

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“ESTUDO QUANTITATIVO DA INFECÇÃO POR *Babesia bovis*
E *Babesia bigemina* EM DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS
DE BOVINOS DE CORTE”**

Talita Barban Bilhassi
Zootecnista

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Setembro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“ESTUDO QUANTITATIVO DA INFECÇÃO POR *Babesia bovis*
E *Babesia bigemina* EM DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS
DE BOVINOS DE CORTE”**

Talita Barban Bilhassi

**Orientador: Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira
Co-orientadora: Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Setembro de 2011

Bilhassi, Talita Barban

B595e **ESTUDO QUANTITATIVO DA INFECÇÃO POR *Babesia bovis* E *Babesia bigemina* EM DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS DE BOVINOS DE CORTE**

Jaboticabal, Setembro de 2011
x, 75 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Henrique Nunes de Oliveira

Banca examinadora: Márcia Cristina de Sena Oliveira, Maria
Eugênia Zerlotti Mercadante, Gilson Pereira de Oliveira
Bibliografia

1. Gado de corte. 2. Grupos genéticos. 3. Hemoparasitas.
4. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br

DADOS CURRILARES DA AUTORA

TALITA BARBAN BILHASSI - natural de Ribeirão Preto, SP nascida em 7 de Maio de 1984. No ano de 2004, ingressou no curso de Graduação em Zootecnia, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Nos dois últimos anos da faculdade, foi estagiária do Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR) situado na própria universidade, onde desenvolveu seu projeto de Iniciação Científica na Área de Produção Animal, sendo bolsista FAPESP no último ano deste período. Realizou estágio de conclusão de curso na Área de Nutrição de Cães e Gatos, na empresa Royal Canin do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Descalvado, SP, se tornando Zootecnista em Dezembro de 2008. Em Agosto de 2009, ingressou no curso de Pós-graduação em Zootecnia pelo programa de Genética e Melhoramento Animal, na mesma instituição de ensino. Realizou a parte experimental de seu projeto de Mestrado no Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa de São Carlos, SP. Inicialmente, recebeu apoio financeiro da CAPES e posteriormente, se tornou bolsista FAPESP até a conclusão deste curso. Em Setembro de 2011, obteve o título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

UM SONHO NUM SONHO

Este beijo em tua fronte deponho!
Vou partir. E bem pode, quem parte,
francamente aqui vir confessar-te
que bastante razão tinhas, quando
comparaste meus dias a um sonho.
Se a esperança se vai, esvoaçando,
que me importa se é noite ou se é dia...
entre real ou visão fugidia?
De maneira qualquer fugiria.
O que vejo, o que sou e suponho
não é mais do que um sonho num sonho.

Fico em meio ao clamor, que se alteia
de uma praia, que a vaga tortura.
Minha mão grãos de areia segura
com bem força, que é de ouro essa areia.
São tão poucos! Mas fogem-me pelos
dedos, para a profunda água escura.
Os meus olhos se inundam de pranto.
Oh! Meu Deus! E não posso retê-los,
Se os aperto na mão, tanto e tanto?
Ah! Meu Deus! E não posso salvar
um ao menos da fúria do mar?
O que vejo, o que sou e suponho
será apenas um sonho num sonho?

Edgar Allan Poe

Aos meus queridos avós Jesué e Aparecida Barban, Júlio e Aparecida Bilhassi, que com muito amor, sabedoria e simplicidade me ensinaram valiosas lições de vida.

Aos meus pais Josoel Antônio e Cláudia Maria, que com muito amor e carinho estão sempre ao meu lado me apoiando, me incentivando e vibrando a cada conquista profissional.

Às minhas queridas irmãs Tatiana e Taioma, pelo amor e cumplicidade que nos une.

Às minhas sobrinhas adoradas Gabrielle, Victória e Isabelle, pelos momentos de alegrias, felicidades e descobertas.

Aos meus queridos tios Cláudio Antônio e Clélia Lúcia, pelo exemplo de vida, além do carinho que sempre tiveram comigo.

À minha família maravilhosa, especialmente, daqueles que acompanharam de perto a minha trajetória e que acreditaram que meus sonhos eram passíveis de serem realizados.

Ao meu amor Marcelo Rodrigo, pelo carinho, compreensão e paciência em que me ajudou a enfrentar os momentos difíceis, sendo meu grande companheiro.

Com amor e carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, queria agradecer ao Divino Pai Eterno, a Mãe Maria Santíssima e ao meu Anjo de Guarda, por iluminarem meus passos e me fortalecerem nos momentos de angústia.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Unesp, Câmpus de Jaboticabal e aos docentes da Pós-graduação, pelo aprendizado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo possibilitando a realização desse projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira, por compartilhar comigo todo o seu conhecimento. Agradeço a paciência e o respeito em que me foram dispensados nos anos em que fui sua orientada.

À Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira, minha co-orientadora no CPPSE-Embrapa de São Carlos, SP, por quem tenho grande admiração. Agradeço pelos ensinamentos, amizade e intensa dedicação ao meu trabalho de dissertação.

Ao Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira, pelo carinho e amizade que desde a graduação me acompanha e torce pelo meu sucesso profissional. Agradeço pelas doces e sábias palavras de quem têm um pouco mais de experiência.

Ao Prof. Dr. Danísio Prado Munari, pela amizade e conselhos sempre que solicitados.

Ao Prof. Dr. Rogério Abdala Curi do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ-Unesp, Câmpus de Botucatu, pela atenção e sugestões na correção do texto.

Aos proprietários e funcionários responsáveis pelo manejo dos rebanhos das fazendas visitadas, por disponibilizarem seus animais e auxiliarem na coleta do material biológico.

Aos colaboradores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa de São Carlos, SP, especialmente do Laboratório de Biotecnologia Animal, Flávia Gilbertinho e Wilson, pela atenção e ensinamentos.

À Adriana, por sua inestimável ajuda e participação no desenvolvimento de todos os protocolos empregados nas análises moleculares desse projeto de pesquisa. Além disso, pela paciência despendida em transmitir seu conhecimento.

Às minhas irmãs do coração Ana Carolina, Giovanna, Natália e Patrícia, pelos momentos inesquecíveis em que passamos juntas durante a graduação.

Às minhas amigas de república Ana Carolina, Anita e Viviane, pela amizade e por todos os momentos de alegria e descontração.

Aos meus queridos amigos Francisco, Iara, Juliana, Lídia, Manuela, Matilde Patrícia e Rodrigo, pelo carinho, companheirismo e amizade.

Aos colegas da Pós-graduação do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, do programa de Genética e Melhoramento Animal.

E, daqueles que embora distantes, contribuíram de alguma maneira com esse trabalho de dissertação.

A todos vocês, muito obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. As babesioses bovinas	8
2.1.1. História	8
2.1.2. Ciclo biológico	9
2.1.3. Sintomatologia clínica	12
2.1.4. Patogenia	12
2.1.5. Perdas econômicas	13
2.1.6. Controle	14
2.1.7. Epidemiologia	15
2.1.8. Resistência versus categoria animal	17
2.1.9. Diagnóstico	17
2.2. Resistência de animais <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i> aos carrapatos e às babesias	21
2.2.1. Resistência entre subespécies aos carrapatos	21
2.2.2. Resistência das subespécies às babesias	24
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Animais experimentais	27
4.1.1. Aberdeen Angus	27
4.1.2. Nelore e bezerros cruzados	28
4.1.3. Vacas cruzadas	29
4.2. Coleta do material biológico e aferição da temperatura corporal	30
4.3. Análises laboratoriais	31

4.4. Avaliação dos exames hematológicos	31
4.5. Elaboração da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) e Reação de Nested PCR (nPCR)	32
4.5.1. Extração do DNA	32
4.5.2. Avaliação do DNA	33
4.5.3. Padronização da PCR	33
4.5.4. Padronização da qPCR	34
4.5.5. Padronização da PCR e Nested PCR para <i>B. bigemina</i> em bovinos Nelore	35
4.5.6. PCR	36
4.5.7. qPCR	38
4.5.8. Elaboração da curva de calibração	39
4.5.9. PCR e Nested PCR para <i>B. bigemina</i> em bovinos Nelore	41
4.6. Análise estatística	42
5. RESULTADOS	44
5.1. Informações clínicas e hematológicas	44
5.2. Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)	46
5.2.1. Sensibilidade e especificidade da qPCR.....	46
5.2.2. qPCR das amostras de sangue	49
5.2.3. <i>Babesia bovis</i>	49
5.2.4. <i>Babesia bigemina</i>	51
5.3. PCR e nPCR em bovinos Nelore	52
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	61
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	62

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1. Sequência de nucleotídeos dos “primers” utilizados na amplificação do DNA de <i>Babesia bigemina</i> e <i>Babesia bovis</i> e o comprimento dos produtos de amplificação	34
Quadro 2. Sequência dos nucleotídeos dos “primers” utilizados na amplificação do DNA do gene endógeno e o comprimento do produto de amplificação	35
Quadro 3. Sequência dos nucleotídeos dos “primers” utilizados na amplificação do DNA de <i>Babesias spp.</i> e <i>Babesia bigemina</i> e o comprimento dos produtos de amplificação	36
Quadro 4. Sequência de ciclos adotado no ABI 7500 Real Time PCR System	38

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Médias dos quadrados mínimos e erros padrão para as temperaturas, de acordo com o grupo genético e a categoria animal	45
Tabela 2. Médias dos quadrados mínimos e erros padrão para o volume globular (VG), de acordo com o grupo genético e a categoria animal	46
Tabela 3. Médias dos quadrados mínimos do logaritmo (base 10) do número de cópias de DNA alvo de <i>Babesia bovis</i> obtidos pela técnica de qPCR e os respectivos erros padrão, de acordo com os grupos genéticos e categorias	50
Tabela 4. Médias dos quadrados mínimos do logaritmo (base 10) do número de cópias de DNA alvo de <i>Babesia bigemina</i> obtidos pela técnica de qPCR e os respectivos erros padrão, de acordo com os grupos genéticos e categorias	52

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Merozoítas de <i>Babesia bigemina</i> em esfregaço de sangue corado com Giemsa	44
Figura 2. Curva padrão obtida a partir da regressão linear para <i>B.bovis</i>	47
Figura 3. Curva padrão obtida a partir da regressão linear para <i>B. bigemina</i>	47
Figura 4. Curva de melting para <i>Babesia bovis</i> obtida pela qPCR	48
Figura 5. Curva de melting para <i>Babesia bigemina</i> obtida pela qPCR	48
Figura 6. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de <i>Babesia bigemina</i> pelas técnicas de PCR e nPCR	53

RESUMO

A Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) foi utilizada para avaliar o nível de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos de corte. Foram utilizados 149 animais, sendo 74 bezerros e 75 vacas de três grupos genéticos diferentes (puros *Bos indicus*, $\frac{1}{2}$ *Bos indicus* + $\frac{1}{2}$ *Bos taurus* e puros *Bos taurus*). Os resultados obtidos foram analisados com o objetivo de verificar se ocorrem variações entre os grupos genéticos e faixas etárias estudadas quanto ao nível de infecção por babesias. De cada bovino foram colhidas amostras de sangue da veia jugular e vasos periféricos, para extração de DNA, determinação do volume globular (VG) e confecção de esfregaços sanguíneos. As amostras de DNA extraídas de sangue venoso, colhidas com anticoagulante EDTA foram submetidas à amplificação pela técnica de qPCR, utilizando sequências iniciadoras específicas para *B. bovis* e *B. bigemina*. Pelo exame microscópico de esfregaços sanguíneos verificou-se que, nenhum animal adulto apresentou parasitemia patente por *Babesia spp.* Nos bezerros foram diagnosticados 10,8% de infecção por *B. bigemina* (8/74), sendo 26,1%, 3,8% e 4% para os grupos genéticos Angus, cruzados e Nelore, respectivamente. A taxa de infecção por *B. bovis* diagnosticados pela técnica de qPCR nos bovinos estudados foi de 98,0% (146/149), sendo 100,0%, 98,0% e 96,0% para os grupos genéticos Angus, cruzados e Nelore, respectivamente. As análises estatísticas do nível de infecção medido pelo número de cópias de DNA alvo nas amostras mostraram significância ($P < 0,05$) dos três fatores avaliados: grupo genético, categoria e a interação entre eles. Foi possível observar ainda que bovinos *Bos taurus* apresentaram maior suscetibilidade às infecções por *Babesia bovis* e que a quantidade de DNA alvo desta espécie de protozoário em bezerros, foi significativamente ($P < 0,05$) superior ao de vacas. Para *B. bigemina*, apenas amostras de DNA de bovinos $\frac{1}{2}$ *Bos indicus* + $\frac{1}{2}$ *Bos taurus* e puros *Bos taurus* foram avaliados pela técnica de qPCR, devido a baixa concentração do DNA alvo. Os resultados observados nesses grupos genéticos mostraram que, a taxa de infecção por este protozoário para os 99 bovinos considerados foi de 100,0%. A

quantidade de DNA alvo de *B. Bigemina*, detectado pela técnica de amplificação do DNA de sangue de bezerros foi superior ($P < 0,05$) a das vacas. Os animais cruzados apresentaram um nível de infecção menor quando comparados aos *Bos taurus*, que mostraram maior susceptibilidade às infecções por *B. bigemina*. A amplificação do DNA em amostras de sangue de *Bos indicus* pela técnica de Nested PCR (nPCR) apresentou alta sensibilidade. A taxa de infecção por *B. bigemina* foi de 92,0% (46/50). Este método permitiu o diagnóstico da infecção em todos os bezerros Nelore, sendo que na categoria adulta, apenas 4 vacas não apresentaram parasitemia patente por *B. bigemina*.

Palavras-chave: gado de corte, grupos genéticos, hemoparasitas, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

ABSTRACT

The Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time (qPCR) was used to assess the level of infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in beef cattle. We used 149 animals, 74 calves and 75 cows from three different genetic groups (*Bos indicus* pure, $\frac{1}{2}$ *Bos indicus* + $\frac{1}{2}$ *Bos taurus* and *Bos taurus* pure). The results were analyzed with the objective of determining if there are variations between genotypes and age groups in the level of infection with babesias. Each calf was sampled blood from the jugular vein and peripheral vessels for DNA extraction, packed cell volume (VG) and preparation of blood smears. DNA samples extracted from venous blood collected with EDTA anticoagulant were subjected to qPCR amplification technique using sequence specific primers for *B. bovis* and *B. bigemina*. By microscopic examination of blood smears showed that no adult animals presented patent parasitemia by *Babesia spp.* Calves were diagnosed in 10.8% of infection by *B. bigemina* (8/74), and 26.1%, 3.8% and 4% for the Angus genetic groups, crossbred and Nellore, respectively. The rate of infection by *B. bovis* diagnosed by qPCR technique in cattle studied was 98.0% (146/149), and 100.0%, 98.0% and 96.0% for Angus genetic groups, crossbred and Nellore, respectively. Statistical analysis of the level of infection measured by the number of copies of target DNA in the samples showed significant ($P < 0.05$) evaluated the three factors: genetic group, category and the interaction between them. It was also possible to observe that *Bos taurus* cattle showed greater susceptibility to infections by *Babesia bovis* and the amount of target DNA of this species of protozoa in calves, was significantly ($P < 0.05$) higher than in cows. To *B. bigemina*, only DNA samples from cattle $\frac{1}{2}$ *Bos indicus* + $\frac{1}{2}$ *Bos taurus* and *Bos taurus* pure technique were assessed by qPCR, due to low concentration of target DNA. The results observed in these genetic groups showed that the rate of infection by this parasite for the 99 animals considered was 100.0%. The amount of target DNA of *B. Bigemina*, detected by the technique of DNA amplification of blood of calves was higher ($P < 0.05$) in cows. The crossbred animals showed a lower level of infection when compared to *Bos taurus*, which showed increased susceptibility

to infection by *B. bigemina*. The amplification of DNA in blood samples from *Bos indicus* by the technique of Nested PCR (nPCR) had a high sensitivity. The rate of infection by *B. bigemina* was 92.0% (46/50). This method allowed the diagnosis of infection in all calves Nellore, and in the adult category, only four cows had no patent parasitemia by *B. bigemina*.

Keywords: beef cattle, genetic groups, hemoparasites, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

1. INTRODUÇÃO

Nas regiões dos trópicos, o sucesso na atividade pecuária é dependente de vários fatores, dentre eles os que estão relacionados ao potencial de produção e à capacidade de aclimação dos animais ao ambiente, para que possam expressar todo o seu potencial genético. Porém, as enfermidades parasitárias constituem um fator limitante para o desenvolvimento da bovinocultura em países inseridos nesta faixa do globo terrestre. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e os agentes da tristeza parasitária bovina, além de promoverem uma queda drástica na produtividade, podem provocar alta mortalidade entre os animais menos resistentes.

Estima-se que 400 milhões de bovinos manejados em regiões subtropicais e tropicais no mundo estão sujeitos às infecções ocasionadas pelas espécies do gênero *Babesia spp.* (WRIGHT et al., 1989).

As babesioses bovinas constituem-se nas principais enfermidades transmitidas pelo carrapato *R. (B.) microplus*, que se distribui amplamente nos países da América Latina (MONTENEGRO-JAMES et al., 1995). No Brasil, a *Babesia bovis* e a *Babesia bigemina* são os agentes etiológicos da doença.

Estes hematozoários invadem e se multiplicam no interior dos eritrócitos provocando hemólise, e assim os animais acometidos apresentam quadros clínicos de anemia, hemoglobinúria, icterícia, prostração e hipertermia.

Os bovinos possuem mecanismos de defesa de origem humoral que conferem a eles resistência às babesioses. Além das constantes inoculações que estimulam a produção de anticorpos, existem outros fatores que podem reduzir ou elevar a suscetibilidade dos animais à doença, dentre eles podemos mencionar fatores nutricionais, estresse (FARIAS, 1995), flutuações na população do carrapato vetor, práticas de manejo (MAHONEY & ROSS, 1972), raça e idade dos animais (ALONSO et al., 1992).

Com relação à subespécie, a maior resistência de bovinos *Bos indicus* e cruzados com *Bos taurus* às *babesias* tem sido verificada. Entretanto, variações dentro

das subespécies têm sido observadas, constituindo uma área da pesquisa de grande interesse em melhoramento genético e parasitologia veterinária (JONSSON et al., 2008).

Com o objetivo de intensificar a exploração bovina com fins lucrativos, tornando os produtores cada vez mais competitivos frente às exigências do mercado consumidor, os pecuaristas têm adquirido animais de alto mérito genético. Entretanto, a babesiose além de causar uma série de prejuízos à bovinocultura nacional, também gera restrições quanto à introdução de animais *Bos taurus*, constituindo-se num obstáculo à intensificação da pecuária no Brasil.

Embora haja diversos estudos sobre a resistência de bovinos ao carrapato (FRISCH et al., 2000), existem poucos estudos sobre a resistência às babesioses. Entretanto, esta doença desempenha um papel preponderante na manutenção das infestações pelo artrópode. O risco de um programa de redução da população de carrapatos está diretamente relacionado à restrição na imunidade dos animais aos hemoparasitas, com a criação de zonas de instabilidade endêmica o que poderia ter graves conseqüências para os rebanhos criados nessas áreas. Somente seria seguro reduzir substancialmente as populações do vetor se fosse possível aumentar a resistência dos animais contra os agentes da “Tristeza Parasitária Bovina” (TPB).

O principal método empregado para o diagnóstico das babesioses é por meio do exame microscópico de esfregaços sanguíneos, colhidos de vasos periféricos. Os testes sorológicos constituem os métodos indiretos de diagnóstico, que detectam anticorpos sintetizados pelo organismo dos bovinos contra os agentes infecciosos. Estes exames são utilizados em levantamentos epidemiológicos demonstrando o grau de proteção de um determinado rebanho frente aos protozoários (FARIAS, 1995).

Recentes inovações tecnológicas na área da biologia molecular possibilitaram, a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (qPCR). Este método, além de diagnosticar as babesioses bovinas, permite obter uma estimativa aproximada do grau da parasitemia dos animais, mediante a amplificação de uma sequência de DNA específica, sendo considerada de alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.

O controle é baseado principalmente no combate ao vetor da doença, o carrapato *R. (B.) microplus*. No entanto, o uso de acaricidas como ferramenta exclusiva de controle tem seu futuro comprometido, devido ao progressivo aumento no número de casos de resistência aos princípios químicos usados e a falta de perspectivas para o desenvolvimento de novas moléculas. Além disso, a presença de resíduos de medicamentos nos produtos de origem animal é apontada como um grave problema para a saúde pública e para a comercialização dos produtos de origem animal.

Desta forma, o melhor entendimento das relações existentes entre parasita-hospedeiro, especialmente com respeito à estimativa do nível de infecção entre grupos genéticos das diferentes subespécies, fornecerá subsídios para o estabelecimento de métodos mais efetivos de controle das hemoparasitoses causadoras das babesioses bovinas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As babesioses bovinas

2.1.1. História

Do ponto de vista epidemiológico, as infecções causadas por *Babesia spp.* são descritas conforme a dinâmica populacional do carrapato, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo o bovino o principal hospedeiro vertebrado (BOCK et al., 2004).

Esta espécie é originária da Ásia, foi descrita por Canestrini em 1887, sendo introduzida no Brasil juntamente com os bovinos trazidos pelos portugueses, ainda no século XVI (LABRUNA et al., 1997). O carrapato encontra-se amplamente disseminado em regiões mais apropriadas ao seu desenvolvimento, situada entre os paralelos 32° N e 32° S, estando quase todo o território brasileiro inserido em sua área de distribuição (OLIVEIRA -SEQUEIRA & AMARANTE, 2002).

Em 1888, Victor Babes e sua equipe de pesquisadores iniciaram estudos que objetivavam descobrir a causa de uma enfermidade caracterizada por um quadro de anemia hemolítica em bovinos na Romênia. Estes cientistas associaram a doença à presença de microrganismos intra-eritrocitários em animais infectados, denominando-os de *Haematococcus bovis*, pois acreditavam que bactérias fossem os agentes etiológicos desta hemoglobinúria enzoótica (UILENBERG, 2006).

No final do século XIX, as perdas ocasionadas pela “Febre do Texas” no Sul dos Estados Unidos incentivaram as investigações que culminaram na demonstração, pela primeira vez, do envolvimento de um artrópode na transmissão de protozooses. Nessa época, o prejuízo estimado pela doença foi cerca de US\$ 40 milhões a US\$ 100 milhões anuais (BOWMAN, 2010).

Em 1893, dois pesquisadores americanos, Smith & Kilborne, após observarem a ocorrência da enfermidade e os sintomas similares à doença descoberta recentemente na Europa, fizeram associações com a presença de microrganismos no interior de

eritrócitos dos animais infectados. Estes autores descobriram que o agente causador da enfermidade era um protozoário, por eles denominado de *Pyrosoma bigeminum* e comprovaram que este parasita era inoculado por um carrapato, o *Boophilus annulatus*, presente na América do Norte. Esta descoberta foi extremamente importante tanto para a área epidemiológica como para a pesquisa referente à transmissão de agentes patogênicos. Além disso, foi esse conhecimento que possibilitou a erradicação da babesiose bovina nos Estados Unidos, a partir da erradicação do transmissor, *Boophilus annulatus* (KREIER, 1977).

Em muitos países, no entanto, a erradicação do carrapato não é viável e desse modo, o conhecimento da relação parasita-hospedeiro e da epidemiologia da doença torna-se primordial para que novas técnicas de controle possam ser desenvolvidas.

Ainda em 1893, Starcovici analisando as semelhanças existentes entre os microorganismos pertencentes aos gêneros *Haematococcus* e *Pyrosoma* propôs a inclusão dos mesmos, em um novo gênero denominado de *Babesia*, em homenagem ao pesquisador romeno Victor Babes (UILENBERG, 2006).

Após a publicação destes trabalhos, a babesiose foi descoberta em vários países do mundo (BOCK et al., 2004).

No Brasil, a enfermidade foi diagnosticada pela primeira vez em 1901 por Francisco Fajardo, mediante ao exame microscópico de esfregaços sanguíneos de bovinos (FONSECA & BRAGA, 1924).

2.1.2. Ciclo biológico

O gênero *Babesia* spp. pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiorida, subordem Piroplasmorina e família Babesiidae (LEVINE, 1971; ALLSOPP et al 1994).

De acordo com LEVINE (1988), são reconhecidas mais de cem espécies deste gênero, sendo que no Brasil ocorrem exclusivamente a *B. bovis* e *B. bigemina*.

As babesias são hemoparasitas heteroxenos, ou seja, necessitam de dois hospedeiros para completarem o ciclo evolutivo. O desenvolvimento dos agentes das

babesioses bovinas nos hospedeiros vertebrados ocorre exclusivamente no interior dos eritrócitos sanguíneos. A inoculação das formas infectantes, ou esporozoítas, presentes nas glândulas salivares dos carrapatos ocorre durante o repasto sanguíneo, infectando, desta forma os bovinos. Após penetrarem nas hemácias, elas se transformam em merozoítas devido à reprodução assexuada.

A inoculação da *B. bovis* é realizada somente pelas larvas do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MAHONEY & MIRRE, 1974), enquanto que a *B. bigemina* é inoculada tanto pelas ninfas, como pelos adultos deste artrópode (CALLOW & HOYTE, 1961).

Com relação à estrutura, as babesias são piriformes, possuem três membranas, núcleo, nucléolo e, na extremidade anterior, o complexo apical com organelas (roptrias e micronemas). Nessas organelas estão presentes substâncias responsáveis pelo direcionamento e síntese de enzimas que promovem a penetração dos protozoários nas células vermelhas dos hospedeiros vertebrados. A introdução dos hemoparasitas no interior dos eritrócitos sanguíneos ocorre em cinco fases distintas: contato entre as hemácias e os esporozoítas; orientação do complexo apical na direção das células parasitadas; fusão entre as membranas do eritrócito e do protozoário; liberação do conteúdo das roptrias e; formação do vacúolo parasitóforo (KAKOMA & MELHORN, 1994).

Posteriormente, acontece a desintegração deste vacúolo promovendo a liberação dos trofozoítos, que são as formas aptas a se dividirem. Em seguida, essas formas evolutivas sofrem divisão binária, ou merogonia, dando origem a dois merozoítas. Estes por sua vez, após se reproduzirem rompem e saem da célula parasitada, possibilitando que outros eritrócitos íntegros também sejam invadidos, dando continuidade à multiplicação dos agentes da doença (BOCK et al., 2004).

No hospedeiro invertebrado, a infecção por *Babesia spp.* pode ocorrer durante o período final de parasitismo das fêmeas, ocorrendo a ingestão de sangue contendo merozoítas e pela transmissão transovariana, acarretando a infecção das progênes dessas teleóginas.

Koch e Kleine, em 1906 foram os primeiros cientistas a registrarem a existência da reprodução sexuada no gênero *Babesia spp.* ocorrida no conteúdo intestinal das fêmeas de carrapatos. Por meio de observações sistemáticas, estes pesquisadores observaram formas estranhas dos protozoários, que foram denominadas de corpos estrelados (KAKOMA & MELHORN, 1994). Ao que tudo indica as estruturas observadas pelos autores correspondia na época, ao que hoje se sabe, aos gametas das babesias. Posteriormente, surgiram vários estudos que sustentaram a hipótese de reprodução sexuada nesses hematozoários (MACKENSTEDT, 1995; RIEK, 1964).

No intestino das teleóginas, ocorre a fusão destes corpos estrelados, dando origem aos zigotos, ou oocinetos, que penetram no interior das células da parede intestinal. Os zigotos se desenvolvem e multiplicam-se por sucessivos ciclos de fissão múltipla, ou esporogonia, acarretando o rompimento das células originando os esporocinetos, ou vermículos. Estes, por sua vez, são liberados na hemocele (FARIAS, 1995).

Ao atingirem o líquido circulatório os esporocinetos se disseminam em diversos órgãos, inclusive nos ovários do artrópode, onde sofrem novos ciclos de esporogonia que persistem até a morte da teleógina, após a postura dos ovos (BOCK et al., 2004).

A disseminação dos esporocinetos em células ovarianas infecta a progênie do carrapato, estabelecendo a transmissão transovariana. Isto significa dizer que, os ovos postos pelo vetor já estarão infectados pelos agentes da doença, ocorrendo posteriormente multiplicações sucessivas nos ovos, embriões e larvas. Em *Babesia bovis*, as formas infectantes estarão presentes nas glândulas salivares cerca de dois a três dias, após a fixação das larvas no bovino. Já em *Babesia bigemina*, os esporozoítas serão formados nas glândulas salivares de ninfas e adultos, após nove dias da fixação dos mesmos (RIEK, 1964, 1966; HOYTE, 1961).

Mediante os dados registrados na literatura, a transmissão transovariana nos hospedeiros invertebrados, pode ser considerada a via de infecção em termos epidemiológicos, mais importante das babesioses bovinas em uma determinada localidade justificando, desta maneira, sua ampla disseminação em vários estados brasileiros.

2.1.3. Sintomatologia clínica

De uma maneira geral, animais infectados pelas babesias, apresentam temperatura corporal elevada e intensa anemia como sinais clínicos da doença. Como consequência, eles se tornam anoréxicos, desidratados, ictéricos e possuem a pelagem áspera.

A *Babesia bovis* se concentra nos eritrócitos localizados no interior de capilares viscerais, ocasionando doenças em virtude da obstrução do fluxo sanguíneo para órgãos vitais, tais como rins e cérebro (WRIGHT et al., 1979). Desta maneira, a anóxia nos órgãos ocorre com frequência. A sintomatologia nervosa é característica de animais infectados por esta espécie, podendo levá-los à morte em poucos dias. Quadros de incoordenação motora, agressividade, excitação, tremores musculares, ranger dos dentes e eventualmente o coma são sintomas bastante comuns acarretados por este hemoparasita (KAKOMA & MELHORN, 1994).

Em contrapartida, a *Babesia bigemina* acarreta hemólise progressiva das hemácias, sendo necessário um maior número de dias para causar o óbito de animais parasitados. A hemoglobinúria consiste na sintomatologia típica de bovinos acometidos por esta espécie, pois a hemoglobina liberada de forma gradativa em decorrência da ruptura das células vermelhas é filtrada pelos rins deixando a urina com coloração vermelho-escura (FARIAS 1995).

2.1.4. Patogenia

A *B. bovis* é considerada mais patogênica que *B. bigemina* e o grau de patogenicidade pode ainda variar com a cepa e o tamanho do inóculo (LEMOS, 1998). A gravidade da doença depende de fatores inerentes aos bovinos como idade, estado nutricional, raça e subespécie. De acordo com dados da literatura, animais pertencentes à subespécie *Bos indicus* são mais resistentes aos agentes das babesioses, quando comparados com indivíduos da subespécie *Bos taurus* (UILENBERG, 1995). No

entanto, é válido salientar que existem variações no nível de infecção dentro de raças nas diferentes subespécies.

2.1.5. Perdas econômicas

As babesioses bovinas representam economicamente, a enfermidade mais importante transmitida por um ácaro em vários países do mundo. Quando se avalia o impacto econômico que esta enfermidade acarreta, todos os fatores ligados de maneira direta ou indireta devem ser considerados. Sem dúvidas, o aspecto mais preocupante consiste no alto índice de mortalidade de uma população suscetível. Esta situação ocorre quando se introduz animais oriundos de regiões livres do artrópode em áreas consideradas endêmicas. Assim, medidas preventivas de controle devem ser instauradas no local para se prevenir eventuais surtos da doença, pois não ocorrerá o equilíbrio entre, carrapato vetor, babesias e os hospedeiros vertebrados.

As perdas econômicas geradas por essas hemoparasitoses são decorrentes do decréscimo na produção de leite, diminuição no ganho de peso e conversão alimentar dos animais infectados, baixa eficiência reprodutiva de touros e matrizes, altas taxas de morbidade e mortalidade dos indivíduos menos resistentes, consumo de carrapaticidas, além do consumo de recursos com assistência médica veterinária, dispêndio com medicamentos e tratamentos preventivos. Em suma, os prejuízos econômicos ocasionados devido à queda no desempenho produtivo dos animais irão refletir de maneira considerável na cadeia produtiva do leite e da carne.

Na América Latina, o carrapato e os protozoários transmitidos são os responsáveis por sérios prejuízos ocasionados aos criadores (NARI, 1995).

No México, a infestação pelo artrópode e das babesioses acarretam a diminuição de 48% na produção de leite e anualmente, a morte de 150 mil cabeças gado (BELTRAN, 1977).

No Uruguai, estima-se que as perdas atingem aproximadamente, a cifra de US\$ 20 a 40 milhões por ano (AZAMBUJA et al., 1994).

Na Argentina, os prejuízos anuais em áreas, onde a enfermidade ocorre de maneira endêmica foi de US\$ 6,2 por animal (GUGLIELMONE 1991).

No Brasil, o complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB - *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*) acarreta anualmente, um prejuízo econômico em torno de US\$ 500 milhões (GRISI et al., 2002). Além disso, as limitações que esta endemia impõe à expansão da criação de bovinos de raças européias em nosso país causam enormes prejuízos provenientes da maior dificuldade para intensificação desta atividade pecuária e também proveniente da menor qualidade e valor dos produtos cárneos exportados.

Estudos realizados por McLEOD & KRISTJANSON (1999), possibilitaram estimar o impacto econômico do *R. (B.) Microplus*, das babesioses e anaplasmose, em países como, Austrália, África e Ásia. Na bovinocultura da Austrália, foi calculado um prejuízo anual de aproximadamente US\$16,9 milhões, sendo este empregado apenas para controlar essas doenças. Porém, se fosse contabilizado o gasto no combate ao vetor, as perdas seriam ainda maiores. No Quênia, Zimbábwe, Tanzânia, África do Sul, China, Índia, Indonésia e nas Filipinas, os prejuízos para controlar a Tristeza Parasitária Bovina foram de 5,1; 5,4; 6,8; 21,6; 19,4; 57,2; 3,1 e; 0,6 milhões de dólares anuais, respectivamente.

2.1.6. Controle

O controle das babesioses no Brasil tem sido baseado principalmente no uso de acaricidas contra *R. (B.) microplus* e por meio de métodos imunoprolifáticos, tais como, vacinação e premunição.

Com relação aos carrapatos, o uso de acaricidas representa o método mais adotado pelos criadores no combate ao vetor biológico da doença. Porém, a utilização indiscriminada destes medicamentos, além de contaminarem os produtos de origem animal e se acumularem no ambiente, eleva a resistência dos carrapatos aos principais componentes da fórmula, tornando-os ineficazes, bem como os custos de produção (JONSSON et al., 2007; JONSSON & HOPE., 2007).

Os carrapaticidas como ferramenta exclusiva de controle ao artrópode, têm seu futuro comprometido devido ao progressivo aumento do número de casos de resistência aos componentes da fórmula e a falta de perspectiva na descoberta de novas moléculas com propriedades quimioterápicas. Além disso, há de se considerar a inexistência de um plano nacional de controle e/ou erradicação do carrapato e a extensão de sua distribuição no território brasileiro, como obstáculos ao controle das babesioses por meio do combate ao vetor.

Na vacinação, ocorrem à imunização de bovinos suscetíveis contra os hemoparasitas, provenientes de áreas livres com cepas vivas atenuadas. A premunição consiste em inocular sangue de animais portadores sadios, em animais menos resistentes do rebanho (CONNAWAY e FRANCINES, 1899).

Os métodos imunoprolifáticos apresentam, entre outros inconvenientes, resultados variáveis, não impedindo, com freqüência, a ocorrência de perdas significativas. Os principais problemas que são freqüentemente registrados pela utilização das vacinas disponíveis no mercado, são a irregularidade dos níveis de proteção conferidos em relação ao desafio subsequente e a instabilidade da imunidade. As originárias de proteínas específicas, se encontram em fase experimental (BROWN et al., 2006) e, portanto, indisponível para uso a campo. Em relação à premunição, o inconveniente é o elevado índice de mortalidade em bovinos adultos, por serem menos resistentes, já que este procedimento deve ser realizado em bezerros, com idade ao redor dos seis meses (FARIAS, 1995).

2.1.7. Epidemiologia

As observações de prevalência das *Babesia spp.* em determinada área são fundamentais para se predizer a situação epidemiológica do local, indicando se há uma situação de controle ou de epidemia. Além disto, o conhecimento da interação entre o carrapato vetor, agentes da doença e o hospedeiro vertebrado é de extrema importância para que sejam adotadas medidas profiláticas adequadas, minimizando as perdas.

Em termos epidemiológicos, as regiões de ocorrência de babesioses bovinas são classificadas em áreas livres, áreas de estabilidade ou de instabilidade endêmica, dependendo, primariamente, da dinâmica populacional dos carrapatos vetores (MAHONEY e ROSS, 1972).

As áreas livres são caracterizadas pela inexistência do *R. (B.) microplus*, onde as condições ambientais adversas impedem o fechamento do ciclo biológico deste artrópode e sendo assim, a parasitemia não ocorre.

A estabilidade endêmica é a situação em que a transmissão do protozoário é freqüente e a infecção primária dos animais ocorre durante o período em que eles são muito jovens e estão protegidos pela imunidade passiva dos anticorpos colostrais e por fatores não específicos (presença de timo, hemoglobina fetal, etc.). Nessa situação de estabilidade endêmica, estima-se que 75% dos bovinos com idade entre seis a nove meses são infectados pelas *Babesia spp.*, no qual a parasitemia ocorre em níveis baixos (MAHONEY et al., 1973), ou, em decorrência de casos isolados de queda da resistência individual em animais adultos. Nessas áreas, os animais jovens recebem anticorpos maternos via colostro de vacas imunes, sendo que os anticorpos colostrais persistem por aproximadamente três meses (MONTENEGRO-JAMES et al., 1985). A imunidade passiva pode persistir por até seis meses de idade para *B. bovis* e de três a quatro para *B. bigemina*.

As áreas de instabilidade são caracterizadas pela ocorrência de surtos, existindo um grande número de casos clínicos da doença, sobretudo de curso agudo e com elevados índices de mortalidade (UILEMBERG, 1995). Nessas regiões, os animais jovens não se infectam por um prolongado período após o nascimento e a imunidade dos adultos não sofre reforço através das reinfestações pelos carrapatos. Conseqüentemente, os animais passam por um longo período sem o vetor e sem os protozoários por ele inoculados. Isso significa dizer que, os bovinos ficam sujeitos às novas infestações, apenas na época favorável ao desenvolvimento do ácaro, promovendo uma oscilação nos níveis de anticorpos contra as babesias. Nessa situação, os mesmos acabam se tornando insuficientes para conferir imunidade ao

rebanho frente ao inóculo, quando a infestação aumenta. Desta maneira, a exposição a carrapatos infectados pode dar origem a surtos graves de babesiose (De WALL, 1996).

2.1.8. Resistência versus categoria animal

Em relação à idade dos animais, consideram-se os jovens naturalmente mais resistentes. Além da imunidade passiva conferida pelos anticorpos colostrais, estes animais apresentam resquícios de hemoglobina fetal que permanecem no organismo até os nove meses de idade (FARIAS, 1995).

Apesar da elevada resistência, as babesioses são diagnosticadas com frequência em animais jovens. Nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, são freqüentes os casos clínicos da doença nesta categoria, do nascimento ao desmame (KESSLER et al., 1983). Nos Estados do Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, regiões consideradas estáveis em termos epidemiológicos, PATARROYO et al. (1982) constatou o mesmo tipo de infecção. Ainda na região Sudeste, GONÇALVES (2000) observou uma maior prevalência da parasitemia em bezerros de até oito meses de idade e em animais adultos oriundos de áreas livres de carrapatos. Essa situação pode ser explicada devido à queda na imunidade passiva a partir do 28º dia após o nascimento, quando os títulos de anticorpos são baixos, aumentando a possibilidade dos bezerros desenvolverem as babesioses de maneira aguda (MADRUGA et al., 1984; OLIVEIRA et al., 2005).

2.1.9. Diagnóstico

Bovinos que se recuperam da infecção primária tornam-se portadores sadios e a detecção dos hemoparasitas por meio de exames microscópicos de esfregaços sanguíneos tornam-se difíceis, devido à baixa sensibilidade desta técnica. Apesar de ser um método de diagnóstico relativamente barato, só apresenta bons resultados quando se examina animais clinicamente afetados. Assim, para estudos epidemiológicos, em que se necessita identificar animais infectados nos estágios

iniciais e os portadores assintomáticos da doença, o exame direto não pode ser utilizado (COSTA-JUNIOR et al., 2006).

A duração do estado de portador pode variar em função da espécie do parasita e da subespécie dos bovinos infectados. Nas infecções por *B. bovis*, o estado de portador pode ser mantido por toda a vida em animais *Bos taurus* (MAHONEY et al., 1973), enquanto que em *Bos indicus*, o parasita se mantém por períodos de cerca de três anos (JOHNSTON et al., 1978). Para *Babesia bigemina* o estado de portador varia entre um ano e 57 meses (CALLOW, 1984; FIGUEROA et al., 1993).

Frente às dificuldades demonstradas para o diagnóstico pelo método direto, os estudos epidemiológicos, foram, e ainda continuam sendo realizados por meio de exames sorológicos, devido à elevada sensibilidade e especificidade da técnica. A situação epidemiológica em uma determinada região de ocorrência da parasitemia pode ser definida, por meio do status imunológico dos animais (MAHONEY et al., 1973).

Para a detecção dos animais portadores em um determinado rebanho, pode-se usar os testes de aglutinação rápida (MADRUGA et al., 2000); os testes de imunofluorescência indireta - RIFI (MADRUGA et al., 1984) e os testes imunoenzimáticos - ELISA teste (MADRUGA et al., 1997), sendo os dois últimos, os mais empregados para o diagnóstico das *Babesia spp.* (FARIAS, 1995). Apesar destes exames detectarem anticorpos específicos contra os parasitas, apresentam uso limitado, porque indicam a exposição ao agente, mas não informam sobre o estágio da infecção (WAGNER et al., 1992).

Técnicas moleculares desenvolvidas recentemente resolveram a maioria dos problemas relacionados à detecção de animais portadores em populações de bovinos, possibilitando a determinação rápida dos riscos de ocorrência de surtos (FIGUEROA et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008). Tais métodos se baseiam na observação do DNA de parasitas em amostras de sangue de animais infectados e, vêm demonstrando algumas vantagens sobre os métodos convencionais de diagnóstico. Além de serem mais rápidos, apresentam alta

sensibilidade e especificidade. Desta maneira, sua utilização no controle de doenças infecciosas tem sido cada vez mais intenso (AZAMBUJA et al., 1994).

Na análise direta do material genético, é possível identificar o agente causador de determinada doença, por meio da amplificação da região específica de seu DNA, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (SAIKI et al., 1985; MULLIS & FALOONA, 1987).

Esta técnica consiste em uma reação enzimática que permite amplificar “in vitro”, regiões específicas do genoma de qualquer organismo de interesse. Possui a vantagem de sintetizar em poucas horas, bilhões de cópias do fragmento de interesse, por meio da utilização de uma solução tampão contendo íons de magnésio (Mg), desoxirribonucleotídeos trifosfatos livres (dNTPs), sequências iniciadoras (“primers”) complementares à região do DNA que flanqueiam a região que se deseja reproduzir, sendo a reação catalisada por uma enzima termoestável, a Taq DNA Polimerase, que permitiu a automação da técnica (SAIKI et al., 1988).

A PCR tem sido utilizada em diversas pesquisas, pois abriu enormes perspectivas para o diagnóstico de várias doenças e a detecção de agentes infecciosos: estudos epidemiológicos em malária (ROPER et al., 1996), diferenciação de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (LALLY et al., 1996), casos clínicos de criptosporidioses (LENG et al., 1996), dentre outras.

No que se refere às babesioses bovinas, em áreas endêmicas estáveis, onde os animais são constantemente submetidos a infestações por carrapatos, taxas de infecção por *Babesia spp.* próximas de 100% foram detectadas por meio de exames de amplificação do DNA parasitário em bezerros e vacas, tanto em rebanhos leiteiros (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005), como de corte, *Bos indicus* e com os diferentes graus de sangue *Bos taurus* (OLIVEIRA et al., 2008).

A PCR como método de diagnóstico dos protozoários deste gênero, possui uma sensibilidade 100 vezes maior, quando comparada com o limite de detecção do exame microscópico de esfregaços sanguíneos (BOSE et al., 1995; FAHRIMAL et al., 1992). Em adição, este método permite detectar 10 pg do DNA dos hemoparasitas em amostras de sangue de animais infectados (BOSE et al., 1995). Em contrapartida, a

sensibilidade do teste pode ser elevada mediante a utilização da técnica de Nested PCR (nPCR) (COSTA-JÚNIOR et al., 2006).

A nPCR consiste no emprego de sequências externas e internas de nucleotídeos dos “primers”, para que seja possível a execução da PCR e Nested PCR, respectivamente. Em seguida, numa segunda bateria de amplificação, sequências iniciadoras internas às adotadas na PCR primária são utilizadas, elevando o número de cópias do DNA alvo e a sensibilidade da técnica (FIGUEROA et al., 1996).

Posteriormente, houve inovação tecnológica a partir da PCR surgindo a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (qPCR). A qPCR tem sido amplamente utilizada por pesquisadores, principalmente em decorrência de suas vantagens. A alta sensibilidade e especificidade desta técnica permitem substituir métodos de diagnóstico que demonstrem alta especificidade, porém de menor sensibilidade como o exame microscópico de esfregaços sanguíneos (OURA et al., 2004).

A qPCR consiste em uma metodologia que emprega compostos fluorescentes que permitem o acompanhamento da reação em tempo real (MONIS et al., 2005). Esta técnica também pode ser utilizada na detecção de patógenos (FRANCINO, et al., 2006), expressão de genes e regulação (FOLLO et al., 2006) e discriminação alélica (BEST., 2005).

Todavia, a qPCR pode ser concluída muito rapidamente, pois dispensa manipulações pós-amplificação impedindo, desta forma, que haja produtos de contaminação na amostra (HEID et al., 1996).

Esta técnica, além de diagnosticar, possibilita quantificar o DNA oriundo de *Babesia spp.* presentes em amostras de sangue colhidas dos bovinos, apresentando-se como um método extremamente sensível e confiável (Ke et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008).

RAMOS et al. (2011) observaram que a qPCR possibilita diagnosticar um maior número de animais positivos, quando comparada com a PCR, em estudos relacionados a ocorrência da *Babesia bovis* em uma área considerada estável enzooticamente.

Além das babesioses, o desenvolvimento da técnica de amplificação de segmentos de DNA utilizando a qPCR, permitiu a detecção de outros agentes de doenças, tais como: *Anaplasma marginale* em bovinos infectados (CARELLI et al., 2007), reovírus aviário (ARV), que acarreta várias doenças importantes em aves (Ke et al., 2006) e leishmaniose em cães (FRANCINO., 2006).

2.2. Resistência de animais *Bos taurus* e *Bos indicus* aos carrapatos e às babesias

A identificação e seleção de bovinos resistentes às doenças parasitárias podem ser importantes para o desenvolvimento de métodos mais efetivos de controle das mesmas, e também para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento visando aumentar a resistência genética nos rebanhos, elevando, a produtividade na bovinocultura de corte por meio da minimização das perdas. Todavia, essa característica deve ser explorada, constituindo uma ferramenta auxiliar importante no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e, conseqüentemente dos hemoparasitas inoculados.

2.2.1. Resistência entre subespécies aos carrapatos

Existem diferenças significativas entre bovinos, quando se considera a subespécie em que pertencem. Dentre elas, podem-se mencionar as diferenças com relação ao desenvolvimento, eficiência produtiva e reprodutiva, precocidade de terminação, adaptabilidade ao meio, exigências nutricionais e resistência a ecto e endoparasitas.

Animais *Bos indicus*, de uma maneira geral, apresentam grande rusticidade, caracterizada pela elevada capacidade de tolerância ao calor em regiões tropicais e resistência aos parasitas, decorrentes de características fisiológicas que favorecem a aclimatação desses indivíduos nos trópicos: pêlos curtos e lisos que propiciam a dissipação do calor. Por outro lado, bovinos *Bos taurus* demonstram baixa tolerância ao

calor em regiões tropicais, quando expostos à intensa radiação solar e elevada suscetibilidade aos parasitas. Provavelmente, o intenso parasitismo em animais desta subespécie é decorrente de características fisiológicas que os favorecem, tais como: pele geralmente espessa, recoberta de longos pêlos que impedem a eliminação do calor (MARQUES,1969).

Dessa forma, a aclimação dos *Bos indicus* em áreas tropicais, pode ser atribuída à capacidade de manterem a homeostase orgânica, mesmo quando submetidos a situações de stress térmico, sendo resultado de glândulas sudoríparas maiores, menores taxas metabólicas e características na pelagem que diminuem absorção da radiação solar (HANSEN, 2004).

Os diferentes grupos genéticos demonstram certa divergência com relação à suscetibilidade ao *R. (B.) microplus*. Em geral, de acordo com dados registrados na literatura, animais *Bos indicus* são considerados menos suscetíveis as enfermidades parasitárias e as infestações por ectoparasitos, quando comparados com *Bos taurus*. Vários autores (UTECH et al.,1978; OLIVEIRA et al., 1989; GOMES, 1998; JONSSON et al., 2000; TEODORO et al. 2004) observaram diferenças na resistência aos carrapatos entre bovinos de diferentes subespécies.

Entretanto, o mecanismo de resistência dos bovinos aos carrapatos, além de ser um fenômeno complexo, ainda é pouco conhecido. RIEK (1962) descreveu dois desses mecanismos, classificando-os como resistência inata e resistência adquirida. O primeiro, já existe no animal quando ocorre o primeiro contato com o artrópode. O segundo começa a ser observado após infestações sucessivas.

A grande resistência conferida ao gado indiano também pode ser explicada, pelo simples fato destes animais terem convivido milhares de anos com o artrópode. Sendo assim, esta subespécie passou por um longo processo de seleção, no qual os mais sensíveis foram eliminados naturalmente do ambiente, tendo persistido somente aqueles geneticamente resistentes (THIESEN, 1979; LEMOS, 1986). Além das características fisiológicas, a alta suscetibilidade do gado europeu frente ao intenso parasitismo, provavelmente decorre do contato restrito que estes indivíduos possuem com o carrapato, fato este que os tornam altamente vulneráveis.

Estudos realizados no intuito de avaliar a resistência dos *Bos taurus* frente às infestações por *R. (B.) microplus* (WAMBURA et al., 1998; MATTIOLI et al., 2000) verificaram que, apesar de desenvolverem certa imunidade, esses animais não conseguem controlar as infestações com a mesma eficiência que os *Bos indicus*. Ao que tudo indica, o nível da resposta imunológica neste último grupo é mais eficiente quando comparados com os *Bos taurus*.

Porém, existem raças dentro desta subespécie que apresentam diferentes níveis de resistência ao carrapato, sendo a raça Jersey considerada a mais resistente dentre as raças européias (UTECH et al., 1978).

Essas diferenças também foram observadas por BYFORD et al. (1976), após avaliarem a resistência entre *Bos taurus* e animais oriundos de seu cruzamento com *Bos indicus*. Estes autores observaram que, bovinos cruzados demonstraram uma resistência promissora, considerada de moderada a alta. É por essa razão que a procura por animais cruzados tem se intensificado em nosso país, em virtude da possibilidade de elevar a eficiência produtiva nos rebanhos.

LEMOS et al. (1985), realizaram estudos que objetivava avaliar a resistência ao carrapato, em novilhas de diferentes grupos genéticos, sendo que a composição genética dos animais experimentais variava entre $\frac{1}{4}$ Holandês + *Bos taurus*, até Holandês “puro por cruza”. Os pesquisadores observaram que, quanto maior o percentual de genes de raças européias na composição genética dos bovinos, maior foi o grau de infestação pelo *R. (B.) microplus*.

Em experimentos realizados no intuito de avaliar a intensidade de parasitismo pelo carrapato em fêmeas bovinas de diferentes grupos genéticos, SILVA et al. (2007) observaram que, animais cruzados Angus x Nelore e Simental x Nelore apresentaram uma maior taxa de infestação, quando comparados com animais puros Nelore enquanto que, bovinos Canchim x Nelore apresentaram uma infestação intermediária. Segundo MADRUGA et al. (1987), o grau de infestação em animais da raça Nelore é considerado menor do que o limiar econômico de controle, sendo adequado para manter o equilíbrio enzoótico da (TPB).

Com relação aos parâmetros genéticos para a característica de resistência ao *R. (B.) microplus*, as estimativas de herdabilidade, obtida por vários autores, (TEODORO et al., 1984; MADALENA et al., 1985; CARDOSO 2000; FRAGA et al., 2003), variou de 0,15 e 0,49, sendo classificada de baixa à moderada.

ANDRADE (1996) observou que a herdabilidade para essa característica possui variação genética aditiva, o que significa dizer que há possibilidades de selecionar reprodutores geneticamente superiores para a mesma, uma vez que ocorre transmissão de parte dessa superioridade às respectivas progênes.

2.2.2. Resistência das subespécies às babesias

Quanto à suscetibilidade dos bovinos às *Babesia spp.*, conforme descrito por alguns autores, há evidências de que a subespécie também interfere no grau de infecção desses hemoparasitas (BOCK et al., 1999; JONSSON et al., 2000). Desta maneira, os *Bos taurus* são considerados menos resistentes quando comparados aos *Bos indicus* (MADRUGA et al., 1984; UILENBERG, 1995; BOCK et al., 1997).

Segundo JONSSON (2006), a resistência elevada em animais de origem indiana ao artrópode e aos hemoparasitas é bastante conhecida, possibilitando que bovinos de origem européia sejam substituídos tanto pelo gado zebuino, como por indivíduos oriundos de seus cruzamentos em regiões da Austrália, onde é grande a ocorrência do vetor da doença.

BOCK et al. (1997) utilizaram desafios com amostras virulentas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* para determinar a resistência inata às babesioses em bovinos sorologicamente negativos. Esses autores verificaram que bovinos *Bos indicus* apresentaram maior resistência quando comparados aos *Bos taurus*, sendo que os mestiços apresentaram resistência intermediária.

BENAVIDES e SACCO (2007) desafiaram animais puros *Bos taurus*, usando uma cepa patogênica de *B. bovis* e conseguiram determinar a ocorrência de três fenótipos distintos: susceptíveis (45,4%), intermediários (26,7%) e resistentes (27,9%).

OLIVEIRA et al. (2005) e OLIVEIRA-SEQUEIRA et al. (2005), utilizando a técnica de PCR e a Nested PCR mostraram que, em bovinos cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*), as taxas de infecção por *B. bovis* e por *B. bigemina* não diferiram e que ambas eram também semelhantes em bezerros e vacas. Posteriormente, os mesmos pesquisadores (OLIVEIRA et al., 2008) desenvolveram trabalho com a finalidade de verificar se a utilização de animais puros *B. indicus* poderia alterar a transmissibilidade da *Babesia bigemina*, provocando a ocorrência de instabilidade enzoótica em um sistema estável e com isso aumentar o risco de surtos da doença. Neste estudo, foram acompanhados quatro grupos genéticos diferentes: Nelore puro e os mestiços: Angus x Nelore, Canchim x Nelore e Simental x Nelore. Os resultados obtidos, utilizando-se exclusivamente a técnica de Nested PCR, mostraram que as taxas de infecção tanto nos animais *Bos indicus* como nos mestiços *Bos taurus* X *Bos indicus* jovens e adultos, foram altas e não diferiram. No entanto, a metodologia utilizada não possibilitou a verificação de diferenças na intensidade de infecção nos grupos genéticos observados.

Contudo, o melhor conhecimento das interações entre as diferentes espécies de *Babesia spp.* nos hospedeiros vertebrados são importantes para que se possa identificar as causas da variação individual na resistência a estes hemoparasitas e ao carrapato vetor podendo vislumbrar de novas estratégias de controle.

3. OBJETIVOS

Este trabalho avaliou a infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em animais de diferentes grupos genéticos (*Bos taurus*, *Bos indicus* e cruzados) e faixas etárias (bezerros e vacas), com o objetivo de promover melhor entendimento das relações existentes entre parasita-hospedeiro, visando fornecer subsídios para o estabelecimento de métodos mais efetivos de controle desta hemoparasitose.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Estimar quantitativamente o nível de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina*, por meio da técnica de qPCR, em bovinos criados em áreas do Estado de São Paulo, consideradas endêmicas para as babesioses;
2. Estabelecer relações entre a frequência e a intensidade das infecções com a resistência/suscetibilidade dos animais entre os grupos genéticos e categorias observadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Os animais experimentais integravam rebanhos de três diferentes fazendas, localizadas em regiões no interior do estado de São Paulo consideradas endêmicas para as babesioses bovinas.

As amostras de sangue utilizadas foram coletadas de 149 bovinos, sendo 74 bezerros (ambos os sexos) e 75 vacas de corte de três grupos genéticos diferentes (puros *Bos taurus*, $\frac{1}{2}$ *Bos taurus* + $\frac{1}{2}$ *Bos indicus* e puros *Bos indicus*).

Em função da possível interferência dos tratamentos acaricidas adotados rotineiramente nas propriedades contra o *Ripicephallus (Boophilus) microplus*, todos os animais experimentais deixaram de recebê-lo, por um período mínimo de 30 dias antes da coleta do material biológico, visando uma infestação natural do agente inoculador das babesias.

4.1.1. Aberdeen Angus

Os animais da raça Angus faziam parte do rebanho mantido na fazenda 3E Agropecuária. O clima da região é definido como tropical subquente e úmido, (tipo Aw, segundo classificação de Köppen). Durante o período do inverno, ocorre à diminuição de chuvas sendo a estação fria e seca. Entretanto, o verão é chuvoso possuindo temperaturas elevadas. A precipitação pluvial e as médias anuais de temperatura são respectivamente, de 1259,1 mm e 23,6°C.

Do rebanho da raça Angus variedade preta, foram colhidas amostras de 48 animais, sendo 23 bezerros com idade variando entre 1 a 4 meses e 25 fêmeas adultas com idade variando entre 2 a 5 anos, escolhidos ao acaso.

Não houve alteração no manejo adotado rotineiramente no local, sendo os indivíduos utilizados para coleta mantidos sob esquema de vacinação contra: brucelose

(fêmeas de 3 - 8 meses), clostridioses, pasteureloses, salmoneloses, febre aftosa (semestralmente), raiva (anualmente), e controle de doenças da propriedade, ou, conforme solicitação da vigilância sanitária.

O controle do *R. (B.) microplus* no rebanho é feito por meio de vacinas (TIC-VAC, Eurofarma) contra este vetor, e o controle químico é realizado através de banhos regulares (mensal), ou quando a avaliação visual do grau de infestação indicar sua necessidade, com medicamentos à base de Fipronil (Colosso®) e Amitraz (Triatox®). Os animais que apresentam sinais clínicos da doença são tratados à base de Diaceturato de Diminazene (Ganaseg® 7%) e Tetraciclina (Talcin Max®). O tratamento contra helmintos gastrintestinais, nos animais adultos é feito com base nos resultados dos exames de fezes (OPG) e, nos bezerros, mensalmente, até o desmame (6 meses).

Utiliza-se na propriedade o manejo rotacionado de pastagens de Tifton 85 (*Cynodon dactylon*), sendo 10 dias o período de permanência dos animais nos piquetes. Após a saída, é feita a adubação com NPK ficando o local em descanso por aproximadamente 40 dias. A suplementação é feita à base de sal mineral “*Ad libitum*” e ração concentrada somente para vacas prenhes, contendo 18% de proteína bruta (PB). Animais jovens recebem, até o desmame (6 meses), ração específica.

4.1.2. Nelore e bezerros cruzados

Os animais da raça Nelore e bezerros cruzados ($\frac{1}{2}$ *Bos taurus* + $\frac{1}{2}$ *Bos indicus*) utilizados no experimento integravam o rebanho mantido no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico do Agronegócio - APTA Regional da Alta Mogiana. Esta cidade localiza-se a 21°14'07" de latitude Sul e 48°16'35" de longitude Oeste. O clima é definido como tropical de verão chuvoso e inverno seco, (tipo Aw, segundo classificação de Köppen). De outubro a março, corresponde ao período em que ocorre a maior concentração de chuvas que acontecem de maneira mais espaçada. No entanto, o período compreendido entre os meses de Abril a Setembro, as chuvas ocorrem com menor intensidade. A precipitação pluvial e as médias anuais de temperatura são respectivamente, de 1363 mm e 24°C.

Foram escolhidos ao acaso 25 bezerros com 2 meses de idade e 25 fêmeas adultas com 8 anos de idade, do rebanho Nelore e 26 bezerros com idade entre 1 a 2 meses entre os animais cruzados.

O manejo sanitário adotado rotineiramente na propriedade compreende a vacinações contra brucelose (fêmeas de 3 - 8 meses), clostridioses, pasteureloses, salmoneloses, febre aftosa (semestralmente), raiva (anualmente), ou, conforme solicitação da vigilância sanitária.

O controle contra helmintos gastrintestinais, nos animais adultos, é realizado de forma estratégica aplicando-se quatro vezes por ano produtos a base de Ivermectina, compreendendo o período de transição das estações do ano. Nos bezerros, a aplicação do medicamento ocorre logo após o desmame (média de 8 meses). Para o controle estratégico contra o carrapato, vetor das babesias, utiliza-se o mesmo medicamento.

Com relação ao manejo alimentar, as vacas são mantidas em pastagens de *Braquiaria brizantha* e Capim Tanzânia (*Panicum maximum*) o ano todo, recebendo sal mineral, contendo 8% proteína bruto (PB) à vontade no cocho. Os bezerros durante a amamentação não recebem suplementação do tipo creep-feeding.

4.1.3. Vacas cruzadas

As vacas cruzadas ($\frac{1}{2}$ *Bos taurus* + $\frac{1}{2}$ *Bos indicus*) pertenciam ao rebanho do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa. Esta cidade localiza-se a 22° 01' de latitude sul e 47° 53' de longitude oeste.

O clima da região é definido como subtropical com inverno seco e verão chuvoso, (tipo Aw, segundo a classificação de Köppen), em que o período de seca estende-se de Abril a Setembro e o período das águas de Outubro a Março. A precipitação pluvial e as médias anuais de temperatura são respectivamente, de 1512 mm e 21,5 °C.

Do rebanho de fêmeas adultas cruzadas ($\frac{1}{2}$ *Bos taurus* + $\frac{1}{2}$ *Bos indicus*), foram colhidas amostras de 25 animais com idade variando entre 9 a 11 anos, escolhidas ao acaso.

O manejo sanitário inclui exames semestrais para o controle da tuberculose (tuberculinização com PPD bovino) e sorologia para a brucelose (soroaglutinação). A fazenda segue o calendário anual de vacinação, sendo aplicadas vacinas contra febre aftosa (semestralmente), brucelose (fêmeas de 3 - 8 meses), clostridioses, pasteureloses, raiva (anualmente) e salmoneloses.

Para o controle de carrapatos realiza-se a avaliação visual do grau de infestação dos animais. A utilização de medicamentos é feita mediante aos resultados dos bioensaios, visando o controle estratégico deste artrópode. Na fazenda existe a banheira de aspersão, lugar onde os animais adultos são banhados com medicamentos à base de formamidinas (Amitraz) e nos bezerros, realizam-se as pulverizações.

Todos os animais são mantidos em pastagens de capim Tanzânia (*Panicum maximum*), recebendo sal mineral “*Ad libitum*” o ano todo.

4.2. Coleta do material biológico e aferição da temperatura corporal

A colheita das amostras de sangue dos animais experimentais foi realizada nos meses de Agosto de 2010 a Maio de 2011.

De cada animal foram colhidas amostras de sangue da veia jugular para extração de DNA e determinação do volume globular (VG) e de vasos periféricos para a confecção de esfregaços sangüíneos. O sangue foi extraído com agulhas 25 x 8 BD e tubos a vácuo de 4mL contendo o anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA), utilizando-se um adaptador para a realização da venopunção de cada indivíduo. Para a confecção dos esfregaços, o sangue foi obtido mediante a perfuração da ponta cauda dos bovinos com agulhas 25 x 8 BD, após a tricotomia no local. Em seguida, utilizaram-se lâminas de vidro limpas, secas e desengorduradas para a elaboração dos esfregaços. A extremidade fosca presente nas mesmas possibilitou a identificação correta de cada animal.

Além do material biológico, a temperatura corporal de todos os bovinos foi aferida com auxílio de um termômetro de coluna de mercúrio. Este procedimento foi realizado no intuito de observar animais que estavam com hipertermia, sendo este, um dos sinais clínicos característicos das babesioses bovinas.

Todas as amostras foram devidamente identificadas com a numeração existente no brinco de cada bovino, acondicionadas no isopor com gelo e transportadas logo em seguida para os laboratórios da Embrapa, São Carlos-SP, onde foram processadas.

4.3. Análises laboratoriais

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Sanidade e Biotecnologia Animal do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa localizada em São Carlos, SP.

4.4. Avaliação dos exames hematológicos

O volume globular (VG), que indica a porcentagem de células vermelhas presentes no sangue, foi determinado pela técnica do microhematócrito (JAIN, 1993).

Para a quantificação da parasitemia, ou seja, da presença de parasitas nas células sanguíneas, os esfregaços preparados com sangue capilar foram fixados com metanol e corados com solução de MayGrunwald-Giemsa. Os hematozoários foram pesquisados em toda a lâmina, sendo a parasitemia estimada por meio do número de eritrócitos parasitados em 1.000 células. Os resultados foram expressos em porcentagem (%). As leituras foram feitas utilizando-se microscópio óptico com ocular reticulada e objetiva de imersão de 100x (MACHADO, 1991).

4.5. Elaboração da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) e Reação de Nested PCR (nPCR)

4.5.1. Extração de DNA

O DNA foi extraído das amostras de sangue, mediante a utilização do Kit DNA Easy (Invitrogen, EUA) de acordo com as informações do fabricante, com algumas modificações. Resumidamente: as amostras foram agitadas até a perfeita homogeneização. Em seguida, foram pipetados 300µL de sangue e adicionados 400µL de solução A, misturando-os por inversão por várias vezes colocando-os em microtubos de 1,5mL. Os tubos foram identificados e incubados a 65°C, durante 6 minutos. Posteriormente, foram adicionados 800 µL, de clorofórmio, agitando-se em vortex vigorosamente, até que apresentassem coloração marrom escura. Em seguida, adicionou-se 200µL de solução B, sendo as amostras novamente homogeneizadas até que se tornassem viscosas. Em processamento, foram centrifugadas à velocidade máxima (14.000 rpm) em microcentrífuga por 10 minutos à temperatura ambiente (25°C). A fase aquosa de cada amostra foi transferida para tubos de 1,5mL limpos e devidamente identificada. Logo após, o DNA foi precipitado adicionando-se 1mL de etanol à 100% gelado, misturando-se por inversão até que se formasse um precipitado visível. As amostras foram novamente centrifugadas a velocidade máxima durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os sobrenadantes foram decantados e adicionou-se 1mL de etanol a 80% gelado. Os tubos foram submetidos novamente à centrifugação a velocidade máxima por 2 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram decantados e os tubos centrifugados a velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida, pipetou-se o etanol residual, inverteram-se os tubos colocando-os para secar no fluxo laminar por 2 horas. Após a secagem, os DNAs precipitados foram adicionados de 200µL de solução tampão - TE (Tampão TRIS - EDTA). Os DNAs foram separados por grupo genético, identificados e

acondicionados em caixas plásticas para microtubos de 1,5mL em freezer à -80°C para posterior avaliação da concentração e qualidade das amostras extraídas.

4.5.2. Avaliação do DNA

A concentração e a avaliação da qualidade do DNA genômico extraído foi determinada adotando-se o aparelho Nano Drop ND - 1000 spectrophotometer. Posteriormente, todas as amostras foram diluídas de forma a ficarem em uma mesma concentração, 5ng/μL. Em seguida, foram acondicionadas em freezer a -80°C até o momento da execução das técnicas moleculares.

4.5.3. Padronização da PCR

A PCR foi padronizada utilizando-se uma adaptação daquela descrita por BULING et al. (2007), empregando-se o termociclador “Mastercycler Gradient” (Eppendorf). Na padronização foram utilizadas amostras de DNA positivas para *B. bovis* e *B. bigemina* extraídas de sangue de animais clinicamente afetados. Os “primers” utilizados para as espécies de *Babesia spp.* descritos por BULING et al. (2007), foram as seqüências do gene que codificam o citocromo B e que produzem ambos, amplicons com 88 pares de bases. No Quadro 1 são mostradas as seqüências iniciadoras.

Quadro 1. Sequência de nucleotídeos dos “primers” utilizados na amplificação do DNA de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* e o comprimento dos produtos de amplificação.

PCR e qPCR	“Primer”	Oligonucleotídeos (5' – 3')	Produto (pb)
<i>B. bigemina</i>	(F) ^a cbisg 1	TGT TCC AGG AGA TGT TGA TTC	88
	(R) ^a cbisg 2	AGC ATG GAA ATA ACG AAG TGC	
<i>B. bovis</i>	(F) ^a cbosg 1	TGT TCC TGG AAG CGT TGA TTC	88
	(R) ^a cbosg 2	AGC GTG AAA ATA ACG CAT TGC	

(F)^a “primer” forward; (R)^a “primer” reverse

Nessas reações, as temperaturas de anelamento dos “primers” foram 50°C e 54°C para *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente, selecionadas entre doze diferentes temperaturas testadas em sistema de gradiente. A utilização das melhores temperaturas possibilitou a observação dos amplicons de interesse, na faixa de 88 pares de bases e sem a formação de bandas inespecíficas.

4.5.4. Padronização da qPCR

A PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi padronizada utilizando-se uma adaptação daquela descrita por BULING et al. (2007), empregando-se o equipamento “ABI 7500 Real Time PCR System”. Na padronização foram adotadas as mesmas alíquotas de DNA positivas para *B. bovis* e *B. bigemina*, os mesmos pares de “primers” descritos por BULING et al. (2007) e, as mesmas temperaturas de anelamento empregados na execução da PCR, mencionados anteriormente.

Para verificar a funcionalidade da reação foi necessário padronizar uma reação de qPCR utilizando um gene endógeno como controle positivo, descartando a hipótese

de falhas na reação. As temperaturas de anelamento foram às mesmas empregadas para os “primers” das babesias.

A sequência de nucleotídeos para o gene constitutivo foi desenhada com base na seqüência do RNA ribossômico 18s de *Bos taurus*, disponível publicamente no banco de dados “GenBank” sob o número de acesso AF176811, podendo ser visto no site do Centro Nacional de Informação Biotecnológica www.ncbi.nlm.nih.gov. No Quadro 2 é mostrada essa sequência iniciadora.

Quadro 2. Sequência dos nucleotídeos dos “primers” utilizados na amplificação do DNA do gene endógeno e o comprimento do produto de amplificação.

qPCR	“Primer”	Oligonucleotídeos (5’ – 3’)	Produto (pb)
18s	(F) ^a S1	AGA AAC GGC TAC CAC ATC CAA	58
	(R) ^a S2	GGG TCG GGA GTG GGT AAT TT	

(F)^a “primer” forward; (R)^a “primer” reverse

4.5.5. Padronização da PCR e Nested PCR para *B. bigemina* em bovinos

Nelore

As PCRs e nPCRs foram padronizadas utilizando-se uma adaptação daquela descrita por GUERRERO et al. (2007), empregando-se o termociclador “Mastercycler Gradient” (Eppendorf). Na padronização foram utilizadas amostras de DNA positivas para *B. bigemina* extraídas de sangue de animais clinicamente afetados do rebanho Nelore.

Os “primers” utilizados descritos por GUERRERO et al. (2007) para *B. bigemina*, empregadas nas PCRs e nPCRs são mostradas no quadro 3.

Quadro 3. Sequência dos nucleotídeos dos “primers” utilizados na amplificação do DNA de *Babesias spp.* e *Babesia bigemina* e o comprimento dos produtos de amplificação.

PCR e nPCR	“Primer”	Oligonucleotídeos (5' – 3')	Produto (pb)
<i>Babesia spp.</i>	(F) ^a KB 16	CAT CAG CTT GAC GGT AGG G	600
	(R) ^a KB17	GTC CTT GGC AAA TGC TTT C	
<i>B. bigemina</i>	(F) ^a KB 18	GAT GTA CAA CCT CAC CAG AGT ACC	262
	(R) ^a KB19	CAA CAA AAT AGA ACC AAG GTC CTA C	

(F)^a “primer” forward; (R)^a “primer” reverse

Nas PCRs, a temperatura de anelamento dos “primers” foi de 55°C, obtida mediante a utilização do programa “Gene Runner”. Esta temperatura possibilitou a observação dos amplicons de interesse, na faixa de 600 pares de bases e sem a ocorrência de bandas inespecíficas. Para as nPCRs, selecionou-se, pelo mesmo programa, a temperatura de 57°C.

4.5.6. PCR

Esta PCR foi empregada, exclusivamente, para a construção das curvas de calibração dos “primers” cbisg e cbosg, sendo preparadas em tubos de 200µL, livres de DNAses e RNAses (Axygen) em volume final de 25µL, contendo 40ng de DNA de amostras positivas e 17µL de “Tampão de Reação”, empregando-se os seguintes procedimentos:

❖ ***B. bigemina***

- 12,5µL Master Mix Red concentrado 2x (Neobio - 150mM Tris-HCl; 40mM (NH₄)₂So 4; 40mM MgCl₂;
- 0,4µL de “primer” cbisg 1 (10µM);
- 0,4µL de “primer” cbisg 2 (10µM);
- 3,7µL de água ultra-pura (Invitrogen, EUA);
- 8,0 µL de DNA (5ng);

❖ ***B. bovis***

- 12,5µL Master Mix Red concentrado 2x (Neobio - 150mM Tris-HCl; 40mM (NH₄)₂So 4; 40mM MgCl₂;
- 0,4µL de “primer” cbosg 1 (10µM);
- 0,4µL de “primer” cbosg 2 (10µM);
- 3,7µL de água ultra-pura (Invitrogen, EUA);
- 8,0µL de DNA (5ng).

Em seguida, os tubos foram alocados em termociclador “Mastercycler Gradient” (Eppendorf), adotando a sequência de ciclos abaixo. Para *B.bovis*, foram executados os mesmos procedimentos, porém a temperatura de anelamento dos “primers” foi de 54°C:

- 1) Desnaturação à 95°C/30 segundos;
- 2) Anelamento à 50°C/30 segundos;
- 3) Extensão à 72°C/ 30 segundos.

Após a desnaturação inicial, houve a repetição de 40 ciclos idênticos. A extensão final foi realizada a 72°C/10 minutos. Em seguida, os tubos permaneceram a 4°C, por tempo indeterminado.

Para prevenir contaminações, ponteiras com barreiras de 10µL e 200µL (Axygen) foram utilizadas na elaboração das reações. Em cada bateria de teste, foi colocado um tubo de 200µL contendo, 17µL de “Tampão de Reação” e 8µL de água ultra-pura (Invitrogen, EUA), sendo utilizados como controle negativo da reação.

Em seguida foi realizada uma eletroforese com os produtos da PCR, em gel de agarose a 2,0% contendo brometo de etídio (0,5µL). O tamanho dos amplicons de

interesse foi estimado mediante a inclusão de um padrão de pares de base (Ladder de 100pb - Invitrogen, EUA) no gel. Para visualizar as bandas de amplificação, utilizou-se um transiluminador UV. As amostras consideradas positivas foram aquelas que apresentaram produtos de amplificação com 88pb.

4.5.7. qPCR

As qPCRs foram preparadas em duplicatas, nos microtubos em tiras com tampa óptica de 200µL (Axygen), livres de DNAses e RNAses, em volume final de 15µL, contendo 10ng de DNA, realizadas para todos os animais do experimento e 13µL de “Tampão de Reação”. As reações foram elaboradas utilizando-se os “primers”, descritos anteriormente na seguinte composição:

- 7,5µL Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems);
- 0,12µL de “primer forward” (10µM);
- 0,12µL de “primer reverse” (10µM);
- 5,26µL de água ultra-pura (Invitrogen, EUA);
- 2,0µL de DNA (5ng).

Em seguida, os microtubos foram lacrados com tampas ópticas, em tiras (Axygen) e inseridos no equipamento “ABI 7500 Real Time PCR System”. O Quadro 4 mostra o programa empregado no aparelho.

Quadro 4. Sequência de ciclos adotado no ABI 7500 Real Time PCR System.

40 Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Rampa (%)
Holding Stage	95	10 minutos	100
Cycling stage	95	15 segundos	100
	50	30 segundos	100
	60	32 segundos	100
Melt Curve Stage	95	15 segundos	100
	60	1 minuto	100
	95	15 segundos	1
	60	15 segundos	100

Para *B. bigemina* e *B. bovis*, as temperaturas de anelamento utilizadas foram de 50°C e 54°C, respectivamente. No gene endógeno foram executados os mesmos procedimentos, porém a temperatura de anelamento utilizada correspondia à mesma do gene em questão.

Para prevenção de contaminações, ponteiras com barreiras de 10µL e 200µL (Axygen) foram utilizadas na elaboração das reações. Em cada bateria de teste, foi colocado um tubo de 200µL, contendo 13µL de “Tampão de Reação” e 2µL de água ultra-pura (Invitrogen, EUA), sendo utilizados como controle negativo da reação.

Logo após, foi realizada uma eletroforese com os produtos de qPCR, em gel de agarose a 2,0% contendo brometo de etídio (0,5µg/mL). O tamanho dos amplicons de interesse foi estimado mediante a inclusão de um padrão de pares de base (Ladder de 100pb - Invitrogen, EUA) no gel. Para visualizar as bandas de amplificação, utilizou-se um transiluminador UV.

A eletroforese em gel de agarose foi executada apenas na primeira placa de cada “primer”, objetivando confrontar os resultados obtidos no equipamento de PCR em tempo real descartando a hipótese de falso-positivos. No entanto, a reação foi considerada satisfatória, pois não houve a formação de dímeros de “primers” evidenciando com nitidez os amplicons na faixa de 88pb, em animais parasitados.

Os resultados foram analisados com base no valor de “Threshold Cycle” (Ct), definido após o término de cada reação. Este ponto corresponde ao momento da reação, em que a amplificação do fragmento de interesse está na fase exponencial, possibilitando analisar de forma quantitativa a taxa de infecção por *Babesia spp*, para os respectivos genes em teste, em animais dos diferentes grupos genéticos.

4.5.8. Elaboração da curva de calibração

Para a quantificação absoluta do número de cópias de DNA alvo por amostra de sangue, foi delineada uma curva-padrão a partir dos produtos de PCR dos amplicons de interesse (88pb).

Primeiramente, foram sintetizadas as PCRs na composição descrita anteriormente para *B.bovis* e *B.bigemina*, adotando as sequências iniciadoras, cbsg e cbosg. Em seguida, os produtos foram purificados, empregando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up Systems (Promega). O protocolo adotado foi o seguinte: inicialmente, adicionou-se o volume correspondente ao produto de PCR (25µL) de solução “Membrane Binding” e misturou-se. Em seguida foram inseridas colunas plásticas nos tubos coletores (uma para cada amostra em teste) e transferiu-se todo o conteúdo para a coluna, no qual foram incubadas por um minuto, à temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000g, durante um minuto. Passado este tempo, ocorreu à remoção da coluna, o descarte do líquido existente nos tubos coletores, possibilitando remontar novamente o conjunto. Logo após, adicionou-se 700µL de solução “Membrane Wash” na coluna e centrifugou-se novamente a 10.000g por um minuto, esvaziando o tubo coletor depois deste intervalo, sendo lavado com 500µL de solução “Membrane Wash” e centrifugado a 10.000g durante cinco minutos. Em seguida, a coluna foi cuidadosamente removida, no qual foi transferida para um tubo limpo de 1,5mL, aplicando-se 40µL de “Water Free Nuclease”, diretamente no centro da coluna sem tocá-la e incubou-se a temperatura ambiente (25°C), durante um minuto. Após este período, a coluna foi novamente centrifugada a 10.000g por um minuto, sendo descartada permitindo o armazenamento do tubo contendo o DNA eluído a -20°C, para ser quantificado.

Posteriormente, os produtos das PCRs foram quantificados, utilizando-se o aparelho Nano Drop ND - 1000 spectrophotometer. Logo após, foram feitas diluições seriadas na proporção de 1:10, na qual foram sintetizadas as qPCRs adotando-se os procedimentos já descritos anteriormente.

Em cada diluição, o número de cópias foi mensurado utilizando-se a seguinte fórmula: $6 \times 10^{23} \times \text{concentração em g/uL} / \text{MW (g/mol)}$, de acordo com Ke et al. (2006). Por fim, uma análise de regressão linear foi realizada, obtendo-se o coeficiente de angulação da reta e o intercepto. Para estimação da quantidade do número de cópias/amostra de sangue, a seguinte fórmula foi empregada: quantidade (cópias/uL) = $10 (Cq-b)/m$, onde b é o intercepto e m é o coeficiente de angulação da reta.

Dessa forma, foram obtidas as respectivas curvas de calibração para os genes de interesse, possibilitando a estimativa do nível de infecção entre os animais dos diferentes grupos genéticos.

4.5.9. PCR e Nested PCR para *B. bigemina* em bovinos Nelore

Essas reações foram preparadas, com o intuito de diagnosticar a parasitemia por *B. bigemina*, somente em bovinos da raça Nelore. As PCRs foram preparadas em tubos de 200 μ L, livres de DNAses e RNAses (Axygen) em volume final de 25 μ L, utilizando DNA puro de amostras positivas (concentrações diferentes) e 20 μ L de “Tampão de Reação”. As nPCRs foram elaboradas pelos mesmos procedimentos, porém o volume de “Tampão de Reação” foi de 23 μ L e utilizou-se os produtos das PCRs primárias dos respectivos animais do rebanho para prepará-las, na seguinte composição:

❖ PCR

- 12,5 μ L Master Mix Red Neobio, concentrado 2x (150mM Tris-HCl; 40mM (NH₄)₂SO₄; 40mM MgCl₂;
- 1,0 μ L de “primer” KB 16 (10 μ M);
- 1,0 μ L de “primer” KB 17 (10 μ M);
- 5,5 μ L de água ultra-pura (Invitrogen, EUA);
- 5,0 μ L de DNA;

❖ nPCR

- 12,5 μ L Master Mix Red concentrado 2x (Neobio -150mM Tris-HCl; 40mM (NH₄)₂SO₄; 40mM MgCl₂;
- 1,0 μ L de “primer” KB 18 (10 μ M);
- 1,0 μ L de “primer” KB 19 (10 μ M);
- 8,5 μ L de água ultra-pura (Invitrogen, EUA);
- 2,0 μ L produto de PCR primária.

Em seguida, os tubos foram alocados em termociclador “Mastercycler Gradient” (Eppendorf), adotando a sequência de ciclos abaixo. Para nPCR, foram executados os mesmos procedimentos, porém a temperatura de anelamento dos “primers” foi de 57°C:

- 1) Desnaturação à 94°C/1 minuto;
- 2) Anelamento à 55°C/1 minuto;
- 3) Extensão à 72°C/1 minuto;

Após a desnaturação inicial, houve a repetição de 40 ciclos idênticos. A extensão final foi realizada a 72°C/7 minutos. Em seguida, os tubos permaneceram a 4°C, por tempo indeterminado.

Para prevenir contaminações, ponteiras com barreiras de 10µL e 200µL (Axygen) foram utilizadas na elaboração das reações. Em cada bateria de teste, foi colocado um tubo de 200µL contendo, “Tampão de Reação” e água ultra-pura (Invitrogen, EUA), ao invés de DNA e produtos de PCRs, sendo utilizados como controle negativo das reações.

Logo após, foi realizada uma eletroforese para as respectivas reações, em gel de agarose a 2,0% contendo brometo de etídio (3,0µL). O tamanho dos amplicons de interesse foi estimado mediante a inclusão de um padrão de pares de base (Ladder de 100pb - Invitrogen, EUA) no gel. Para visualizar as bandas de amplificação, utilizou-se um transiluminador UV. As amostras consideradas positivas foram aquelas que apresentaram produtos de amplificação na faixa de 600pb e 262pb, nas PCRs e nPCRs, respectivamente.

4.6. Análise estatística

As informações referentes ao volume globular (VG) e aferição da temperatura corporal, assim como os resultados das qPCRs de vacas e bezerros foram analisados por meio de análise de variância, sendo os dados das qPCRs transformados em logaritmo na base 10, devido à dependência observada entre a média e a variância. Foram considerados os efeitos de grupo genético, categoria animal e interação grupo genético vs categoria animal. O procedimento GLM do programa computacional

Statistical Analysis System v.9.1 (SAS Inst. Inc., Cary, NC) foi utilizado para as análises. Dentro de cada categoria e grupo genético a associação entre os dados das qPCRs dos dois hemoparasitas e a temperatura e o volume globular (VG) médio foram verificadas por meio da correlação de Pearson.

5. RESULTADOS

5.1. Informações clínicas e hematológicas

A temperatura retal dos animais dos três grupos genéticos estudados variou de 37,3°C a 41,1°C nas vacas e de 39,2°C a 41,6°C nos bezerros.

As fêmeas adultas apresentaram volume globular (VG) variando de 27% a 45% e os indivíduos jovens de 17% a 56%.

Pelo exame microscópico de esfregaços sanguíneos verificou-se que nenhuma vaca apresentou parasitemia patente por *Babesia spp.* Entre os bezerros, no rebanho Angus foi diagnosticado pelo método direto uma taxa de infecção de 26,1% (6 positivos num total de 23 animais), por *B. bigemina* (Figura 1). Nos bezerros cruzados, apenas 3,8% deste rebanho (1 positivo num total de 26 animais) apresentou parasitemia patente por *B. bigemina*. Nos bezerros Nelore foi detectado 4,0% (1 positivo num total de 25 animais) de infecção pela mesma espécie de babesia, observada nos grupos genéticos anteriores. Dessa forma, na categoria jovem verificou-se por meio do exame microscópico de esfregaços sanguíneos, apenas 10,8% dos bovinos infectados por *B. bigemina*, sendo de 0,1% a 0,2% a porcentagem de eritrócitos parasitados.

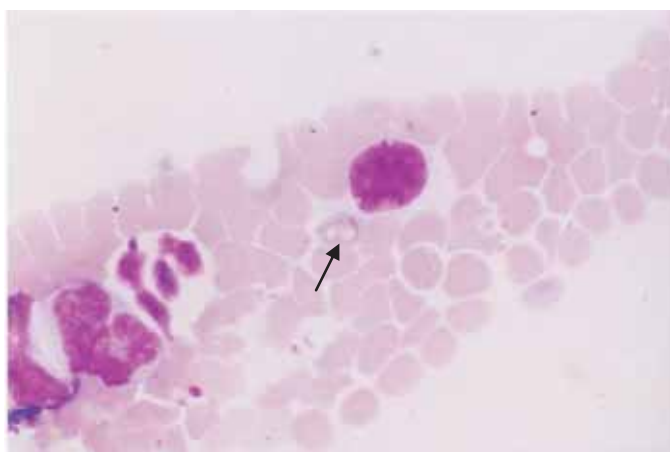


Figura 1. Merozoítas de *Babesia bigemina* (seta) em esfregaço de sangue corado com Giemsa.

Nas análises estatísticas para a temperatura, os efeitos de grupo genético, categoria animal e a interação entre ambas foram significativos ($P < 0,01$). As médias dos quadrados mínimos apresentadas na Tabela 1 permitem notar que os bezerros apresentaram temperaturas mais elevadas que as vacas. Com relação ao grupo genético, animais da raça Angus e Nelore apresentaram temperaturas médias semelhantes entre si, porém superiores as temperatura dos cruzados ($P < 0,01$). Entretanto, observou-se que entre os bezerros, a raça Nelore apresentou média superior aos outros dois grupos genéticos, enquanto que entre as vacas, a raça Nelore não diferiu dos Angus, evidenciando o efeito significativo ($P < 0,05$) da interação grupo genético x categoria animal (Tabela 1).

Tabela 1. Médias dos quadrados mínimos e erros padrão para as temperaturas, de acordo com o grupo genético e a categoria animal.

Grupo Genético	Bezerro	Vaca	Média
Angus	40,21 ^{a,A} ± 0,10	39,57 ^{a,B} ± 0,09	39,89 ^a ± 0,07
Cruzado	39,97 ^{a,A} ± 0,09	38,43 ^{b,B} ± 0,09	39,20 ^b ± 0,07
Nelore	40,71 ^{b,A} ± 0,09	39,47 ^{a,B} ± 0,09	40,09 ^a ± 0,07
Média	40,29 ^A ± 0,06	39,16 ^B ± 0,05	

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas linhas ou de letras minúsculas iguais nas colunas não diferem significativamente ($P < 0,05$).

Para o volume globular (VG) as análises também mostraram efeitos significativos de grupo genético, categoria animal e interação grupo genético vs categoria animal. Os animais jovens apresentaram valores mais altos de VG ($P < 0,05$), quando comparados com os adultos. As médias para o VG dos bezerros da raça Angus diferiu estatisticamente dos cruzados e Neloires, porém os dois últimos não diferiram entre si ao nível de 5% de significância (Tabela 2).

Na categoria adulta, vacas das raças Angus e Nelore apresentaram médias significativamente diferentes ($P < 0,05$). Porém, observa-se que os animais cruzados encontram-se em situação intermediária, não diferindo estatisticamente de ambos os grupos genéticos, como pode ser observado pelas médias apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Médias dos quadrados mínimos e erros padrão para o volume globular (VG), de acordo com o grupo genético e a categoria animal.

Grupo Genético	Bezerro	Vaca	Média
Angus	30,18 ^{a,A} ± 1,09	33,56 ^{a,A} ± 1,03	31,87 ^a ± 0,75
Cruzado	42,50 ^{b,A} ± 1,00	37,76 ^{ab,B} ± 1,03	40,13 ^b ± 0,72
Nelore	42,92 ^{b,A} ± 1,03	39,00 ^{b,A} ± 1,03	40,96 ^b ± 0,72
Média	38,53 ^A ± 0,60	36,77 ^B ± 0,59	

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas linhas ou de letras minúsculas iguais nas colunas não diferem significativamente (P<0,05).

5.2. Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)

5.2.1. Sensibilidade e especificidade da qPCR

A sensibilidade das sequências iniciadoras permitiu o diagnóstico de até 1000 cópias (0,1 fg) de DNA alvo nas amostras de sangue dos bovinos. A curva padrão obtida possibilitou a estimativa da quantidade de *Babesia spp.* presente nas amostras de sangue, apresentando uma resposta linear na faixa de 10^3 - 10^8 no número de cópias de DNA de interesse.

As regressões lineares do número de cópias nos logaritmos das concentrações apresentaram coeficientes de angulação de -3,21 e -3,15 e coeficientes de determinação de 0,99 e 0,98 indicando boa padronização dos primers para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente e ótima qualidade das amostras de DNA utilizadas, conforme mostrados nas Figuras 2 e 3.

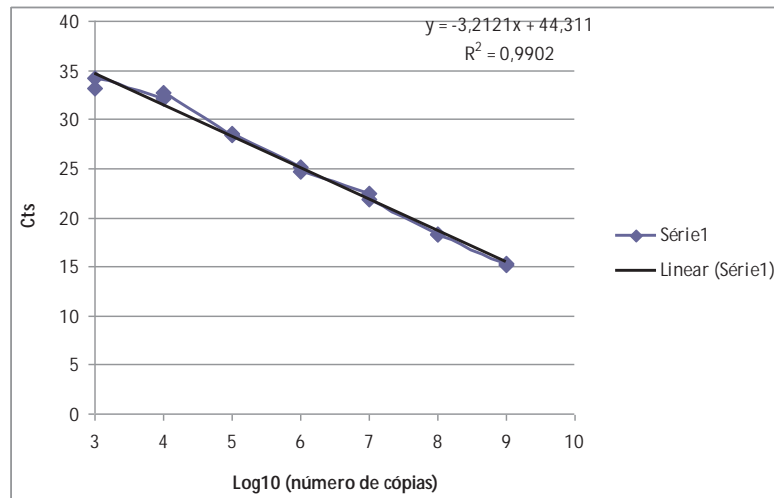


Figura 2. Curva padrão obtida a partir da regressão linear para *B. bovis*.

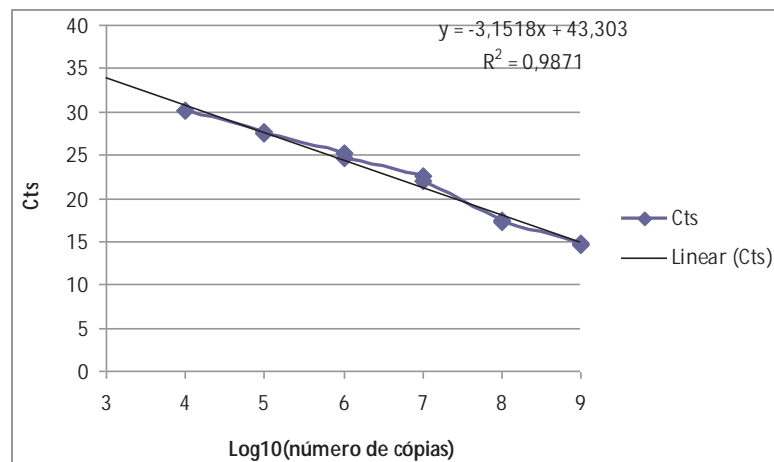


Figura 3. Curva padrão obtida a partir da regressão linear para *B. bigemina*.

A análise da curva de “melting” em cada bateria de teste permitiu distinguir as espécies de babesias. *B. bovis*, apresentou uma temperatura de 74,84°C e *B. bigemina* de 71,57°C. As Figuras 4 e 5 mostram as curvas de melting, indicando boa especificidade dos “primers”.

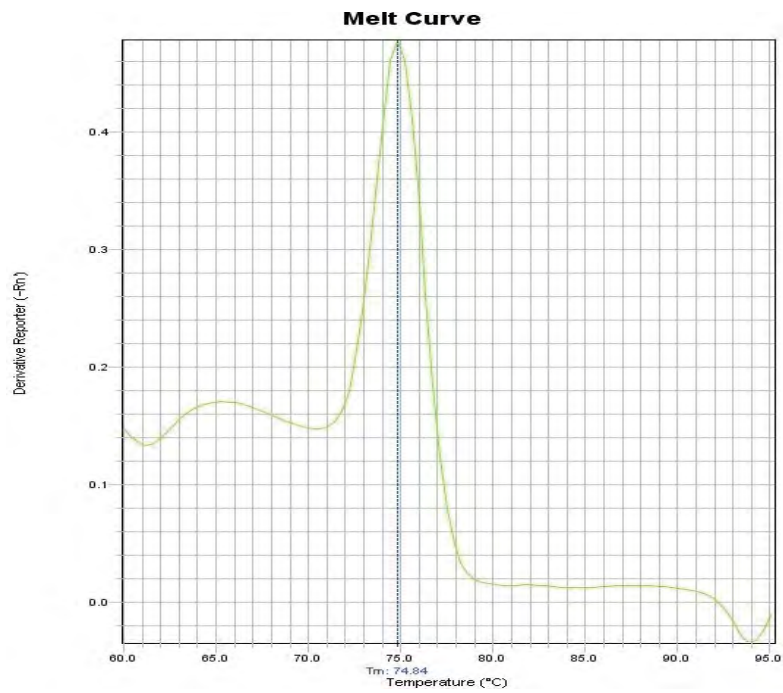


Figura 4: Curva de melting para *Babesia bovis* obtida pela qPCR.

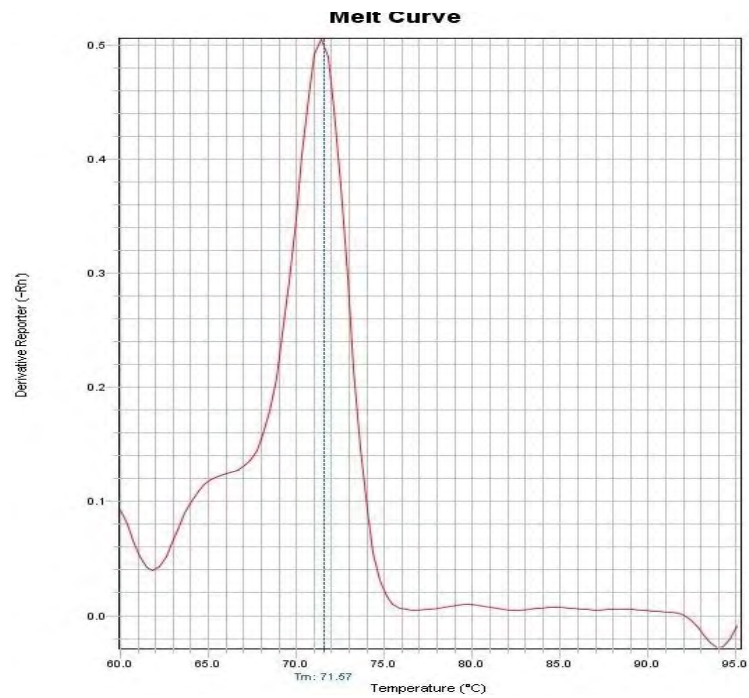


Figura 5: Curva de melting para *Babesia bigemina* obtida pela qPCR.

5.2.2. qPCR das amostras de sangue

Com a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR), foi possível obter a estimativa do nível de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina*, em bovinos de diferentes grupos genéticos e categorias.

No presente trabalho utilizaram-se, como DNA alvo, seqüências dos genes ribossomais que codificam o citocromo B, específicas para *B. bovis*, ou, *B. bigemina*. O número de cópias do DNA alvo em cada protozoário é variável podendo atingir até 1000 cópias por protozoário. Desta forma, o qPCR não permitiu determinar o número de parasitas infectantes ou o grau de parasitemia dos animais. Permitiu apenas estimar o nível de infecção de forma relativa, considerando que o número de cópias do DNA alvo nos parasitas não varia de maneira importante entre animais, grupos genéticos ou categoria animal. Esta seqüência de DNA foi preferida em relação a uma seqüência do DNA nuclear, porque a repetição permitiu aumentar a quantidade de DNA alvo nas amostras de DNA dos bovinos (composta majoritariamente pelo DNA do hospedeiro vertebrado) utilizadas para as análises.

Essa técnica permitiu diagnosticar um maior número de animais infectados por *Babesia spp.*. Observou-se que todos os bovinos em que a parasitemia foi diagnosticada por meio do exame direto tiveram resultados positivos também nas qPCRs.

5.2.3. *Babesia bovis*

Os resultados observados mostraram que a taxa de infecção por *B. bovis* para os bovinos estudados foi de 98,0% (146/149). As taxas de infecção apresentadas pelos animais dos três grupos genéticos foram de 100,0% (48 positivos), 98,0% (50/51) e 96,0% (48/50) para os grupos genéticos Angus, cruzados e Nelore, respectivamente.

As análises estatísticas do nível de infecção medido pelo número de cópias de DNA alvo nas amostras mostraram significância ($P < 0,05$) dos três fatores avaliados:

grupo genético, categoria e a interação entre eles. Os três grupos genéticos apresentaram diferenças significativas entre si ($P < 0,05$).

As médias dos quadrados mínimos do log do número de cópias do DNA alvo, apresentados na Tabela 3 conforme o grupo genético e a categoria representam a estimação da quantidade relativa do número de parasitas existentes no DNA dos bovinos, uma vez que um número variável de cópias do DNA alvo está presente em cada merozoíta de *Babesia bovis*.

Tabela 3. Médias dos quadrados mínimos do logaritmo (base 10) do número de cópias de DNA alvo de *Babesia bovis* obtidos pela técnica de qPCR e os respectivos erros padrão, de acordo com os grupos genéticos e categorias.

Grupo Genético	Bezerro	Vaca	Média
Angus	5,81 ^{a,A} ± 0,12	5,69 ^{a,A} ± 0,11	5,75 ^a ± 0,081
Cruzado	4,72 ^{b,A} ± 0,11	3,85 ^{b,B} ± 0,11	4,29 ^b ± 0,079
Nelore	4,47 ^{b,A} ± 0,11	3,70 ^{b,B} ± 0,11	4,08 ^b ± 0,081
Média	5,0 ^A ± 0,067	4,41 ^B ± 0,065	

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas linhas ou de letras minúsculas iguais nas colunas não diferem significativamente ($P < 0,05$).

A quantidade de DNA alvo de *B. Bovis*, detectada pela técnica de amplificação do DNA de sangue de bezerros foi significativamente superior ao de vacas, apresentando diferenças significativas ($P < 0,05$). Em apenas dois bezerros Nelore e uma vaca cruzada não foi possível diagnosticar e estimar o nível de infecção. A amplificação do DNA empregando sequências específicas para *B. bovis* possibilitou detectar 97,3% (72/74) de amostras de sangue positivas de bezerros e 98,7% (74/75) das amostras de vacas positivas, indicando que a taxa de infecção em animais jovens, embora mais baixa, não difere de maneira importante dos animais adultos.

Os resultados mostraram que, embora os *Bos indicus* tenham apresentados taxa de infecção apenas ligeiramente menor apresentaram um nível de infecção consideravelmente menor quando comparados aos *Bos taurus*, sendo que os cruzados encontram-se em posição intermediária, porém bem mais próximos dos zebuínos do

que dos taurinos, em valores absolutos. Os animais Nelore e cruzados não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância. Os *Bos taurus* apresentaram maior suscetibilidade às infecções por *Babesia bovis*, fato este traduzido pelo maior nível de infecção. Ressalva-se, entretanto, que em função da maior carga de carrapatos nos animais Angus, uma parte dessa diferença pode talvez ser atribuída a maior quantidade de inóculo.

5.2.4. *Babesia bigemina*

Não foi possível realizar o diagnóstico, ou estimar o nível de infecção por *B. bigemina* nos animais da raça Nelore pelo método da qPCR. Após a execução das reações de qPCR neste grupo genético, foi observada a formação de dímeros de primers, tornando inviável a estimativa da quantidade de DNA alvo nas amostras de sangue. Isto provavelmente é devido a níveis de infecção muito baixos por *B. bigemina* nesta raça.

Os resultados observados nos outros grupos genéticos (Angus e cruzados) mostraram que, a taxa de infecção por *B. bigemina* para os 99 bovinos considerados foi de 100%. A técnica de amplificação de DNA possibilitou diagnosticar a parasitemia em todos eles.

Da mesma forma que para a *B. Bovis*, as médias dos quadrados mínimos do log do número de cópias do DNA alvo apresentada na Tabela 4, conforme o grupo genético e a categoria, não representam exatamente o número de parasitas presentes no DNA dos bovinos. Apesar disto, podem representar uma boa estimativa do nível de infecção de cada animal, supondo que o número médio de cópias do DNA alvo em cada merozoíta seja independente do grupo genético e categoria do hospedeiro. No entanto, não é possível comparar o nível de infecção por *B. bigemina*, com aqueles observados nos ensaios com *B. bovis*, uma vez que o número de cópias do DNA alvo pode ser dependente da espécie do parasita.

Tabela 4. Médias dos quadrados mínimos do logaritmo (base 10) do número de cópias de DNA alvo de *Babesia bigemina* obtidos pela técnica de qPCR e respectivos erros padrão, de acordo com os grupos genéticos e categorias.

Grupo Genético	Bezerro	Vaca	Média
Angus	4,80 ^{a,A} ± 0,17	3,58 ^{a,B} ± 0,15	4,18 ^a ± 0,11
Cruzado	3,62 ^{b,A} ± 0,15	3,32 ^{a,A} ± 0,15	3,47 ^b ± 0,11
Média	4,20 ^A ± 0,11	3,45 ^B ± 0,11	

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas linhas ou de letras minúsculas iguais nas colunas não diferem significativamente (P<0,05).

Os resultados mostraram que a quantidade de DNA alvo deste protozoário, detectado pela técnica de amplificação do DNA de sangue de bezerros foi superior a de vacas, apresentando diferenças significativas (P<0,05). Os animais cruzados apresentaram um nível de infecção menor quando comparados aos *Bos taurus*, que mostram maior suscetibilidade às infecções por *B. bigemina*.

5.3. PCR e nPCR em bovinos Nelore

Produto de amplificação de DNA extraído de sangue de animais Nelore, submetidos inicialmente à técnica de PCR, permitiu diagnosticar 78,0% (39/50) do rebanho infectado por *Babesia spp.*. Dessa maneira, 96,0% (24/25) das amostras de sangue de bezerros e 60,0% (15/25) das vacas Nelore apresentaram parasitemia patente aos hemoparasitas.

Das 50 amostras de DNA extraídas deste grupo genético, 92,0% (46) foram positivas pela técnica de nPCR, sendo que 84,0% das vacas (21/25) e 100% dos bezerros foram positivas. A Figura 6 mostra os resultados observados por meio da eletroforese em gel de agarose.

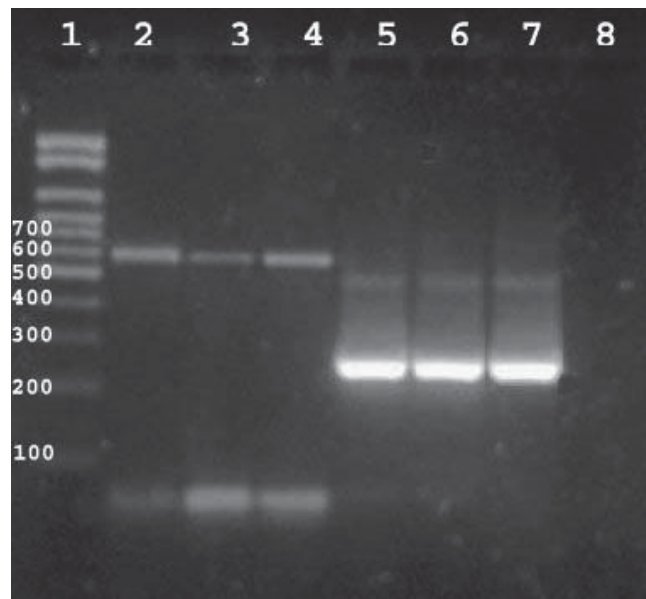


Figura 6. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *B. bigemina* pelas técnicas de PCR e nPCR: padrão de pares de bases (poço1), PCRs (poços 2 e 3), controle positivo PCRs (poço 4), nPCRs (poços 5 e 6), controle positivo nPCRs (poço 7) e controle negativo da reação (poço 8).

6. DISCUSSÃO

Para o presente experimento foram escolhidas propriedades rurais que exploravam bovinos pertencentes a grupos genéticos diferentes: animais puros *Bos indicus*, puros *Bos taurus* e mestiços destas duas raças. A fazenda 3E Agropecuária localizada em São José do Rio Preto mantém apenas animais da raça Angus. Na APTA em Colina, além da criação de bovinos Nelore, existem na propriedade, animais de outras raças. A fazenda Experimental da Embrapa em São Carlos explora bovinos de várias raças, para produção de carne e leite.

Dentre as fazendas visitadas, apenas a 3E Agropecuária registrou a ocorrência de mortalidade em bezerros, aparentemente provocadas pela infecção por hemoparasitas. A região de São Carlos já foi previamente caracterizada como uma área de estabilidade endêmica para as babesioses, com infecções ocorrendo nas primeiras semanas de vida dos bezerros (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al. 2005; OLIVEIRA et al., 2008). Embora não existam informações sobre as demais regiões, suspeitava-se que também apresentassem características de estabilidade endêmica, devido, principalmente, à ocorrência de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do vetor durante quase todos os meses do ano.

O comportamento epidemiológico das infecções por *B. bovis* e *B. bigemina* é um importante parâmetro para ser usado na previsão da ocorrência de surtos destas doenças. A estabilidade endêmica caracteriza a maior parte das regiões produtoras de bovinos no Brasil. Nestas regiões o carrapato transmissor *R. (B.) microplus* ocorre durante quase todos os meses do ano, de modo que a taxa de transmissão de *Babesia spp.* é suficiente para infectar a maioria dos bezerros antes que a imunidade passiva conferida pelo colostro seja perdida (MAHONEY & ROSS, 1972).

De modo geral, os bezerros são considerados mais resistentes às infecções por estes protozoários, e nas regiões onde a doença ocorre na forma de endemia estável, casos clínicos são observados primordialmente nestes animais. Os bovinos adultos desenvolvem, pela prolongada exposição aos carrapatos, sólida resistência. Em regiões

onde as baixas temperaturas impedem o desenvolvimento do carrapato vetor por alguns meses, surtos de babesioses podem acometer animais jovens e adultos, com conseqüências mais graves para os últimos.

Neste experimento a detecção de merozoítas de *B. bigemina*, em exames microscópicos de esfregaços sanguíneos de bezerros e as altas taxas de infecção por *Babesia spp.* detectadas por exames moleculares nas categorias observadas, confirmaram as suspeitas de que nas regiões estudadas as babesioses ocorrem na forma de endemia estável. Pode-se verificar que mesmo nos bovinos adultos, em que se detectaram merozoítas de babesias, não haviam sinais clínicos característicos da doença, como anemia, apatia, hemoglobinúria, icterícia, prostração, anorexia, desidratação e pelagem áspera.

As babesioses clínicas foram observadas principalmente nos bezerros da raça Angus. Apesar destes animais serem considerados menos suscetíveis dentre os animais do rebanho, inúmeros casos clínicos foram registrados nesta categoria. A ocorrência da forma clínica das babesioses nos bezerros pode ser explicada pela queda na imunidade passiva, que ocorre a partir do 28º dia após o nascimento (MADRUGA et al., 1984; FARIAS, 1995).

Os bovinos jovens só apresentam o sistema imune completamente maduro a partir dos quatro meses de vida. Ocorre então, um curto período de tempo em que o sistema imune não é capaz de produzir uma resposta protetora e os anticorpos colostrais já estão sendo degradados em larga escala. Durante este período, as infecções com as cepas patogênicas de babesias, inoculadas pelos carrapatos podem produzir casos clínicos severos. Os bezerros que se recuperam da infecção primária e também devido às constantes inoculações dos agentes infecciosos em função da exposição aos carrapatos, desenvolvem sólida imunidade e se tornam portadores sadios. Tanto os bezerros como os bovinos adultos infectados tem importante papel na manutenção da endemia, visto que os carrapatos que se alimentam neles transmitem a infecção à sua progênie.

O diagnóstico das babesioses em animais clinicamente afetados por meio de exame microscópico de esfregaços sanguíneos é considerado um método de

diagnóstico bastante barato e conclusivo. No entanto, a *B. bigemina* foi à única espécie diagnosticada por este método no presente estudo. Os dados verificados estão de acordo com os resultados obtidos por OLIVEIRA et al. (2005), em pesquisas utilizando animais oriundos de rebanhos leiteiros $\frac{1}{2}$ *Bos taurus* + $\frac{1}{2}$ *Bos indicus*, no qual foi diagnosticado infecções por *B. bigemina* exclusivamente em animais jovens por meio de exames diretos.

O manejo adotado em todas as propriedades estudadas permitiu que os bezerros tivessem contato com o carrapato, logo após o nascimento. Como já comentado anteriormente, nessa fase, os animais estão protegidos pelos anticorpos colostrais e pelos resquícios de hemoglobinas fetais. Após esta fase os animais desenvolvem seus próprios anticorpos e, a constante inoculação das babesias pelos carrapatos garante a manutenção de altos títulos de anticorpos ao longo da vida destes animais.

Com relação ao volume globular (VG) é normal que os bezerros apresentem uma média mais alta ao nascimento, já que eles nascem com cerca de 40% de hematócrito e após sucessivas infecções pelos parasitas que produzem hemólise, ocorra uma queda em seu valor. Os valores de VG se elevam rapidamente nos animais que se restabelecem das infecções, porém não atingem mais os níveis encontrados nos bezerros recém-nascidos, tendendo a ter o VG mais baixo. Apesar destas observações não foi verificada associação entre estes valores e a presença de babesias em bovinos infectados.

A temperatura corporal aferida de todos os animais também variou dentro dos limites normais para os bovinos adultos, sendo que os bezerros apresentaram temperaturas mais altas. Pôde-se observar que todos os bezerros em que foi diagnosticada parasitemia por babesias, apresentaram temperatura retal superior a 39,5, que é considerado o limite superior para bovinos. Alguns fatores devem ser levados em conta na interpretação destes resultados. Primeiro é que como puderam ser observados pelos exames diretos dos esfregaços sanguíneos, alguns bezerros apresentaram babesiose clínica, o que provocou um aumento da temperatura corporal. Em alguns animais com hipertermia, no entanto, não foi possível a detecção de

hemoparasitas, devido principalmente à baixa sensibilidade da técnica de exame direto. Outro fator que pode ter alterado a temperatura corporal dos animais é a temperatura ambiente nos dias da colheita, já que eles foram mantidos em currais sem proteção contra a luz solar direta até o momento da aferição da temperatura.

Alguns autores consideraram que a incorporação de animais *Bos indicus* aos rebanhos poderia diminuir a taxa de inoculação de babesias e assim transformar áreas de estabilidade endêmica em áreas com instabilidade (MAHONEY et al., 1981; GUGLIELMONE, 1995; UILEMBERG, 1995). Os dados obtidos por OLIVEIRA et al. (2008) mostraram que as taxas de infecção por *B. bigemina*, foram altas e não diferiram entre animais de idades e constituição genética diferente. Estes pesquisadores trabalharam, no entanto, com testes de amplificação de DNA dos parasitas de forma que os resultados eram qualitativos.

Neste experimento para a verificação da ocorrência de diferenças entre a suscetibilidade dos animais foram usadas técnicas quantitativas, que permitissem eliminar algumas das limitações das técnicas de PCR comuns.

A qPCR empregada neste estudo, para detectar o níveis de infecção por *Babesia spp.* em bovinos de diferentes grupos genéticos, permite o diagnóstico rápido da doença, geralmente com alta sensibilidade (Ke et al., 2006), além de discriminar as espécies envolvidas. Apesar disso, *B. bigemina* só pôde ser diagnosticada e quantificada por este método nos animais *Bos taurus* e $\frac{1}{2}$ *Bos taurus* + $\frac{1}{2}$ *Bos indicus*. Em função dos baixos níveis da parasitemia observadas em animais da raça Nelore, não foi possível proceder à quantificação de *B. bigemina* nestes animais. Na verdade foi verificado que há uma limitação da técnica quantitativa em relação à qualitativa. Pelo fato da primeira apresentar uma alta sensibilidade, é necessário trabalhar com pequenas concentrações conhecidas de DNA na amostra. Como se trabalhou com DNA total do sangue, a maior parte do DNA presente na amostra é do hospedeiro, originário principalmente das células brancas do sangue. O genoma dos protozoários é muito menor que do hospedeiro e dessa forma, quando a amostra é diluída, a frequência do DNA alvo fica reduzida e também fica reduzida a possibilidade de amplificação. Pode ser verificado ainda que amostras de animais da raça Nelore que amplificaram em

pequena quantidade, tiveram suas curvas confundidas com dímeros dos “primers” e assim não puderam ser quantificadas. Dessa forma, foram necessárias análises do tipo nPCRs para o diagnóstico da doença neste grupo genético. Para estes testes pode-se usar quantidades maiores de DNA não diluído, fato que facilita bastante a identificação dos animais positivos.

Os ensaios de PCR foram feitos usando “primers” comuns as duas babesias (*B. bovis* e *B. bigemina*) na primeira reação (KB 16 e KB 17) e específicos para *B. bigemina* na segunda reação de nPCR (KB 18 e KB 19). Estes “primers” amplificam uma região do gene 18s, sendo altamente conservado dentro da espécie de protozoário (GUERRERO et al., 2007), fato que contribuiu para prevenir a ocorrência de falso - negativos. Os resultados obtidos nas análises dos animais da raça Nelore confirmaram a alta sensibilidade deste teste, que possibilitou a identificação de 78% de animais infectados na primeira PCR e 92% na segunda reação de nPCR. Os resultados indicaram ainda que o DNA de *B. bigemina* foi detectado com maior frequência em bezerros, achado que se semelham aos observados por OLIVEIRA et al., (2005), que diagnosticaram uma maior taxa de infecção por *B. bigemina* em bezerros em comparação a vacas de raça mestiça leiteira .

Tem sido verificado que as técnicas de amplificação do DNA parasitário realmente possibilitam detectar a presença das babesias em um número significativamente maior de animais, quando comparadas ao exame microscópico de esfregaços sanguíneos. Neste trabalho foi observado que todos os bovinos em que a parasitemia foi detectada pelo método direto, foram positivos nas reações de amplificação de DNA dos parasitas.

O objetivo deste trabalho era quantificar o nível de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos dos diferentes grupos genéticos e idades. Entretanto, devido ao número variável de cópias do DNA alvo nas amostras, a técnica permitiu apenas estimar de forma relativa. O fato do gene do citocromo b, utilizado nessas reações ser multicópias (BULING et al.; 2007; CRIADO-FORNELIO et al., 2007), acarretou inconvenientes, como a impossibilidade de quantificar de forma exata, o número de merozoítas presentes nas amostras de bovinos infectados. Esta parece ser uma

desvantagem sobre a utilização da amplificação de parte do gene *msa2c* para *B. bovis*, sendo este cópia única no genoma desta espécie (RAMOS et al., 2011). No entanto, se por um lado a utilização da amplificação de um gene multicópias pode complicar a quantificação do DNA alvo, usar um gene de cópia única pode inviabilizar a detecção do parasita. Isto se deve principalmente ao problema já comentado anteriormente de o DNA do hospedeiro ser maioria na amostra.

Todavia, a sintomatologia clínica característica das babesioses, raramente se manifesta em *Bos indicus*, como a raça Nelore e animais oriundos de seus cruzamentos com *Bos taurus* (BOCK et al., 1997). Nas regiões de estabilidade endêmica, onde não ocorre o compartilhamento das pastagens entre animais das diferentes subespécies, a resistência dos animais de origem indiana se torna ainda mais perceptível (MADRUGA et al., 1984).

As técnicas de amplificação do DNA parasitário possibilitaram o diagnóstico de um maior número de animais, quando comparadas ao exame microscópico de esfregaços sanguíneos. Observou-se também, que todos os bovinos em que a parasitemia foi detectada por este método tiveram resultados positivos nas qPCR/nPCR. De modo semelhante, OLIVEIRA et al. (2005) verificaram maior sensibilidade nas técnicas moleculares no diagnóstico das espécies de babesias nas categorias animais, consideradas em sua pesquisa.

A taxa de infecção por *B. bovis* foi de 98,0%, das quais, 100%, 98,0% e 96,0% foram às taxas apresentadas por Angus, cruzados e Nelore, respectivamente. Ao se considerar a categoria animal, bezerros apresentaram uma taxa de infecção de 97,3%, e as vacas 98,7%. Os índices foram elevados, e não diferiram estatisticamente entre grupos genéticos e categorias observadas. As análises do nível de infecção medido pelo número de cópias de DNA alvo nas amostras de bezerros foi significativamente superior ao de vacas. Os resultados mostraram ainda que os *Bos taurus* apresentaram maior suscetibilidade às infecções por *B. bovis*, fato este traduzido pelo maior nível de infecção.

Para *B. bigemina*, os resultados observados em animais Angus e cruzados mostraram que, a técnica de amplificação de DNA possibilitou diagnosticar a

parasitemia em todos eles. Os resultados mostraram que a quantidade de DNA alvo deste protozoário, detectado pela técnica de amplificação do DNA de sangue de bezerros foi superior a de vacas. Mostraram ainda, que animais cruzados apresentaram um nível de infecção menor quando comparados aos *Bos taurus*.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta investigação permitem concluir que as regiões estudadas apresentam características típicas de áreas de estabilidade endêmica para as babesioses bovinas. Permitem ainda, extrair as seguintes conclusões:

- 1) O método padronizado, embora não possibilite a quantificação exata do nível de infecção, foi eficaz para detectar diferenças nos níveis da parasitemia em animais por *Babesia spp.*;
- 2) A técnica de amplificação de DNA por qPCR/nPCR apresenta alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico das *Babesia spp.* em amostras de sangue de bovinos;
- 3) A técnica de amplificação de DNA por qPCR/nPCR permite a detecção de infecções por *Babesia spp.* em animais jovens já no primeiro mês de vida e dos adultos que se encontram em estado de portador;
- 4) Os níveis elevados de infecção em bovinos da raça Angus demonstram a suscetibilidade desta subespécie aos agentes das babesioses, sendo que Nelore e cruzados apresentam alta e moderada resistência, respectivamente;
- 5) As diferenças entre *Bos taurus* e *Bos indicus* quanto à resistência as babesioses bovinas, está mais relacionada com o nível de infecção do que com a taxa de infecção;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLSOPP, M. T., CAVALIER-SMITH, T., DE WAAL, D. T. & ALLSOPP, B. A. Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, v.108, p.147–152, 1994.

ANDRADE, A. B. F. **Aspectos genéticos e ambientais da resistência a *Boophilus microplus* de bovinos da raça Gir, da estação experimental da Epamig, Uberaba, MG, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, p.79, Jaboticabal, 1996.

ALONSO, M., ARELLANO-SOTA, C., CERESER, V.H. et al. Epidemiology of babesiosis in Latin America and the Caribbean. **Revue Science Techonology Off International Epizootiology**, v.11, n. 3, p.713-733, 1992.

ANGUS, B. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **International Journal of Parasitology**, v.26, p. 1341–1355, 1996.

AZAMBUJA, C.; GAYO, V.; SOLARI, M.; SUAREZ, M.; STOLL, M. Biotechnology applied to the detection of infectious agents in cattle. Diagnosis of *Babesia bovis* by PCR. **Rev. Bras. Parasitol.**, Vet v.3, p.1-4, 1994.

BELTRAN, L.G. Características de lá campaña nacional mexicana contra lá garrapata. In: SEMINÁRIO SOBRE ECTOPARASITAS, 1, 1977, Colombia. Anais... Colombia, p.77-96, 1977.

BENAVIDES, M.V.; SACCO, A. M. S. Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. **Vet. Parasitol.**, v.150, p.54-64, 2007.

BEST, E.L.; FOX, A.J.; FROST, J.A.; BOLTON, F.J. Real-time singlenucleotide polymorphism profiling using Taqman technology for rapid recognition of *Campylobacter jejuni* clonal complexes. **J. Med. Microbiol.**, v.54, p.919–925, 2005.

BOCK, R.E.; JACKSON, I. DE VOS, A.J.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitol.**, v. 129, n. 2, p.247-69, 2004.

BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; DE VOS, A. J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v.77, n.7, p.461-464, 1999.

BOCK, R.E., de VOS, A.J., KINGSTON, T.G., McLELLAN, D.J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale*. **Aust. Vet. J.**, v.75, n.5, p.337-40, 1997.

BÖSE, R., JORGENSEN, W.K., DALGLIESH, R.J., FRIEDHOFF, K.T., DeVOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet. Parasitol.**, v.57, p.61-74, 1995.

BOWMAN, D. D. & Colaboradores. Georgis - Parasitologia Veterinária. Rio de Janeiro: p.783. Elsevier, 2010.

BROWN, W.C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D.P.; GOFF, W.L. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Vet. Parasitol.**, v.138, p.75-87, 2006.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ACENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBACARRETERO, J.C.; FLORIN-CRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Vet. Parasitol.**, v.147, p.16-25, 2007.

BYFORD I, COLDITZ P AND SIBBICK R. A tick resistant dairy breed. Queensl. **Agric. J.**, v.102, p.11-15, 1976.

CALLOW, L. L.; HOYTE, H. M. D. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia sp.*, and the cattle tick *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.**, v.37, p.381-390, 1961.

CALLOW, L.L. Protozoan and rickettsial diseases. In: Australian Bureau of Animal Health (ed.), Animal Health in Australia. Aust. Gov. Publishing Serv. Canberra., v.5, p.121-216, 1984.

CARDOSO, V. **Avaliação de diferentes métodos de determinação da resistência genética ao carrapato *Boophilus microplus* em bovinos de corte.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, p.108, Jaboticabal 2000.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, v.124, p.107-114, 2007.

CONNAWAY, J.W.; FRANCINES, M. Texas Fever: experiments made by Missouri Experiment Station and the Missouri State Board of Agriculture in cooperation with Texas Experiment Station in immunizing Northern breeding cattle against Texas Fever from the Southern trade. **Missouri Agriculture Experiment Station Bull**, v.48, p.1-64, 1899.

COSTA-JUNIOR, L. M.; RABELO, E. M. L.; MARTINS-FILHO, O. A.; RIBEIRO, M. F. B. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. **Vet. Parasitol.**, v.139, n.1-3, p.231-236, 2006.

CRIADO-FORNELIO, A. A review of nucleic acid based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria* with emphasis on bovine piroplasmida. **Parassitologia** v.49, p.39-44, 2007.

De WAAL, D.T. Vaccination against Babesiosis. **Acta Parasitol. Turcica**, v.20, p.487-516, 1996.

FIGUEROA, 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. **Vet. Parasitol.**, v.50, p.69-81, 1993.

FIGUEROA, J.V.; ALVAREZ, J.A.; CANTO, G.J.; MOSQUEDA, J.J.; BUENING, G.M. Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. **Ann. N.Y. Acad. Science**, v.23, n.791, p.117-27, 1996.

FAHRIMAL, Y., GOFF, W.L., JASMER, D.P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.6, p.1374-9, 1992.

FARIAS R.N.A. In: Diagnóstico e Controle da Tristeza Parasitária Bovina. Livraria e Editora Agropecuária, p.80, 1995.

FONSECA, A., BRAGA, A. Noções sobre a tristeza parasitária dos bovinos. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, p.216, 1924.

FOLLO, M.Y.; BOSI, C.; FINELLI, C.; FIUME, R.; FAENZA, I.; RAMAZZOTTI, G.; GABOARDI, G.C.; MANZOLI, L.; COCCO, L. Real-time PCR as a tool for quantitative analysis of PI-PLCbeta1 gene expression in myelodysplastic syndrome. **Int. J. Mol. Med.**, v.18, p.267–271, 2006.

FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da Raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.6, p.1578-1586, 2003.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SANCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SANCHEZ, A.; ROURA X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol.**, v.137, p.214–221, 2006.

FRISCH, J.E.; O'NEIL, C.J.; KELLY, M.J. Using genetics to control parasites – The Rockhampton experience. **Int. J. Parasitology**, v.30, p.253-264, 2000.

GOMES, A. O *Boophilus microplus*. In: KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte, p.10-46, 1998.

GONÇALVES, P.M. Epidemiologia e Controle da Tristeza Parasitária Bovina na Região Sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.187-194, 2000.

GRISI, L.; MASSARD, C.L; BORJA, E.M. & PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v.21, p.8-10, 2002.

GUAN M. KE.; HUSEN L. CHENG.; LIANG Y. KE.; et al. Development of a quantitative light cycler real time RT-PCR for detection of avian reovirus. **Journal of Virological Methods**, p.6-13, 2006.

GUERRERO, F.D.; BENDELE, K.G.; DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from outbreaks in South Texas. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.156-163, 2007.

GUGLIELMONE, A. Epidemiologia de los principales hemoparasitos transmitidos por el *Boophilus microplus*. X Congreso Latinoamericano de Parasitologia. I Congreso Uruguayo de Parasitologia, 1991.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci**, v.82, p.349-360, 2004.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; & WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, v.6, n.10, p. 986-994, 1996.

HOYTE, H.M. Initial development of infectious *Babesia bigemina*. **Australian Veterinary Journal**, v.8, p.462-466, 1961.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.417, 1993.

JAMES, M.A., CORONADO, A., LOPEZ, W., et al. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. **Tropical Animal Health Production**, v. 17, p. 9-18, 1985.

JOHNSTON, L.A.Y., LEACH, G., JONES, P.N. The duration of latent infection and functional immunity in Droughtmaster and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. **Aust. Vet. J.**, v.54, p.14-18, 1978.

JONSSON, N.N.; BOCK, R.E.; JORGENSESN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesioses on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Vet. Parasitol.**, v. 155, p.1-9, 2008.

JONSSON, N.N & HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.193-198, 2007.

JONSSON, N.N., MILLER, R.J., ROBERTSON, J.L.. Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.307-315, 2007.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.1-10, 2006.

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*), **Vet. Parasitol.**, v.17, n.89, p.297-305, 2000.

KAKOMA, I., MELHORN, H. Babesia of Domestic Animals. In: KREIER, J.P. (Ed). **Parasitic Protozoa**, Academic Press, p.141-216, 1994.

KREIER, J.P. Babesia of Domestic Animals . **Parasitic Protozoa**. Vol.IV. New York, Academic Press, p.1-52, 1977.

KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. M.; RIBEIRO, O. C. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* em bezerros no Estado do Mato Grosso do Sul. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.18, n.8, p.931-935, 1983.

LALLY, N.C., JENKINS, M.C., DUBEY, J.P. Development a polymerase chain reaction assay for the diagnostics of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. **Mol. Bioch. Parasitol.**, v.75, p.169-78,1996.

LEMOS, A. M.; TEODORO, R.L.; OLIVEIRA, G.P. et al. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzerá in Brasil. 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. *Animal production*, v.41, p.187-191,1985.

LEMOS, A. M. A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato. Juiz de Fora: Embrapa, CNPGL, p.42, 1986.

LENG, X.; MOSIER, D.A.; OBERST, R.D. Simplified method for recovery and PCR detection of *Cryptosporidium* DNA from bovine feces. **App. Environ. microbiol.**, v.62, p.643-7, 1996.

LEVINE, N.D. Blood parasites: the piroplasma. In: N.S. Levine (Editor), *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. CRC Press, Boca Raton, v.2, p.35-45, 1988.

LEVINE, N. D. Taxonomy of the piroplasms. *Transactions of the American Microscopical Society* v.90, p.2–33, 1971.

MACKENSTEDT, U., GAUER, M., FUCHS, P., ZAPF, F., SCHEIN, E., MEHLHORN, H. DNA measurements reveal differences in the cycle of *Babesia bigemina* and *Babesia canis*, two typical members of the genus *Babesia*. **Parasitol. Res.**, v.81, p.595-64, 1995.

MADALENA, F.E.; TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; OLIVEIRA, G.P. Causes Of Variation Of Field Burdens Of Cattle Ticks (*B.Microplus*). **R. Bras. Genet.**, v.8, n.2, p.361-375, 1985.

MADRUGA, C.R., KESSLER, R.H., SCHENK, M.A.M. A Conglutination test for a rapid detection of antibodies against *Babesia bigemina*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.20, n.4, p.161-6, 2000.

MADRUGA, C.R., KESSLER, R.H., SCHENK, M.A.M., HONER, M.R., MIGUITA, M. Análise de testes de conglutinação rápida para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.47, n.5, p.649-57, 1997.

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. Campo Grande, EMBRAPA-CNPGC, p.7, 1987.

MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R.H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEIREDO, G. R.; CURVO, J. B. E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p.1163-1168, 1984.

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G. B. *Babesia argentina*: the infection of splenectomized calves with extracts of larval ticks (*Boophilus microplus*). **Res. Vet. Sci.**, v.16, p.112-114, 1974.

MAHONEY, D. F.; WRIGHT, I. G., MIRRE, G. B. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infections. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.67, p.197-203, 1973.

MAHONEY, D.F.; ROSS, D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Aust. Vet. J.**, v.48, p.292-8, 1972.

MARQUES, D.C. Criação de bovinos. **Editora da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, MG, 1969.

MATTIOLI, R.C; PANDEY, V.S; MURRAY,M; FITZPATRICK, J.L. Immunogenetic influences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) and trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. **Acta Trop.**, v.75, p.263–77, 2000.

McLEOD, R. &KRISTJANSON, P. Final report of joint esys/ILRI/ACIAR Tick Cost project – Economic impact of ticks and tick-borne diseases on livestock in Africa, Asia and Australia. **International Livestock Research Institute**, Nairobi, 1999.

MONIS, P.T.; GIGLIO, S.; KEEGAN, A.R.; ANDREW THOMPSON, R.C. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. **Trends Parasitol.**, v.21, p.340–346, 2005.

MONTENEGROJAMES, S.; JOHNSON, W. C.; GOFF, W. L. Development of conventional subunit vaccines for anaplasmosis and babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.255-266, 1995.

MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v.55, p.335-350, 1987.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Vet. Parasitol.**, v.57, p.153-165, 1995.

OLIVEIRA, M.C.S., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; REGITANO, L.C.A.; ALENCAR, M.M.; NÉO, T.A.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA, H.N. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. **Vet. Parasitol.**, v.155, p. 281-286, 2008.

OLIVEIRA, M.C.S., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., ARAUJO JR, J.P., AMARANTE, A.F.T., OLIVEIRA, H.N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged female and eggs in São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.130, p.61-67, 2005.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., OLIVEIRA, M.C.S., ARAUJO JR, J.P., AMARANTE, A.F.T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v.35, p.105-111, 2005.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C., AMARANTE, A.F., FERRARI, T.B. & NUNES, L.C.. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.19–27, 2002.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M.; FREITAS, A. R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. II. Infestação natural. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.24, n.10, p.1267-1271, 1989.

OURA, C.A.; BISHOP, R.P.; WAMPANDE, E.M.; LUBEGA, G.W.; TAIT, A. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. **Int. J. Parasitol.**, v.34, p.603-613, 2004.

PATARROYO, J. H.; VARGAS, M. I.; BICUDO, P. L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.11, p.301-308, 1982.

RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; SOUZA, I. I. F.; BACANELLI, G.; LUIZ, HERA. L.; RUSSI, L. S.; OLIVEIRA, R. H. M.; SOARES, C. O.; ROSINHA, G. M. S.; ALVES, L. C. Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.79-83, 2011.

RIEK, R. F. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignie`res, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research** v.17, p.247-254, 1966.

RIEK, R. F. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research.**, v.15, p.802–821, 1964.

RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (canestrini). **Aust. J. Agric. Res.**, v.13, p.532-552, 1962.

ROPER, C., ELHASSAN, I.M., HVIID, L., GIHA, H., RICHARDSON, W., BABIKER, H., SATTI, G.M.H., THEANDER, T.G., ARNOT, D.E. Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p.325-31, 1996.

SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.; HORN, G.; and ERLICH, H. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.

SAIKI, R.K; GELFAND, D.H; STOFFEL, S; SCHARF, S.J; HEGUCHI, R; HORN, G.T; MULLIS, K.B; ERLICH, H.A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p. 487-491, 1988.

SAS, Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, version 6.11, 4ed., v.2, Cary, SAS Institute Inc., 842p, 1996.

SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S; JÚNIOR, W. B. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.1150-1155, 2007.

TEODORO, R.L.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A.; VERNEQUE, R.S. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. IN: V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, Pirassununga. Anais, Pirassununga, SP, 2004.

TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; MOREIRA, D.P.; MADALENA, F.E. Resistência genética dos bovinos ao carrapato (*Boophilus microplus*). VII. Resistência de touros mestiços sob infestação artificial. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 21, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte, MG, p.54, 1984.

THIESEN, W.L. Biologia do carrapato *Boophilus microplus*. In: Seminário Nacional sobre parasitose dos bovinos, 1., Campo Grande: SBZ, p.207-215. Anais, 1979.

UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Vet. Parasitol.**, v. 57, n.1-3, p.19-41, 1995.

UILENBERG, G. Babesia – A Historical overview. **Vet Parasitol.**, v.138, n.1-2, p.3-10, 2006.

UTECH, K.B.W.; SEIFERT, G.W.; WHARTON, R.H. Breeding Australian Illawarra Shorthorn cattle for resistance to *Boophilus microplus*. I. Factors Affecting Resistance. **Australian Journal Agricultural Research**, v.29, p.411-422, 1978.

WAGNER, G., CRUZ, D., HOLMAN, P., WAGHELA, S., PERRONE, J., SHOMPOLE, S., RURANGIRWA, R. Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, supl. III, p.193-199, 1992.

WAMBURA, P.N.; GWAKISA, P.S.; SILAYO, R.S.; RUGAIMUKAMU, E.A. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Vet. Parasitol.** v.77, p.63-70, 1998.

WRIGHT, I.G.; RIDDLES, P.W. Biotechnology in tick born diseases. Present status, future perspectives. FAO – Un Biotechnology for Livestock Production Plenum., New York, p.240-325, 1989.

WRIGHT, I.G.; GOODGER, B. V.; McKENNA, R. V. and MAHONEY, D. F. Acute *Babesia bovis* infection: A study of vascular lesions. *Z.Parasitenkd.* v.60, p.19-27, 1979.