

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Babesia bovis* E *Babesia bigemina* EM BOVINOS EM SISTEMA LONE TICK

STHÉPHANI ALVES BRANÇO CAMARGO¹; MHANUEL CARLOS ARIJAMA²,
DIAGO DUTRA LIMA³; KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS⁴; NATALIA MACHADO
RAHAL⁵, RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – sthephanicamargo@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – arjamamc@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – diagolima@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rahal.natalia@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas transmitidas por carrapatos afetam significativamente o desempenho produtivo dos bovinos, tanto de forma direta quanto indireta. Entre essas doenças, destaca-se a Tristeza Parasitária Bovina (TPB), um complexo causado pela transmissão dos agentes *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* (LUCENA et al., 2010). A ocorrência dessa doença está diretamente associada à presença do carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*, seu vetor principal. Esse carrapato representa uma grave ameaça à pecuária, gerando um impacto econômico estimado em US\$ 3,24 bilhões apenas na pecuária brasileira (GRISI et al., 2014).

O diagnóstico direto por meio de esfregaço sanguíneo é o mais utilizado na rotina clínica, porém esse possui baixa detecção e acurácia dependendo da parasitemia do bovino e do local de coleta do sangue.

Para o diagnóstico dessas infecções, a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) têm-se mostrado uma ferramenta altamente sensível e eficaz. Essa técnica é capaz de quantificar com precisão o número de cópias circulantes de DNA dos parasitas em diferentes amostras (MARTINS et al., 2020; RAHAL et al., 2023), fornecendo dados mais específicos para a detecção precoce de infecções. Com base nisso, o objetivo deste estudo foi comparar a eficiência do diagnóstico de esfregaço sanguíneo com qPCR na detecção de *B. bovis* e *B. bigemina* em amostras de sangue de bovinos entre os meses de abril a outubro de 2023.

2. METODOLOGIA

Amostras de sangue foram coletadas de 16 vacas mantidas em Sistema Lone Tick, o qual é um sistema de rotação de poteiros que considera o ciclo biológico do carrapato bovino, realizando troca de poteiros a cada 28 dias. A coleta foi realizada da veia jugular utilizando um adaptador de coleta à vácuo, agulha e tubos contendo anticoagulante (EDTA). Primeiramente foi realizado diagnóstico direto das amostras utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo, essas foram coradas com panótico rápido e posteriormente analisadas em microscópio óptico. Em seguida, o DNA foi extraído das amostras seguindo o protocolo descrito por Martins (2020). A quantificação e a avaliação da pureza do DNA genômico (gDNA) foram realizadas por espectrofotometria em UV, e as amostras foram padronizadas para conter 50 ng/μL de gDNA.

A quantificação do DNA por qPCR foi conduzida utilizando o dispositivo de PCR em tempo real CFX Opus 96™ em placas de 96 poços (Bio-Rad). O volume final de poço foi 10 µL, composto por: 5 µL de Master Mix Taqman/Probe com ROX (Quatro G Biotecnologia, Porto Alegre), 1 µL de cada primer (*forward* e *reverse*), 0,5 µL de sonda, 0,5 µL de água ultrapura estéril (*Nuclease-Free*) e 2 µL da amostra diluída a 50 ng/µL. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências de primers e probe utilizados para detecção de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em sangue de bovinos.

5'- 3'	<i>Babesia bovis</i> ^a	<i>Babesia bigemina</i> ^a
Forward Primer	GGATTGTGGTACTCAAGCAGATA	TGTTCCAGGAGATGTTGATTCTT
Reverse Primer	CCGTAAGGAAGAACATAACCTAAG	AGCATGGAAATAACGAAGTGC
Probe ^b	A [6FAM] ACCATGGTCATGGTATTCTGGAAT GGT [BHQ1]	[6FAM] CGAGTGTGTTATCAGAGTA TTAACTGAGGT [BHQ1]

^aBULING et al., 2007; ^bMARTINS et al., 2022).

O método de corrida era composto por uma etapa inicial de 95 °C por 2 minutos, seguida por 45 ciclos de 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 1 minuto. As amostras foram analisadas em duplicata, assim como os controles positivo e negativo. No controle negativo, 2 µL de água foram adicionados no lugar da solução de DNA.

Os dados foram processados utilizando os dados do software Bio-Rad CFX Maestro 2.3 (Bio-Rad Laboratories). O número de cópias de DNA foi calculado conforme descrito por KE *et al.*, (2006): $CN = [6,022 \times 10^{23} \text{ (cópias/mol)} \times \text{concentração (g/mol)}] / \text{massa molecular (g/L)}$, onde $6,022 \times 10^{23}$ é a constante de Avogadro, e a massa molecular é o peso molecular médio do DNA de fita dupla (330×2) multiplicado pelo tamanho do fragmento clonado. Os dados foram transformados utilizando a função logarítmica $\log(n+1)$, com o objetivo de reduzir a assimetria e aproximar os dados de uma distribuição normal.

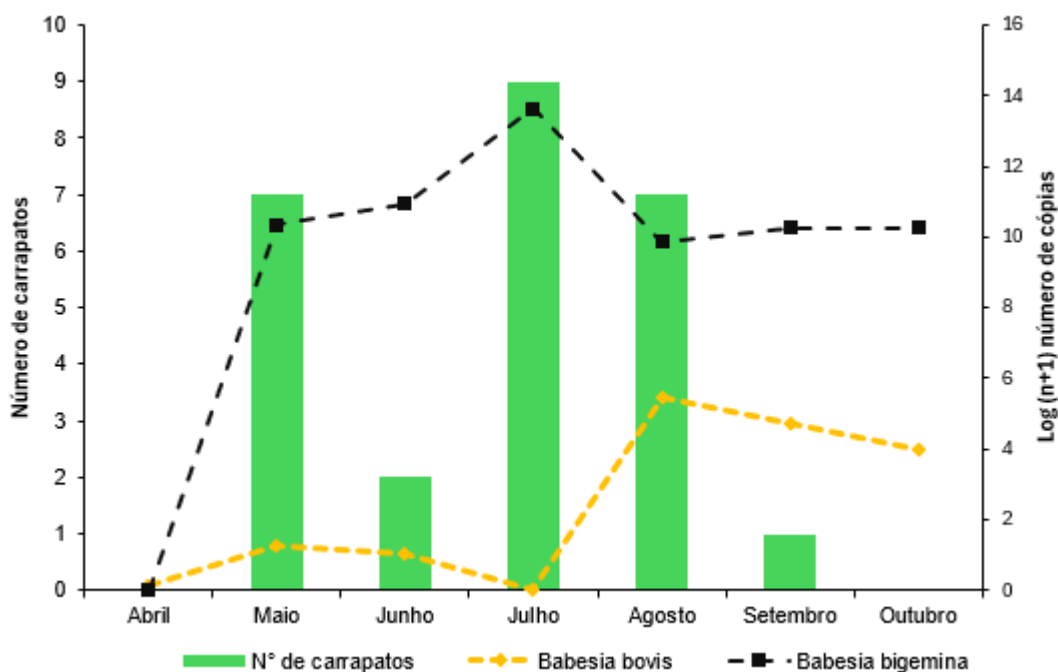
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os diagnósticos diretos realizados por esfregaço sanguíneo não detectaram *B. bovis* e *B. bigemina* em todas as tentativas. Porém, a qPCR detectou ambos os agentes mesmo em quantidade baixa. Com relação ao número de cópias de DNA pode-se observar que a quantidade de *B. bigemina* foi maior quando comparado com *B. bovis* circulante nos meses analisados. Os maiores valores encontrados foram $2,72 \times 10^5$ e $4,18 \times 10^{13}$ para *B. bovis* e *B. bigemina* nos meses de setembro e agosto, respectivamente (Tabela 2). No mês de abril não foi detectado a presença de *B. bigemina* e em julho não foi detectado *B. bovis*. Na figura 1 os dados demonstrados relacionam o número de cópias de DNA para *B. bovis* e *B. bigemina* com o número médio de carrapatos de acordo com os meses, desde abril a outubro de 2023.

Tabela 2: Número de cópias de DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* detectados em bovinos em sistema de rotacionado (ou sistema Lone Tick).

Mês/Ano	<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia bigemina</i>
Abril/2023	2.96E-01	0.00E+00
Mai/2023	1.68E+01	2.25E+10
Junho/2023	9.82E+00	8.91E+10
Julho/2023	0.00E+00	4.18E+13
Agosto/2023	2.72E+05	7.29E+09
Setembro/2023	5.14E+04	1.78E+10

Figura 1: Número de cópias de DNA e número de carrapatos de acordo com os meses e agentes.



É de importância salientar que mesmo tendo detectado os agentes *B. bovis* e *B. bigemina* durante os meses analisados, os bovinos não apresentaram nenhum sinal clínico de TPB durante esse período.

No trabalho de MARTINS et al., (2022) e RAHAL et al., (2023) encontraram maior quantidade de *B. bigemina* em bovinos de diferentes sistemas de criação, esses trabalhos corroboram com os dados encontrados nesse estudo em que há circulação dos agentes mas não há sintomatologia clínica. Estes fatores contribuem para a importância do uso de técnicas mais robustas para detectar a circulação dos agentes em rebanhos brasileiros.

4. CONCLUSÕES

O número de cópias de DNA dos protozoários variou ao longo dos meses avaliados. Maior número de cópias de *B. bigemina* foram detectados nos meses

de maio a agosto, enquanto para *B. bovis*, de agosto a outubro notou-se maior nível de infecção.”

A técnica de qPCR quantitativo foi mais sensível do que o esfregaço sanguíneo para a detecção de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* apresentando maior acurácia. Essa ferramenta torna possível a detecção desses agentes mesmo na fase inicial da infecção, o que faz com que o diagnóstico e tratamento seja precoce e assertivo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BULING A, CRIADO-FORNELIO A, ASENZO G, BENITEZ D, BARBACARRETERO JC, FLORIN-CHRISTENSEN M. Um ensaio quantitativo de PCR para a detecção e quantificação de *Babesia bovis* e *B. bigemina*. **Vet Parasitol.** 2007; 147:16–25.

GRISI, L, LEITE, R. C, MARTINS, J. R. S, BARROS, A. T, ANDREOTTI, R, CANÇADO, P. H, et al. Reassessment of the potential economic impact of the cattle parasites in Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet** 2014; 23(2): 150-156. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014042>. PMID:25054492.

GIGLIOTI R, OLIVEIRA HN, SANTANA CH, IBELLI AMG, NÉO TA, BILHASSI TB, et al. Babesia bovis and Babesia bigemina infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks Tick Borne Dis** 2016; 7(5): 657-662. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.011](http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.011). PMID:26907097

KE, G. M, CHENG, H. L, KE, L. Y, JI, W. T, CHULU, J. L, LIAO, M. H et al. Development of a quantitative Light Cyclers real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. **J Virol Methods** 2006; 133(1): 6-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.09.011> PMID:16300834. »
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.09.011>

LUCENA, R. B, PIEREZAN, F, KOMMERS, G. D, IRIGOYEN, L. F, FIGHERA, R. A, BARROS, C. S. L. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesq Vet Bras** 2010; 30(5): 428-434. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000500010>.

MARTINS, K. R, GARCIA M. V, BONATTE-JUNIOR, P, DUARTE P. O, HIGA L. O. S, CSORDAS BG, et al. Correlation between Rhipicephalus microplus ticks and Anaplasma marginale infection in various cattle breeds in Brazil. **Exp Appl Acarol** 2020; 81(4): 585-598. [http://dx.doi. org/10.1007/s10493-020-00514-1](http://dx.doi.org/10.1007/s10493-020-00514-1). PMID:32681278.

RAHAL, N. M., LUZ, G. B., MARTINS, K. R., GASPERIN, B. G., FEIJÓ, J. de O., DALTO, A. G. C., ROVANI, M. T., CUNHA, R. C., & CORRÊA, M. N.. (2023). Association between chronic *Anaplasma marginale* and *Babesia* spp. infection and hematological parameters of taurine heifers. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*, 32(3), e006423. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023052>