor, do Departamento de Ciências Biológicas e Farmácia e Gestor dos Laboratórios de Análises Clínicas e Biologia Molecular - Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

RESUMO

O trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar *Babesia bovis* (*B.bovis*), (causadora da Tristeza Parasitária Bovina) no rebanho de bovinos da Fazenda Experimental das Faculdades Integradas de Ourinhos. Foram coletadas 22 amostras de sangue dos bovinos, sendo dezoito fêmeas e quatro eram machos. A PCR comprovou que nove animais (40%) foram positivos apresentando amplificação do material genético do parasita, sendo um macho (25%) e oito fêmeas (45%). A padronização foi realizada de forma adequada e os resultados obtidos de positividade foram encaminhados ao Veterinário Responsável para tratamento.

Palavras-chave: *Babesia bovis*. Tristeza Parasitária Bovina. Reação em Cadeia Polimerase.

ABSTRACT

The study aimed to standardize the technique of polymerase chain reaction (PCR) chain to identify *Babesia bovis* (*B.bovis*) (Bovine parasitic cause of Sadness) herd of cattle from Experimental Farm of the Integrated Faculdades of Ourinhos. Blood samples from 22 cattle were collected, and eighteen females and four were males. The PCR showed that nine animals (40%) were positive amplification of the genetic material present in the parasite being a male (25%) and eight females (45%). The standardization was done properly and the results of positivity were referred to the Veterinary Officer for treatment.

Keywords: *Babesia bovis*. Cattle Tick Fever. Polymerase Chain Reaction.

INTRODUÇÃO

A babesiose bovina é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, que são hemoparasitas intracelulares, responsáveis pela doença do complexo de Tristeza Parasitária Bovina (TPB), que é transmitida pelo vetor *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (MAHONEY; MIRRE, 1979).

Para a bovinocultura esta doença causa grandes prejuízos econômicos: um grande índice de mortalidade, diminuição na produção de leite e carne, gastos com

medicamentos, atrasos no ritmo de crescimento dos bezerros e gastos com vacinas e controles profiláticos. (MASSARD; FREIRE, 1985).

A transmissão da babesiose ocorre pelas fêmeas do carrapato que estão fixadas na pele do bovino, ingurgitando sangue, ingerindo certos números de parasitas. Esses parasitas ingeridos pelas fêmeas são transmitidos para sua descendência na fase de ovoposição nas pastagens, portanto a transmissão efetiva da *B. bovis*, se dará pela forma larval e a *B. bigemina* tem um ciclo mais longo por ser transmitida a partir do estagio da ninfa até a parte adulta. (KESSLER et al., 1992).

Segundo, Kessler et al. (1998) dependendo da taxa de inoculação e da sensibilidade do hospedeiro, o período de incubação varia de 7 a 14 dias, podendo aumentar ou diminuir. A partir do momento que o animal se torna infectado pela *B. bigemina* ocorre uma multiplicação nos vasos periféricos, e quando infectados pela *B. bovis* ocorre uma multiplicação nos vasos viscerais.

O animal portador da doença apresenta hipertermia, anemia, hemoglobinúria, icterícia, hemaciação e alta mortalidade. (LEMOS, 1998).

O diagnóstico é de suma importância para diferenciar visto que os sinais clínicos podem ser confundidos com outras doenças. Com o avanço da tecnologia molecular, a mesma oferece algumas vantagens em relação aos testes sorológicos mais utilizados, por serem mais específicos, sensíveis e mais ágeis. Dentre as técnicas moleculares que permite a identificação do agente, a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem sido utilizada para demonstrar a presença ou ausência de parasitas no sangue dos animais. (MOLINA; TOBO, 2004).

Visto a importância atual da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), no diagnóstico de doenças infecciosas e sua alta especificidade e sensibilidade, o presente estudo teve como objetivo padronizar a técnica no laboratório de Biologia Molecular das Faculdades Integradas de Ourinhos e realizar um levantamento molecular em bovinos do Hospital Veterinário das FIO.

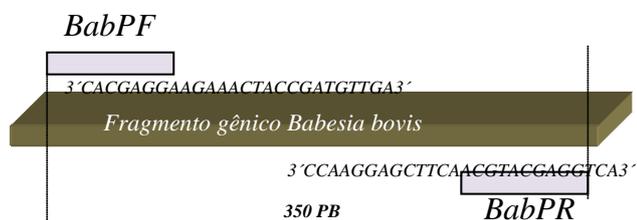
MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 10mLs de sangue periférico de 22 bovinos (18 machos e 4 fêmeas aleatórios) no Hospital Veterinário das Faculdades Integradas de Ourinhos, através de punção venosa da veia jugular de cada bovino; Foi realizada a tricotomia da região da veia jugular e a assepsia do local; garroteado ou pressionado com o dedo sobre o vaso sanguíneo que foi puncionado, de uma forma que este garrote não demore, foi introduzido com firmeza a agulha na pele e no vaso sanguíneo do animal e as amostras de sangue coletadas foram acondicionadas em tubos de ensaio com anticoagulante EDTA com o objetivo de realizar a reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção do material genético de *B. bovis*.

Para amplificação do fragmento gênico (DNA) de *B. bovis*, foi utilizado sequência de *primers* descrita na literatura; Os primers utilizados para amplificação foram: *Primer BabPF* : CAC GAG GAA GGA ACT ACC GAT GTT GA - 26 bases (50% CG); Massa : 171 ug = 21.3 nmol / Peso Molecular : 8046 e *Primer BabPR* : CCA AGG AGC TTC AAC GTA CGA GGT CA - 26 bases (53% CG) Massa : 169 ug = 21.1 nmol / Peso Molecular : 7983. As condições padronizadas para Realização da PCR, foram : - Um ciclo único inicial de 94C, durante 5 minutos, para promover a desnaturação total das fitas de DNA; - 35 ciclos, nas seguintes temperaturas e tempo: 94C durante 1 minuto (para desnaturação), 61C durante 1 minuto (para associação do *primer* específico, delimitando a sequência a ser amplificada), 72C durante 1 minuto (de extensão para ação da Enzima *Taq* DNA polimerase, para amplificação dos fragmentos copiados)- Um ciclo final de 72C por 7 minutos de extensão. Após a realização dos ciclos da PCR espera-se uma amplificação de um fragmento de DNA de 350pb (pares de bases). As condições da PCR e *primers* utilizados para amplificação encontram-se esquematizados na figura 1.

Figura 1. Ciclagem da PCR e fragmento amplificado através da utilização dos Primers específicos.

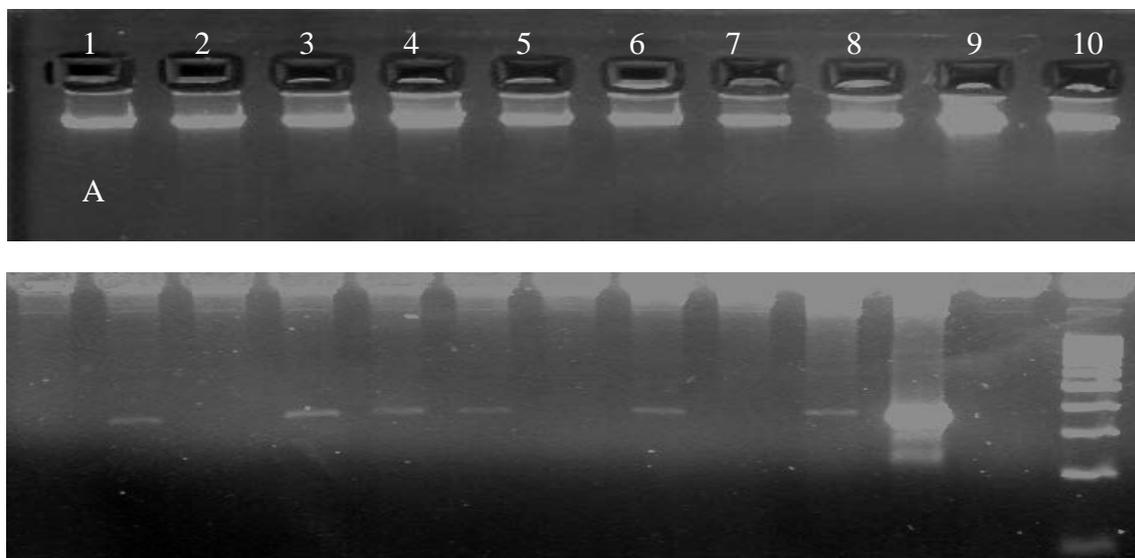
Ciclos: 94C – 5 minutos, 35 ciclos: 94C – 1 minuto, 61C – 1minuto, 72C – 1 minuto, 7 minutos 72C de extensão.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento foram colhidos e analisados através da Técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), amostra de sangue periférico de 22 bovinos provenientes da Fazenda Experimental das Faculdades Integradas de Ourinhos. O DNA genômico foi extraído e a PCR realizada com a utilização de primers específicos, com a amplificação de um fragmento de 350pb, conforme observado na figura 2a e b.

Figura 2. Gel de Agarose Corado com Brometo de Etídeo, mostrando a extração correta De DNA Genômico das Amostras. Figura 2 B, Produto da PCR, mostrando a amplificação De um fragmento de 350pb referente ao DNA de *B. bovis*. C+, Controle positivo, C- Controle Negativo e M, Marcador de Peso Molecular (100pb)



Todas as padronizações foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido na figura 1, com a amplificação final de um fragmento de 350pb referente ao material genético da *B. bovis*. Das 22 amostras colhidas para o estudo de padronização foi observado a amplificação do material genético do parasita em 40% das amostras, ou seja, 9 bovinos. Destes 1 macho (25%) e 8 fêmeas (45%). Estudo semelhante realizado na Ilha de Marajó por Silva JB et al, (2013) foi observado uma positividade molecular de *B. bovis* em búfalos *Bubalus bubales* de 15%, com uma soropositividade de 24,87%. Já na Argentina, Ferrari et AL (2008), observaram na Província de Corrientes que de 103 amostras dos mesmos búfalos examinadas para *B. Bovis* encontraram 34% de positividade para PCR, enquanto na província de Lavalle, ainda na Argentina foi encontrado uma positividade de 61%, relatando uma baixa prevalência de positividade, justificando que os bubalinos mantem-se submersos na água sendo a explicação mais aceitável para baixa prevalência de carrapatos e consequentemente baixa prevalência de *B. bovis* quando comparados com bovinos.

Já em um estudo sorológico brasileiro, realizado em uma microregião de Goiânia foram pesquisados anticorpos anti-*B. bovis* em 180 amostras de soro onde foi demonstrado 98,9% de soropositividade mostrando uma área caracterizada como elevada estabilidade enzootica para babesiose bovina (Santos HQ, et AL. 2001).

Analisando os dados obtidos nestas 22 amostras colhidas para padronização da Técnica molecular para diagnóstico de *Babesia bovis* e comparando com estudos da literatura, será necessário um estudo mais aprofundado junto aos profissionais do Hospital Veterinário das FIO, afim de acompanhar e continuar o diagnóstico molecular nos bovinos do Hospital Veterinário da Instituição.

CONCLUSÃO

A padronização do diagnóstico Molecular através da Técnica da PCR foi realizada com sucesso. As amostras analisadas mostraram uma porcentagem de 40% de positividade, sendo necessários novos estudos moleculares e sorológicos nos bovinos da Instituição e acompanhamento dos profissionais veterinários das FIO.

REFERÊNCIAS

ÁVILA, Q.A. **Métodos de diagnósticos de Tristeza Parasitaria Bovina**. Trabalho apresentado para o cumprimento de atividades referentes ao curso de Especialização *Latu sensu* em Vigilância em Saúde e Defesa Sanitária Animal. Campo Grande. 2008.

KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande. M.S.: Embrapa-CNPGC, 1998.

KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; MADRUGA, C.R.; SACCO, A.M.S.; MIGUITA, M. **Tristeza Parasitaria dos bovinos (TPB)**. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. Doenças Parasitarias dos bovinos de leite. Coronel Pacheco: CNPGL, 1992. p. 1-30.

LEMOS, A.A. **Principais enfermidades de bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul. Reconhecimento e diagnóstico**. Campo Grande. M.S: [s.n.], 1998. p. 358-365.

MAHONEY, D.F.; MIRRE, G.B. A note on the transformation of *Babesia bovis*. (Sin. *B. argentna*) by the one host tick *Boophilus microphus*. **Research In Veterinary Science**, Penicuik, Medlothian, UK, v. 26, p. 253-254, 1979.

MASSARD, C.L.; FREIRE, R.B. Etiologia, manifestações e diagnóstico das babesioses no Brasil. **Hora Vet.**, Brasília, DF, v. 4, n.23, p. 53-56, 1985.

MOLINA, Adriana Lopes, TOBO, Patrícia Renovato. **Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico**. Disponível em: <http://www.einstein.br/biblioteca/artigos/Vol2Num2/Serie%20Biologia%20parte%202.pdf>. Acessado em 19 de maio de 2014.

SANTOS, H.Q.; et al. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e Elisa. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 133-137, 2001.

SILVA, J.B.; et al. Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalis bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará. **Revista Veterinária Brasileira**. Belém, v.33, n. 7, p. 847-850, 2013.