



AVALIAÇÃO NÍVEIS DA INFECÇÃO NATURAL POR *Babesia bovis* EM BEZERROS ANGUS E ULTRABLACK

Laura **Caetano**¹, Thamires Marocci **Falasca**², Anibal Eugênio **Vercesi Filho**³, Luciana Morita **Katiki**³, Rodrigo **Giglioti**⁴

Nº 22707

RESUMO – A babesiose bovina é uma hemoparasitose que causa diversos prejuízos para a bovinocultura brasileira, em que a espécie *Babesia bovis* é considerada a mais patogênica. É verificado uma maior resistência natural dos bovinos *Bos taurus indicus* frente a babesiose. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo estimar as infecções naturais por *B. bovis* em 31 bovinos de corte de dois grupos genéticos: 17 Angus (100% taurino) e 14 Ultraback (82% Angus e 18% Zebu). Foram realizadas 13 avaliações com intervalos médios entre avaliações de 12 dias, em que amostras de sangue de cada animal/avaliação foram colhidas usando sistema de tubos à vácuo contendo anticoagulante EDTA, e o DNA genômico foi extraído usando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Concomitante as colheitas das amostras de sangue, foram realizadas as contagens de carrapatos maiores que 4,5 mm de apenas um lado do animal. As amostras de DNA foram submetidas às reações de PCR quantitativa (qPCR) para a quantificação do número de cópias do DNA (NC) de *B. bovis* nos animais. Os resultados da quantificação do NC de *B. bovis* e contagens de carrapatos foram analisados por meio de modelos mistos. A ausência de diferença do nível de infecção de *B. bovis* e das contagens de carrapatos entre os dois grupos genéticos, nas condições do presente estudo, evidencia que a presença de sangue zebuino em Ultrablack não está associada à menor infecção desse hemoparasita.

Palavras-chaves: infecção, resistencia, grupos genéticos, qPCR, *Babesia bovis*, carrapatos.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Americana – FAM, Americana-SP. laura.abcaetano@gmail.com

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

3 Pesquisador Instituto de Zootecnia, Instituto de Zootecnia-IZ, Nova Odessa-SP.

4 Orientador: Biólogo e Assistente de PqC, Instituto de Zootecnia-IZ, Nova Odessa-SP. rodrigo.giglioti@sp.gov.br



ABSTRACT – *Bovine babesiosis is a hemoparasitosis that causes several damages to Brazilian cattle, in which the Babesia bovis species is considered the most pathogenic. The greater natural resistance of Bos taurus indicus cattle against babesiosis is verified. Therefore, the present study aimed to estimate the natural infections by B. bovis in 31 calves from two genetic groups: 17 Angus (100% Taurus) and 14 Ultraback (82% Angus and 18% Zebu). Thirteen evaluations were performed with mean intervals between of 12 days. Blood samples from each animal/evaluation were collected using EDTA anticoagulant-containing vacuum tube system, and genomic DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit. (Promega). Concomitantly with the blood samples collection, ticks counts larger than 4.5 mm were performed on only one side of the animal. The DNA samples were submitted to quantitative PCR (qPCR) reactions to quantify the B. bovis DNA copy number (NC) in the animals. The results of B. bovis NC and tick counts were analyzed using mixed models. The absence of difference in the level of B. bovis infection and tick counts between the two genetic groups, under the conditions of the present study, suggested that the presence of Zebu blood in Ultrablack is not associated with a lower infection of this hemoparasite.*

Keywords: infection, resistance, genetic groups, qPCR, *Babesia bovis*, ticks.

1. INTRODUÇÃO

A babesiose bovina é uma hemoparasitose que causa diversos prejuízos para a bovinocultura brasileira, e é transmitida exclusivamente pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*. No Brasil, *B. Bovis* e *B. Bigemina* são as duas espécies de protozoários causadoras da babesiose bovina. Dentre as duas espécies, *B. bovis* é considerada a mais patogênica. O Brasil, possui uma grande ocorrência de carrapatos vetores devido ao seu clima tropical, e consequentemente a babesiose bovina ocorre de forma endêmica na maioria dos estados brasileiros. Visando aumentar a produtividade de seus rebanhos, produtores tem optado por usarem sangue de raças taurinas, contudo, a medida que se se aumenta o sangue taurino, à suscetibilidade aos carrapatos, e consequentemente as doenças transmitidas por esse ácaro também é aumentada.

De acordo com WAAL & COMBRICK (2006), em áreas endêmicas, o controle dos carrapatos é mais difícil, onerando o produtor com gastos com acaricidas. Segundo esses autores, a TPB pode ser controlada pela erradicação de carrapatos ou por manterem seus números baixos para que grandes surtos não ocorram. Contudo, estudos recentes têm mostrado que a variação

dos níveis de infecção por hemoparasitas não depende dos níveis de infestação de carrapatos nos bovinos (GIGLIOTI et al., 2016; 2018). Além disso, um controle intensivo do carrapato para o controle indireto da doença poderá acarretar no desenvolvimento da resistência parasitária do vetor carrapato (JONSSON et al., 2000; MEKONNEN et al., 2002). Apenas um pequeno número de carrapatos sobreviventes após tratamentos acaricidas já podem ser suficientes para causar um surto da doença (WAAL & COMBRICK, 2006). Outro grande problema associado aos métodos de prevenção do carrapato vetor e dos agentes da babesiose bovina é a preocupação com resíduos dos medicamentos na carne e no leite.

Diante disso, uma das formas de prevenção mais eficaz é através do cruzamento de raças taurina com zebuínas, visto que as raças zebuínas possuem maior resistência as hemoparasitoses e as raças taurinas possuem melhor aptidão para a produção. Assim, 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 e comparados os níveis de infecção natural por *B. bovis* e as contagens do carrapato *Rhipicephalus microplus* em bezerros dos grupos genéticos Angus (100% taurino) e Ultrablack (82% Angus e 18% zebuino) no intuito de verificar se a presença do sangue zebuino poderia influenciar na infecção por *B. bovis* e nas infestações por carrapatos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

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

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% zebuino) e 2 $\frac{3}{4}$ Angus x $\frac{1}{4}$ zebuino. 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).

2.2. Colheita de amostras de sangue e contagens de carrapatos

De cada animal, foram colhidas amostras de sangue usando tubos a vácuo com anticoagulante EDTA, e foram submetidos a extração de DNA. Foram contadas todas as fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* com tamanho igual ou maior que 4,5mm de diâmetro, presentes no lado esquerdo do corpo dos animais (UTECH et al., 1978; HERMANS et al., 1994).

2.3. Extração de DNA

As amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA genômico utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega™), seguindo o protocolo descrito no kit de isolamento de DNA genômico 3.A (Isolamento de DNA genômico a partir de 300 uL de sangue total). A concentração e pureza das amostras de DNA foram determinadas por meio de espectrofotômetro BioDrop µLITE (BioDrop). Todas as amostras de DNA foram diluídas em tampão TE (Tris-EDTA pH 7,8) na proporção 1:4 (DNA:TE) e foram armazenadas em freezer -20°C até o momento das análises.

2.4. PCR quantitativa (qPCR)

A quantificação absoluta do número de cópias do DNA (NC) de *B. bovis* foi realizada conforme descrito por OKINO et al. (2018), cujos primers e sondas flanqueiam parte do gene mitocondrial do citocromo b e produzem amplicons de 98 pares de base: primer forward: 5'-TTCCTGGAAGCGTTGATTCT-3'; primer reverse: 5'-AAGAAACACATTGAGCGTGAAA-3'; sonda: FAM-5'-ACGCATTGCCCAACCCATATTGAC-3' BHQ1. Cada ensaio de qPCR continha um volume final de 10 µL, sendo 2 µL do Master Mix 5x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estônia), 0,5 µL de cada primer (10 µM), 1 µL de sonda de hidrólise, e 2 µL da amostra de DNA. O perfil térmico foi um passo de 10 min a 95°C (ativação enzimática), seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 s (desnaturação) e 60°C (anelamento/extensão/leitura) por 60 s. Para cada ensaio, foi construída uma curva de calibração, a partir de diluições seriadas de DNA sintético - gBlocks® Gene Fragments da Integrated DNA Technologies® (IDT). A metodologia para a construção da curva de calibração e quantificação absoluta do NC de *B. bovis* foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Giglioti et al., (2018). Os ensaios de qPCR serão realizados no equipamento Real Time CFX96 (BioRad™). As estimativas do NC foram determinadas pelo software desse equipamento baseando-se nas diluições seriadas presentes em cada curva de calibração de cada ensaio. Amostras de animais que apresentaram NC maior que zero foram considerados positivos.

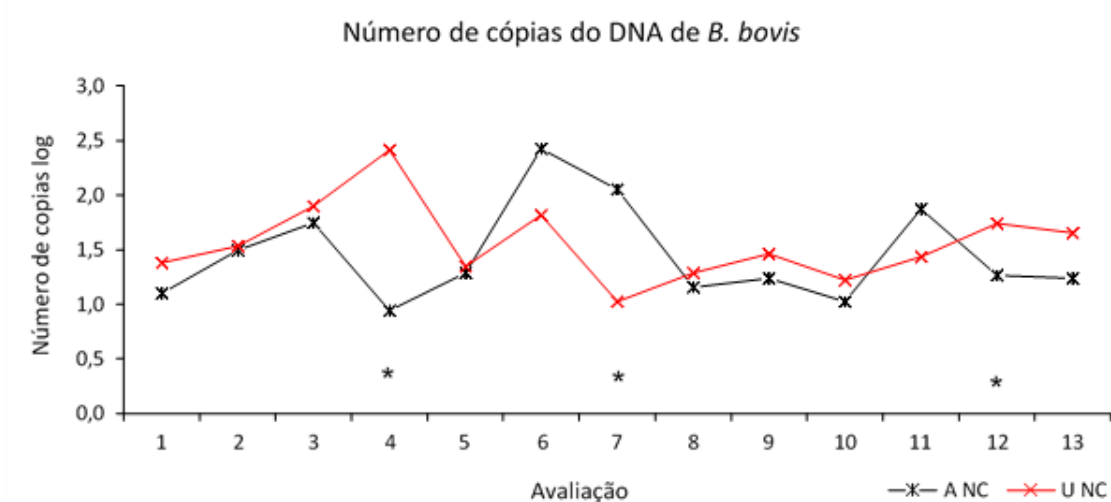
2.5. Análises estatísticas

. Os resultados da quantificação do número de cópias em log do DNA (NC) de *B. bovis* e contagens de carrapatos foram analisados por meio de modelos mistos. Os dados das contagens

de carrapatos também foram transformados em $\log_{10}(n+1)$ para a aproximação da distribuição normal dos dados. O modelo misto incluiu os efeitos fixos de grupo genético (GG), sexo, avaliação (AVA), espécie (ESP, hemoparasita e carrapato), e interações GG x ESP e GG x ESP x AVA, e o efeito de idade (meses) foi usado como co-variável. Neste modelo, foi utilizada uma estrutura da matriz de (co)variância de produto direto (UN@AR(1)) projetada para medidas repetidas multivariadas. As correlações entre os valores de NC de *B. bovis* e contagens de carrapatos e as suas repetibilidades também foram estimadas. As médias das variáveis analisadas nas diferentes avaliações ao longo do tempo e entre os grupos genéticos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). As frequências de positivos para a infecção de *B. bovis* entre os dois grupos genéticos determinada por qPCR foi analisada pelo teste de qui-quadrado ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas pelo pacote estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados analisados para as infecções (número de cópias do DNA) por *B. bovis* e contagens de carrapatos mostraram não haver diferença significativa ($P > 0,05$) entre os bezerros dos dois grupos genéticos. Embora foi encontrado efeito significativo ($P < 0,05$) da interação grupo genético e avaliação, as diferenças variaram entre os dois grupos genéticos, sendo em duas avaliações maiores para Ultrablack (4 e 12) e uma avaliação para Angus (avaliação 7) (Figura 1).



As médias seguidas de erros-padrão para o número de cópias do DNA de *B. bovis* para **Figura 1.** Distribuição do número de cópias de DNA de *B. bovis* em bezerros Angus e Ultrablack durante 13 avaliações (17/11/2021 a 19/04/2022). *=difere significativamente entre os dois grupos genéticos ($P < 0,05$).

Angus e Ultrablack foram $1,44 \pm 0,09$ e $1,55 \pm 0,10$, respectivamente. Esse estudo foi o primeiro a

estudar o nível de infecção por *B. bovis* usando esses dois grupos genéticos. Em um estudo semelhante, BILHASSI et al. (2014) estudaram o nível de infecção de *B. bovis* em bezerros e vacas Angus, Nerole e cruzados Angus x Nelore, e observaram que tanto bezerros quanto vacas do grupo genético Angus apresentam maiores infecções por *B. bovis* quando comparadas com o grupo cruzado e Nelore.

Embora as frequências de animais positivos variaram entre as avaliações, de uma maneira geral, as frequências de positivos não difeririam entre os dois grupos genéticos, com exceção da avaliação 4, em que a frequência de positivos foi superior para o grupo genético Ultrablack (Figura 2).

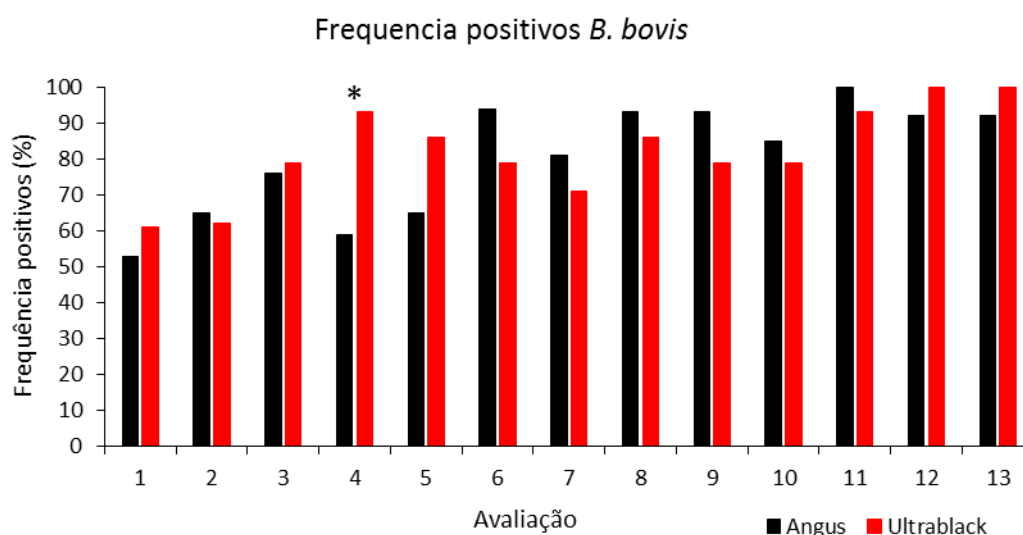


Figura 2. Distribuição das frequências de animais positivos para *B. bovis* em bezerros Angus e Ultrablack durante 13 avaliações (17/11/2021 a 19/04/2022). *=difere significativamente entre os dois grupos genéticos ($P < 0,05$).

Em relação as contagens de carrapatos, também não foi encontrada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os dois grupos genéticos (Figura 3). Embora a interação grupo genético e avaliação apresentou efeito significativo ($P < 0,05$), apenas na avaliação 10, foi verificada diferença na contagem de carrapatos entre os dois grupos, sendo a maior média encontrada no grupo Ultrablack. Ibelli et al. (2011) verificaram em infestações artificiais que bovinos mestiços Angus x Nelore apresentaram maior contagem de carrapatos quando comparados aos cruzados Senepol x Nelore e Nelore puro. Em um estudo condizido por OLIVEIRA et al. (2013) foi verificado que animais Three-Cross (1/2 Angus + 1/4 Canchim + 1/4 Nelore) apresentam maiores infestações da

raça Nelore. Embora a maior resistência de bovinos zebuínos as infestações de carrapatos esteja bem estabelecida, a pequena proporção de sangue zebuino (18%) em Ultrablack não mostrou ser suficiente para diminuir as infestações por carrapatos.

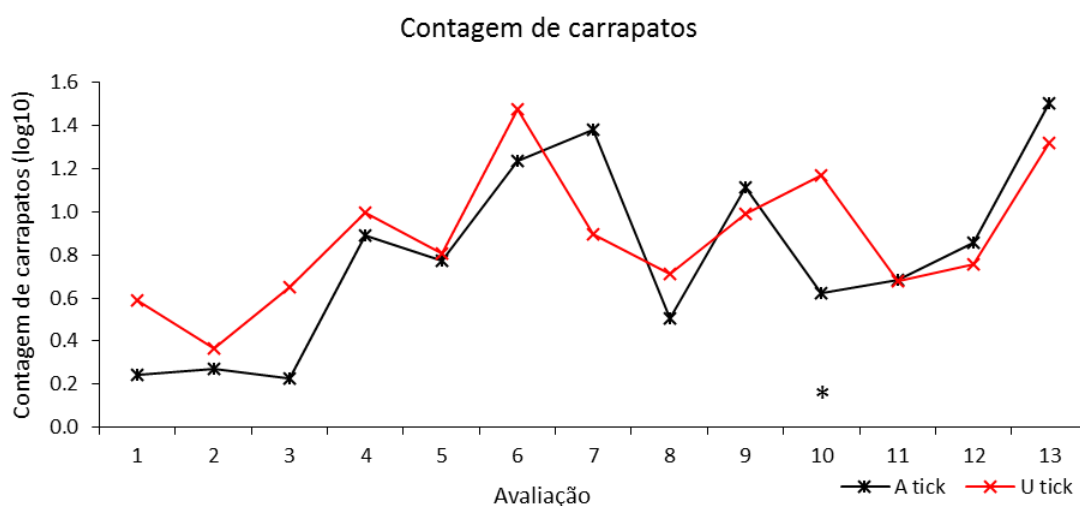


Figura 3. Distribuição do número de carrapatos em bezerros Angus e Ultrablack durante 13 avaliações (17/11/2021 a 19/04/2022). *=difere significativamente entre os dois grupos genéticos ($P < 0,05$).

A correlação estimada entre o nível de infecção por *B. bovis* e a contagem de carrapatos foi próxima de zero (0,02). Essa ausência de correlação entre essas duas medidas, sugere que a variação da parasitemia por essa espécie de *Babesia* não depende dos níveis de infestação de carrapatos ou vice-versa. Esses achados corroboram com os encontrados por GIGLIOTI et al., (2016), que ao avaliar 51 bovinos machos Angus em duas avaliações, as correlações estimadas entre a infecção por *B. bovis* e contagem de carrapatos também foram próximas de zero.

As repetibilidades estimadas para as contagens de carrapatos e NC de *B. bovis* foram 0,13 e 0,20, respectivamente. Esses resultados demonstram que tanto as infestações por carrapatos e infecção por *B. bovis* variam entre as avaliações de um mesmo indivíduo, e que a observação de infecção ou infestação a partir de uma observação não é um bom indicador da observação subsequente do mesmo animal, especialmente para a contagem de carrapatos, em que a repetibilidade estimada foi menor. Avaliando fêmeas Canchim durante 24 avaliações, GIGLIOTI et al., (2018) estimaram diferentes repetibilidades para o nível de infecção de *B. bovis*. Esses autores estimaram as repetibilidades em quatro diferentes fases de acordo com a idade dos animais, e relataram que a idade do animal pode ser um importante fator relacionado à resistência contra esses patógenos. As repetibilidades estimadas nas fases 1 (8 a 13 meses) e 3 (20 a 25 meses)



foram as mais similares a encontrada no presente estudo (0,19 e 0,17), enquanto que para as fases 2 (14 a 19 meses) e 4 (26 a 31 meses) foram maiores (0,35 e 0,31).

4. CONCLUSÃO

Os níveis de infecção por *B. bovis* e infestações por carrapatos avaliados em bezerros Angus e Ultrablack mostraram a ausência da diferença entre esses dois grupos genéticos, e que, nas condições do presente estudo, evidenciou que a presença de sangue zebuino no Ultrablack não está associada à menor infecção ou infestação por esses parasitas. A ausência de associações entre o número de cópias do DNA de *B. bovis* e com as contagens de carrapatos indica que não é possível utilizar informações de resistência a um dos parasitas para avaliação dos animais em relação aos outros parasitas. A baixa repetibilidade encontrada para as infestações por carrapatos e infecções por *B. bovis*, evidencia que a infecção ou infestação a partir de uma observação não é um bom indicador da observação subsequente do mesmo animal.

5. AGRADECIMENTOS

CNPq pela bolsa concedida e FAPESP pelo auxílio do desenvolvimento do projeto (FAPESP n. 2019/22675-6)

6. REFERÊNCIAS

- BILHASSI, T.B., OLIVEIRA, H.N., IBELLI, A.M.G., GIGLIOTI, R., REGITANO, L.C.A., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., BRESSANI, F.A., MALAGÓ, W., RESENDE, F.D., OLIVEIRA, M.C.S. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p. 234–238, 2014.
- GIGLIOTI, R., OLIVEIRA, H.N., SANTANA, C.H., IBELLI, A.M.G., NÉO, T.A., BILHASSI, T.B., RABELO, M.D., MACHADO, R.Z., BRITO, L.G., OLIVEIRA, M.C.S. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 657-662, 2016.
- GIGLIOTI, R., OLIVEIRA, H.N., BILHASSI, T.B., PORTILHO, A.I., OKINO, C.H., MARCONDES, C.M., OLIVEIRA, M.C.S. Estimates of repeatability and correlations of hemoparasites infection levels for cattle reared in endemic areas for *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 250, p. 78–84, 2018.
- HERMANS, P., DWINGER, R.H., BUENING, G.M., HERRERO, M.V. Seasonal incidence and hemoparasite infection rates of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v.42., p.623-32, 1994.



- JONSSON, N.N., MATSCHOSS, A.L., PEPPER, P., GREEN, P.E., ANSELL, J. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by cattle tick (*Boophilus microplus*), **Veterinary Parasitology**, v.89, p.297-305, 2000.
- MEKONNEN, S., BRYSON, N.R., FOURIE, L.J., PETER, R.J., SPICKETT, A.M., TAYLOR, R.J., STRYDOM, T., HORAK, I.G. Acaricide resistance profiles of single- and multi-host ticks from communal and commercial farming areas in the Eastern Cape and North-West Provinces of South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research (OJVR)**, v. 69, p. 99–105, 2002.
- OKINO, C.H., GIGLIOTI, R.G., SILVA, P.C., OLIVEIRA, H.N., OLIVEIRA, M.C.S. Comparative evaluation of DNA extraction kit, matrix sample and qPCR assays for bovine babesiosis monitoring. 2018. **Molecular Biology Reports**, v.45, p. 2671, 2018.
- OLIVEIRA, M.C.S., ALENCAR, M.M., GIGLIOTI, R., BERALDO, M.C.D., ANÍBAL, F.F., CORREIA, R.O., BOSCHINI, L., CHAGAS, A.C.S., BILHASSI ET AL, T.B., OLIVEIRA, H.N. Resistance of beef cattle of two genetic groups to ectoparasites and gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.197, p.168– 175, 2013.
- UTECH, K.B.W., WHARTON, R. H., KERR, J.D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.29, p.885, 1978.
- WAAL, D. T., COMBRINK, M. P. Live vaccines against bovine babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.138, n. 1-2, p.88-96, 2006.