



AVALIAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA PARA A CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA E/OU SUSCETIBILIDADE DE BEZERROS DE CORTE ANGUS E ULTRABLACK A INFECÇÃO POR *Babesia bovis*

Thamires Marocci **Falasca**¹, Laura **Caetano**², Hiago **Polli**³, Rodrigo **Giglioti**⁴, Anibal Eugênio **Vercesi Filho**⁵

Nº 22714

RESUMO - O objetivo do presente estudo foi avaliar as infecções naturais por *Babesia bovis* por meio do ensaio imunoenzimático Elisa em 31 bezerros de corte de dois grupos genéticos: 17 Angus (100% taurino) e 14 Ultrablack (82% Angus e 18 zebu). A avaliação dos níveis de anticorpos contra esses hemoparasitas pode fornecer informações sobre o estado imunitário de indivíduos/rebanhos. Foram realizadas 13 avaliações com intervalos médios de 12 dias, sendo que em cada avaliação e de cada animal foram colhidas amostras de sangue para a obtenção de soro. As amostras de soro foram usadas nos ensaios de ELISA indireto, usando a proteína-4 de corpo esférico (BbSBP-4) de *B. bovis*, sintetizada *in vitro* e a peroxidase como substrato. As atividades enzimáticas das amostras dos soros foram medidas em filtros de 490 nm e os valores de A/P, foram calculados considerando-se os soros de referência positivo e negativo. Os valores de A/P foram analisados por meio de modelo misto, que incluiu os efeitos fixos de grupo genético (GG), sexo, avaliação (AVA), interações GG x AVA, e o efeito de idade (meses) foi usado como covariável. Neste modelo, foi utilizada uma estrutura da matriz de (co)variância de estrutura autoregressiva de primeiro grau (AR(1)) e medidas repetidas no mesmo animal. Não houve diferença significativa ($P= 0,09$) na comparação dos níveis de IgG anti-*B. bovis* entre os dois grupos genéticos. Contudo, foi verificado um efeito da interação GG x AVA significativo, sendo que nas quatro avaliações que diferiram ($P< 0,05$), foi verificado um valor maior de A/P para Ultrablack quando comparado com Angus. A repetibilidade estimada para o valor de A/P de *B. bovis* foi 0,70. Essa alta repetibilidade, sugere que os níveis de IgG apresentam pouca variação entre uma avaliação e outra, e que uma única observação pode ser suficiente para avaliar o contato dos animais frente as infecções por *B. bovis*.

Palavras chave: *Babesia bovis*, resistência, anticorpos, infecções, Elisa, suscetibilidade.

¹ Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Americana- FAM, Americana- SP. thamiresfalasca@fam.edu.br

² Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Americana – FAM, Americana-SP.

³ Bolsista CAPES: Mestrado em Produção Animal Sustentável, Instituto de Zootecnia-IZ, Nova Odessa-SP.

⁴ Biólogo e Assistente de PqC, Instituto de Zootecnia-IZ, Nova Odessa-SP.

⁵ Orientador: Médico Veterinário e Pesquisador do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa- SP; aezinho@sp.gov.br



ABSTRACT – *The present study aimed to evaluate Babesia bovis natural infections by Elisa enzyme immunoassay in 31 beef calves from two genetic groups: 17 Angus (100% Taurus) and 14 Ultrablack (82% Angus and 18 zebu). The antibody levels evaluations against these hemoparasites can provide information on the immune status of individuals/herds. Thirteen evaluations were performed with an average interval of 12 days, and in each evaluation and from each animal, blood samples were collected to obtain serum. Serum samples were used in indirect ELISA assays using as antigen B. bovis spherical body protein-4 (BbSBP-4) synthesized in vitro and peroxidase as substrate. The enzymatic activities of the serum samples were measured on 490 nm filters and the A/P values were calculated considering the positive and negative reference serum. The A/P values were analyzed using a mixed model, which included the fixed effects of genetic group (GG), sex, evaluation (AVA), GG x AVA interactions, and the effect of age (months) was used as a covariate. In this model, a first-order autoregressive structure (AR(1)) (co)variance matrix and repeated measures in the same animal were used. There was no significant difference ($P>0.05$) when comparing anti-B. bovis IgG levels between the two genetic groups. However, a significant effect of the GG x AVA interaction was verified, and in the four evaluations that differed, a higher A/P value was verified for Ultrablack when compared to Angus. The estimated repeatability for the A/P value of B. bovis was 0.70. This high repeatability suggests that IgG levels show low variation from one evaluation to another, and that a single observation may be sufficient to assess the animals' contact with B. bovis infections.*

Keywords: *Babesia bovis*, resistance, antibodies, infections, Elisa, susceptibility.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, muitos produtores optam pelo uso de animais puros *Bos taurus taurus* e seus cruzamentos com *Bos t. indicus* por apresentarem maior capacidade produtiva. Bovinos mestiços da primeira geração (F1) provenientes do cruzamento entre taurinos x zebuínos apresentam aumento de heterose em relação a resistência a parasitas e aumento de produtividade, permitindo-lhes um desempenho superior ao da raça taurina ou da raça pura indicadora em sistemas de produção tropical (SEIFERT et al., 1971; PEACOCK et al., 1981). Contudo, um dos principais entraves na utilização de bovinos com alto grau de sangue taurino é que, à medida que se aumenta sua proporção no rebanho, aumenta-se também a susceptibilidade desses animais às parasitoses. Um dos fatores limitantes a utilização de taurinos no Brasil é a ocorrência de parasitas, favorecida pela predominância de clima tropical e subtropical. Os prejuízos econômicos anuais



devidos aos ectoparasitas e endoparasitas de bovinos no Brasil foram estimados em 13,96 bilhões de dólares, que significa cerca de 10% do PIB da pecuária brasileira (GRISI et al. 2014).

Dentre as parasitoses que acometem os rebanhos bovinos brasileiros, as principais são as infestações pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*, transmissor biológico dos agentes que causam a Tristeza Parasitária Bovina (TPB). Esta doença inclui dois protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e a Rickettsia *Anaplasma marginale*. As babesias são parasitas intraeritrocitários de formato periforme que podem variar seu tamanho de 1µm a 3µm, e multiplicam-se por divisão binária (MONTEIRO, 2010; SEQUEIRA, 2001; TAYLOR, 2010). Nos bovinos, ambas espécies de *Babesia* são transmitidas exclusivamente pelo carrapato do bovino (BOCK et al, 2004). Assim, a babesiose é considerada uma doença endêmica em regiões onde a ocorrência do carrapato bovino é constante. Dentre os fatores que estão associados aos surtos dessa doença são o desenvolvimento crescente da resistência a acaricidas, assim como a disseminação de carrapatos infectados e as condições favoráveis climáticas em áreas que normalmente são livres desses hemoparasitas (WAAL & COMBRICK, 2006).

O uso dos cruzamentos de raças taurinas com zebuínas é uma estratégia que visa melhorar a produção, e ao mesmo tempo aumentar a resistência às parasitoses. Essa alternativa, está atraindo muito interesse de produtores brasileiros com o objetivo de aumentar a eficiência de seus rebanhos. Embora, estudos já tenham avaliado a possibilidade de realização de seleção fenotípica, e mais recentemente, de seleção genômica para resistência de carrapatos (PORTO-NETO et al., 2011; CARDOSO et al., 2015; MAPHOLI et al., 2016), não há estudos focados para seleção de resistência à babesiose. Em estudos mais recentes, foi observada uma baixa correlação entre o nível de infestação de *R. microplus* e os níveis de *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos naturalmente infectados (GIGLIOTI et al., 2016). Em outra pesquisa realizada pelo mesmo grupo de pesquisa, foi verificada a ausência de correlação entre títulos de anticorpos anti-*B. bovis* e os níveis de infecção por *B. bovis* estimados por técnicas sorológicas e moleculares, respectivamente (GIGLIOTI et al., 2017). Segundo esse estudo, é possível que, embora detectável por qPCR, as variações dos níveis de infecção nos animais não seriam suficientes para produzir sinais clínicos ou para desencadear uma resposta imune instantânea.

Diante disso, reforça-se ainda mais a necessidade de conduzir estudos voltados à identificação de bovinos mais resistentes às babesioses. A seleção para a resistência à babesiose em bovinos de raças taurinas ou cruzamentos, se possível, seria uma alternativa para facilitar o controle desta doença, e consequentemente, estimularia o encorajamento de criadores a aumentarem a produção dos seus rebanhos ao utilizarem animais mais produtivos. No presente estudo, foram avaliados os níveis de titulação de anticorpos IgG anti-*B. bovis* em 31 bezerros de dois grupos genéticos (Angus (100% taurino) e Ultrablack (82% Angus e 18% zebuino) infestados



naturalmente pelo carrapato *R. Microplus*, no intuito de verificar se a presença do sangue zebuíno poderia influenciar na infecção por *B. bovis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais experimentais e colheitas de amostras de sangue e extração de soro

Os bezerros usados no presente estudo foram provenientes da propriedade rural Agropecuária 3E, situada no município de José Bonifácio-SP. Foram realizadas 13 avaliações (17/11/2021 a 19/04/2022), em que foram colhidas amostras de sangue de 31 animais, sendo 17 Angus (100% taurino), 12 Ultrablack (82% Angus e 18% zebuíno) e 2 $\frac{3}{4}$ Angus x $\frac{1}{4}$ zebuíno. Esse estudo está vinculado ao projeto de pesquisa de auxílio regular FAPESP n. 2019/22675-6. O projeto foi aprovado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia (CEUA-IZ-328-2021). De cada animal, foi colhida uma amostra de sangue usando tubos a vácuo com anticoagulante EDTA, e foram submetidos a extração de soro.

2.2. Ensaio imunoenzimático indireto – ELISA

As amostras de soro foram analisadas pela técnica ELISA recombinante indireto seguindo a metodologia descrita por TERKAWI et al. (2011) com modificações (OKINO et al., 2020). As amostras de soro foram usadas nos ensaios de ELISA indireto, usando a proteína-4 de corpo esférico (BbSBP-4, número de acesso GeneBank: AF486506) de *B. bovis* e proteína-1 de roptria associada a região C-terminal, de *B. bigemina* (BbigRAP-1/CT, número de acesso GeneBank: M60878).

Resumidamente, placas de poliestireno (96 poços; Sigma-Aldrich, MO, USA) foram revestidas durante 12 horas a 4^o C com 100 µL de cada antígeno recombinante na concentração de 2 g/ml por poço em tampão de revestimento (Tampão Carbonato Bicarbonato 50 mM pH 9,6). As placas foram lavadas uma vez com 0,05% de Tween 20-PBS (PBST) e, em seguida, incubados com 100 µL de uma solução de bloqueio (3% de leite desnatado em PBS) por 1 h a 37 °C. Depois foi lavado uma vez com PBST, os poços revestidos com antígeno foram incubados com 50 µL de amostras de soro diluídas 1:100 com a solução de bloqueio por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas seis vezes com PBST e depois incubadas com 50 µL de anticorpo conjugado com peroxidase anti-IgG bovina feita em camundongo (Bio-Rad, CA, USA) diluído a 1:4000 em solução de bloqueio e incubado por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas seis vezes como indicado acima; então, 100 µL de uma solução de substrato dicloridrato de o-fenilenodiamina (SIGMAFAST™ OPD, Sigma) (1 comprimido OPD e 1 comprimido buffer dissolvidos em 20 mL de água) foi adicionado por poço. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, foi bloqueada a atividade

enzimática adicionando 50 uL de solução HCL 1M por poço; em seguida, as densidades óticas (DO) das atividades enzimáticas das amostras dos soros foram medidas em filtros de 490 nm usando o leitor de microplacas Biorad 550 (Bio-Rad). Os valores de A/P, foram calculados considerando-se os soros de referência positivo e negativo: $A/P \text{ (amostra/positivo)} = [DO \text{ amostra teste} - DO \text{ controle negativo}] / [DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo}]$. O ponto de corte foi obtido a partir de um cálculo, no qual as amostras de soros foram consideradas positivas quando os valores de A/P se apresentaram superiores ou iguais à média dos negativos (da placa) acrescidos de 2,5 vezes desvios-padrão da média dos negativos.

2.3. Análises estatísticas

Os dados dos valores de A/P dos níveis de IgG anti-*B. bovis* foram analisados pela metodologia de modelos mistos utilizando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS. O modelo incluiu os efeitos fixos de grupo genético (GG), sexo, avaliação (AVA), interações GG x AVA, e o efeito de idade (meses) foi usado como covariável. Neste modelo, foi utilizada uma estrutura da matriz de (co)variância de estrutura auto-regressiva de primeiro grau (*AR(1)*) e medidas repetidas no mesmo animal. Foi estimado o coeficiente de repetibilidade, expressa como a correlação entre medidas da mesma variável no mesmo indivíduo. A comparação das médias das variáveis nas diferentes avaliações ao longo do tempo e entre os grupos genéticos foram realizadas pelo teste de *Tukey* ($P < 0.05$). Além disso, o procedimento PROC FREQ do SAS foi utilizado para avaliar as frequências de positivos para *B. bovis* entre as avaliações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises dos dados dos valores de A/P para *B. bovis* entre os grupos genéticos Angus e Ultrablack não mostraram diferenças significativas ($P = 0,09$) entre os dois grupos (Figura 1). As médias seguidas de erros-padrão dos valores de A/P para os grupos genéticos Angus e Ultrablack foram $1,24 \pm 0,07$ e $1,48 \pm 0,07$, respectivamente. Contudo, foi verificado um efeito significativo ($P < 0,05$) da interação grupo genético (GG) com avaliação (AVA). Essas diferenças foram observadas em quatro avaliações (4, 5, 6 e 11), sendo que em todas elas, foi verificado um valor maior de A/P para Ultrablack quando comparado com Angus (Figura 1).

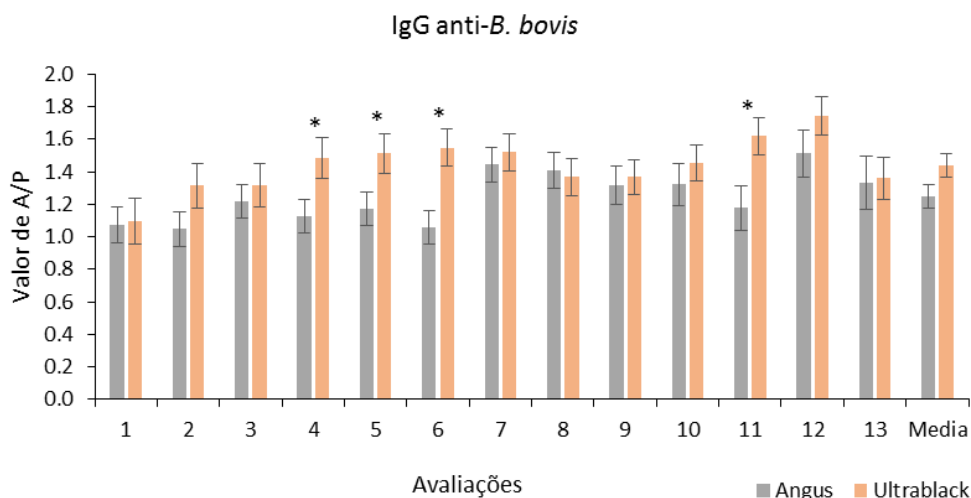


Figura 1. Médias seguidas de erros-padrão dos valores de A/P dos títulos de IgG anti-*B. bovis* em bezerros Angus e Ultrablack durante 13 avaliações (17/11/2021 a 19/04/2022); *= difere significativamente entre um grupo genético e outro ($P < 0,05$).

Em relação às frequências de positivos obtidos dos valores de A/P, embora tenha havido variação entre as avaliações, não houve efeito significativo ($P > 0,05$) entre as frequências de positivos entre os dois grupos genéticos. De maneira geral, as frequências de positivos nos dois grupos genéticos e em todas as avaliações foram altas, acima de 90% (Figura 2). Avaliando os níveis de IgG anti-*B. bovis* em Angus naturalmente infestados por *B. bovis* em duas avaliações com intervalos de 2 meses, GIGLIOTI et al., (2017) verificaram frequências de positivos de 100% em ambas avaliações, corroborando com nossos achados.

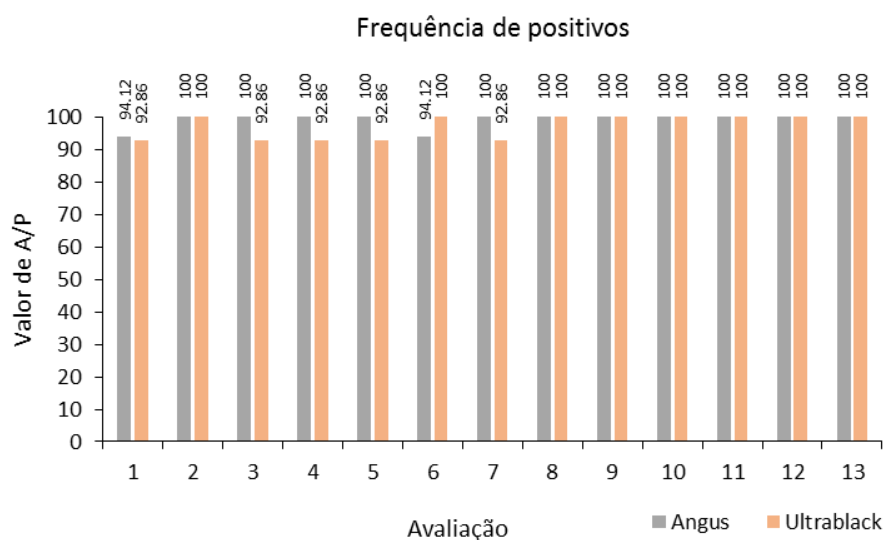


Figura 2. Frequências de positivos dos valores de A/P obtidos dos ensaios de Elisa para *B. bovis* em bezerros Angus e Ultrablack durante 13 avaliações (17/11/2021 a 19/04/2022).



A repetibilidade estimada para os valores de A/P de anticorpos anti-*B. bovis* foi de 0,70. Essa alta repetibilidade, sugere que os níveis de IgG apresentam pouca variação entre uma avaliação e outra, e que uma única observação pode ser suficiente para avaliar o contato dos animais frente as infecções por *B. bovis*. A repetibilidade estimada por GIGLIOTI et al., (2017) para os valores de A/P em animais Angus avaliados em duas ocasiões foi de 0,42, mostrando grande similaridade com nossos achados. A repetibilidade mais alta encontrada em nosso estudo, pode ser devido ao maior número de avaliações usadas, além de um menor intervalo entre as avaliações.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram a ausência de diferenças significativas dos níveis de IgG anti-*B. bovis* entre bezerros Angus e Ultrablack infectados naturalmente por *B. bovis*. Contudo, o efeito significativo da interação grupo genético e avaliação, evidencia uma tendência de um maior valor de A/P para o grupo Ultrablack, uma vez que, em todas as avaliações que diferiram, as médias de A/P foram maiores para esse grupo. Além disso, a alta repetibilidade estimada sugere que os níveis de IgG apresentam pouca variação entre uma avaliação e outra, e que uma única observação pode ser suficiente para avaliar o contato dos animais frente as infecções por *B. bovis*.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de iniciação científica para realização deste projeto; ao Laboratório de Genética do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Genética e Biotecnologia (IZ) pela disponibilização da área e materiais para realização do projeto; a Fazenda 3E Agropecuaria Angus por disponibilizar os animais para a realização do projeto; a todos os colegas do Laboratório de Genética do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Genética e Biotecnologia (IZ) que contribuíram para que a realização deste trabalho.



6. REFERÊNCIAS

- CARDOSO, F.F.; GOMES, C.C.G.; SOLLERO, B.P.; OLIVEIRA, M.M.; ROSO, V.M.; PICCOLI, M.L.; HIGA, R.H.; YOKOO, M.J.; CAETANO, A.R.; AGUILAR, I. Genomic prediction for tick resistance in Bradford and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v.93, p.2693-2705, 2015.
- GIGLIOTI, R., OLIVEIRA, H.N., IBELLI, A.M.G., BILHASSI, T.B., NÉO, T.A., SANTANA, C.H., RABELO, M.D., MACHADO, R.Z., CHAGAS, A.C.S., OLIVEIRA, M.C.S. Neither quantification by qPCR nor quantitative Elisa can be used to discriminate Angus cattle for resistance/susceptibility to *Babesia bovis*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 8 (3), 335–340, 2017.
- GRISI, L., LEITE, R.C., MARTINS, J.R.S., BARROS, A.T.M., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P.H. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, 150–156, 2014.
- MAPHOLI, N.O., MAIWASHE, A., MATIKA, O., RIGGIO, V., BISHOP, S.C., MACNEIL, M.D., ET AL. Genome-wide association study of tick resistance in South African Nguni cattle. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, p. 487–97, 2016.
- MONTEIRO, S.G; **Parasitologia na medicina veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2010.
- OKINO, C.H., BASSETTO, C.C., GIGLIOTI, R., SILVA, P.C., TONELLI, M.F., MARCONDES, C.R., OLIVEIRA, H. N.; OLIVEIRA, M.C.S. A polymorphic CD4 epitope related to increased susceptibility to *Babesia bovis* in Canchim calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 230, p. 110132, 2020.
- PEACOCK F.M., KOGER M., OLSON T.A., CROCKETT J.R. Additive genetic and heterosis effects in crosses among cattle breeds of British, European and Zebu origin. **Journal of Animal Science**, v.52, p.1007–1013, 1981.
- PORTO-NETO L.R., BUNCH, R.J., HARRISON, B.E., BARENDSE, W. DNA variation in the gene ELTD1 is associated with tick burden in cattle. **Animal Genetics**, v.42, p. 50–55, 2011.
- SEIFERT, G.W. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.22, p. 159–168, 1971.
- SEQUEIRA, T.C.G.O.; AMARANTE, A.F.T; **Parasitologia animal: animais de produção**. 1. ed. Rio de Janeiro: EPUB, 2001.
- TAYLOR, M.A; COOP, R.L; WALL, R.L; **Parasitologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- TERKAWI, M.A., HUYEN, N.X., SHINUO, C., INPANKAEW, T., MAKLON, K., ABOULAILA, M., UENO, A., GOO, Y.K., YOKOYAMA, N., JITTAPALAPONG, S., XUAN, X., IGARASHI, I. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. **Veterinary Parasitology**, v.178, p. 201–207, 2011.
- WAAL, D. T.; COMBRINK, M. P. Live vaccines against bovine babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.138, n. 1-2, p.88-96, 2006.