

**AVALIAÇÃO DE REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA SEMI-NESTED (PCR-SN)
BASEADOS NA SEQUÊNCIA DO GENE SS-rRNA DE *Babesia bigemina*
PARA DIAGNÓSTICO DESSE HEMOPROTOZOÁRIO**

Olegário, L. A. O. (1); Ferreira, A. J. C. (2); Ferreira, R. L. (1); Picoloto, G. (2); Vilas-Boas, J. C. (1); Araújo, F. R. (3); Kessler R. H; Madruga, C. R. (3). (1) Bolsista de Iniciação Científica do CNPq, lillian@cnpqc.embrapa.br. (2) Bolsista de Aperfeiçoamento Técnico do CNPq. (3) Pesquisador, Embrapa Gado de Corte.

A *Babesia bigemina* é um hemoprotozoário que juntamente com a *Babesia bovis* e a riquetsia *Anaplasma marginale* são os agentes etiológicos da Tristeza Parasitária Bovina, que causa considerável impacto sanitário e econômico à pecuária de áreas tropicais. A identificação de animais portadores é fundamental para o diagnóstico epidemiológico e estabelecimento de uma estratégia de controle. A reação da polimerase em cadeia (PCR) na sua forma padrão (PCR-S) aumentou consideravelmente a sensibilidade das provas de diagnóstico direto. A introdução da PCR *nested* ou *semi-nested* (PCR-SN) melhorou ainda mais a sensibilidade das provas de diagnóstico direto. O objetivo desse trabalho foi avaliar uma PCR-SN com relação a PCR-S e as provas sorológicas de imunofluorescência indireta (IFI) e de imunoabsorção enzimática (ELISA), em 40 animais criados em área de estabilidade endêmica. Os primers foram desenhados com base na sequência do gene SSr-RNA (GenBank X59604). A PCR-S com os primers forward GAU5 (F) 5' – TGGCGGCGTTTATTAGTTCG – 3' e GAU6 (R) reverso 5' – CCACGCTTGAAGCACAGGA – 3' e a PCR-SN com o mesmo primer forward da reação anterior e reverso GAU8 (R), 5' – GCCAGCGAAAAGACCCAAC – 3'. As reações com volume de 50 µL foram executadas utilizando tampão 5 x (50mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂), dNTP 10 mM, primers 20 µM de cada um, Taq DNA polimerase 1,25 U, com a seguinte programação do termociclador: desnaturação inicial 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Nessa avaliação epidemiológica as provas sorológicas apresentaram uma prevalência menor que a PCR-SN, na IFI foram detectados 55% de animais positivos. A mesma percentagem de animais portadores foi identificado pela PCR-S, enquanto que na ELISA e na PCR-SN foram 65% e 67,5%, respectivamente. Entretanto, as demais provas foram inferiores a esta, concluindo-se, portanto, que a PCR-SN é indicada tanto para estudos epidemiológicos como para diagnóstico etiológico. (Projeto financiado pela Comunidade Européia).