



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE BOVINOS
PORTADORES SADIOS DE *Babesia bigemina*
(SMITH & KILBORNE, 1893) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE - PCR**

FERNANDA FERNANDEZ MUÑOZ

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a Maria Elisabeth Aires Berne, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Área de Concentração: Veterinária Preventiva, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

**PELOTAS
Rio Grande do Sul-Brasil
Fevereiro de 2005**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE BOVINOS
PORTADORES SADIOS DE *Babesia bigemina*
(SMITH & KILBORNE, 1893) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE - PCR**

FERNANDA FERNANDEZ MUÑOZ

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a Maria Elisabeth Aires Berne, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Área de Concentração: Veterinária Preventiva, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

**PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Fevereiro de 2005**

FERNANDA FERNANDEZ MUÑOZ

**IDENTIFICAÇÃO DE BOVINOS
PORTADORES SADIOS DE *Babesia bigemina*
(SMITH & KILBORNE, 1893) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE - PCR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a Maria Elisabeth Aires Berne, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Área de Concentração: Veterinária Preventiva, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

APROVADA EM 03 DE FEVEREIRO DE 2005

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Nunes

Prof. Dr. Carlos James Scaini

Prof^a. Dr^a. Nara Amélia
da Rosa Farias

Prof^a. Dr^a. Maria Elisabeth A. Berne
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mostrar-se presente em todos os momentos da minha vida,

À minha família pelo apoio recebido, em especial ao meu avô que tanto se orgulhou quando resolvi fazer o curso de Mestrado,

Ao Gustavo pela paciência e demonstração de carinho nas infinitas horas de ansiedade e incompreensão,

À minha orientadora e um pouco “mãe” Maria Elisabeth A. Berne pela dedicação, apoio, demonstração de carinho e amor em todas as horas que estivemos juntas,

Às minhas co-orientadoras Magda Vieira Benavides e Ana Maria Sastre Sacco que não pouparam esforços e compreensão para a realização deste trabalho junto com toda a equipe dos laboratórios de Hemoparasitologia e Genética Animal da Embrapa em Bagé,

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos,

Aos professores Nara Farias, Gertrud Muller, Gladis Aver Ribeiro, João Guilherme Brum e Paulo Bretanha pela atenção e amizade em todas as horas,

A todos meus amigos que de certa forma acreditaram nesta conquista, em especial à Rita Krollow, Anelise Araújo, Elizandra Schoenardie, Michele Pepe, Greici Maia, Neila Moraes, Tiago Gallina e Jerônimo Ruas.

Obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS

bp – pares de base

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Etileno diamino tetra ácido

IFN- γ – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

pH – potencial de hidrogênio

rpm – rotações por minuto

TE – Tris EDTA

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Biologia.....	3
2.2 Imunidade.....	4
2.3 Epidemiologia	6
2.4 Diagnóstico.....	7
2.5 Controle	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Local de Execução	13
3.2 Animais Experimentais	13
3.3 Obtenção de animais portadores sadios	14
3.4 Confirmação do estado de portador sadio.....	14
3.5 Procedimentos e técnicas utilizadas no experimento	17
3.5.1 Verificação de temperatura.....	17
3.5.2 Microhematócrito	17
3.5.3 Exame direto – esfregaço sanguíneo	17
3.5.4 Imunofluorescência Indireta.....	18
3.5.5 Extração de DNA	19
3.5.6 Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	20
3.5.7 Visualização da amplificação da PCR – gel de poli-acrilamida.....	21
3.6 Cronograma de colheitas.....	21
4. RESULTADOS	23
4.1 Inoculação	23
4.1.1 Temperatura e volume globular	23
4.1.2 Parasitemia.....	24
4.1.3 Sorologia - Imunofluorescência Indireta	25

4.1.4 Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	25
4.2 Subinoculação.....	26
4.2.1 Temperatura e volume globular.....	26
4.2.2 Parasitemia.....	27
4.2.3 Sorologia - IFI.....	27
4.2.4 Reação em cadeia da polimerase - PCR.....	27
4.2.5 Visualização da amplificação da PCR.....	28
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÕES.....	33
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXO 1.....	44
ANEXO 2.....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Relação dos animais doadores e seus respectivos receptores....15

TABELA 2- Valores modais e percentagens das titulações de anticorpos específicos anti-*Babesia bigemina* nas vacas nos meses pós-inoculação (M.P.I) com cepa atenuada de *Babesia bigemina*.....25

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Cronograma de colheitas no período de pré-inoculação/inoculação/pós-inoculação com cepa atenuada de *Babesia bigemina* nas nove vacas receptoras e pré-subinoculação/subinoculação/pós-subinoculação nos terneiros receptores.....22
- FIGURA 2 - Médias de temperatura (T °C) e volume globular (VG %) das vacas do quinto ao 19º dia pós-inoculação (D.P.I) com cepa atenuada de *Babesia bigemina*.....23
- FIGURA 3 - Percentagem de vacas com parasitemia no período entre o oitavo e o 19º dia pós-inoculação (D.P.I) com cepa atenuada de *Babesia bigemina*.....24
- FIGURA 4 - Valores médios de temperatura e volume globular dos terneiros no período pré e pós-subinoculação.....26
- FIGURA 5 - Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata.....28

RESUMO

MUÑOZ, FERNANDA FERNANDEZ, M.S. Universidade Federal de Pelotas, fevereiro de 2005. **Identificação de bovinos portadores sadios de *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) através da técnica de reação em cadeia da polimerase- PCR.** Professora Orientadora: Maria Elisabeth Aires Berne.

A babesiose bovina é uma doença causada pelos hemoprotozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* transmitidos pelo carrapato *Boophilus microplus*. A enfermidade é responsável por alta morbidade e mortalidade nos rebanhos e conseqüentemente por importantes prejuízos econômicos na pecuária de corte e leite. No presente estudo foi avaliada a técnica de reação em cadeia da polimerase como método de diagnóstico em bovinos portadores sadios de *Babesia bigemina*. O experimento foi realizado na Embrapa Pecuária Sul (Bagé/RS) nos laboratórios de Genética Animal e Hemoparasitologia. Este estudo foi desenvolvido utilizando nove vacas sensíveis, sem contato prévio com hemoparasitas, as quais foram inoculadas com *B. bigemina* e a infecção clínica comprovada pela parasitemia patente. Nove meses após a inoculação, quando os animais já não apresentavam qualquer sinal clínico ou laboratorial de infecção a não ser a presença de anticorpos específicos anti-*B. bigemina*, constatados através da IFI, o estado de portador sadio das nove vacas foi comprovado em 66,6% das mesmas pela técnica de PCR. Como contraprova, foram utilizados nove terneiros sensíveis e esplenectomizados como receptores

das nove vacas no processo de subinoculação, sendo que 44,4% dos terneiros apresentaram sinais clínicos e parasitemia patente, comprovando o estado de portador sadio das vacas. A partir dos resultados foi possível concluir que a técnica de reação em cadeia da polimerase pode ser utilizada como diagnóstico em animais portadores sadios de *B. bigemina*.

ABSTRACT

MUÑOZ, FERNANDA FERNANDEZ, M.S. Universidade Federal de Pelotas, fevereiro de 2005. Identification of bovine healthy carrier of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) through the technique of polimerase chain reaction of the polimerase - PCR. Adviser: Maria Elisabeth Aires Berne.

Bovine babesiose is a disease caused by the hemoprotozoa *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* that is transmitted by the *Boophilus microplus* tick. It is responsible for high morbidity and mortality in bovine herds, causing important economic losses for the beef and dairy industry. In the present study the technique of polymerase chain reaction (PCR) was evaluated as method of diagnosis of bovine healthy carrier of *Babesia bigemina*. The experiment was conducted in the laboratories of Animal Genetics and Hemoparasitology at Embrapa South Livestock (Bagé/RS). Nine sensitive cows, without any previous contact with the hemoparasite, were inoculated with *B. bigemina* and the clinical infection was confirmed by parasitism detected in the blood smear. Nine months after the experimental infection, the animals no longer presented any clinical sign and blood parasitism, the PCR technique was able to demonstrated that 66% of experimental infected cows remains carriers after the inoculation, the infection was also confirmed by the presence of antibodies anti-*B.bigemina* by indirect immunofluorescence technique. In order to confirm the sub-clinical infection nine splenectomized calves was subi inoculated with blood from the

experimentally infected cows, where 44,4% of this calves showed clinical signs and blood parasitism, confirming the healthy carriers status of experimental infected cows. The results of this study suggested that the polymerase chain reaction technique can be used as diagnosis tool to identify healthy carriers of the *B. bigemina*.

1. INTRODUÇÃO

A babesiose bovina, doença que faz parte do complexo Tristeza Parasitária Bovina (TPB), é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (Mc COSKER, 1981). A ocorrência desta hemoparasitose está diretamente relacionada à distribuição do vetor *Boophilus microplus* que encontra condições ideais para desenvolvimento nos países de clima tropical e subtropical, situados entre os paralelos 32°N e 32°S (KUTTLER, 1988), onde se inclui o Brasil.

A babesiose é um dos principais problemas de ordem econômico-sanitária na produção de bovinos, inclusive no Rio Grande do Sul, responsável por altos índices de morbidade e taxas superiores a 50% de mortalidade (WRIGHT, 1991). Causa significativa redução na produção de carne e/ou leite, aborto (CORREA et al., 1978), menor fertilidade dos animais afetados (SWIFT et al., 1979) e altos custos com tratamentos e manejos especiais; além disto, esta enfermidade provoca sérios problemas na comercialização de animais de zonas livres de carrapato para zonas enzoóticas (CALLOW, 1978).

Devido aos grandes prejuízos causados pela babesiose, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para obter melhores estratégias de controle e profilaxia da doença. Como regra geral, medidas de controle eficientes devem basear-se no conhecimento epidemiológico que se fundamenta, principalmente no conhecimento ou identificação de animais

portadores sadios. Estes animais servem de reservatórios ou focos de infecção para os carrapatos vetores, pois abrigam o protozoário intracelular em quantidades muito baixas na circulação sanguínea, sem manifestar sinal clínico, permitindo que os carrapatos se infectem e disseminem o agente no meio ambiente (FIGUEROA et al., 1994).

Nos indivíduos portadores sadios, como a quantidade de hemoparasitos circulantes é baixa, o diagnóstico através do esfregaço sanguíneo não é recomendado, mas sim, através de técnicas que detectam anticorpos anti-*Babesia* como a Imunofluorescência Indireta (IFI) e ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Entretanto, os testes sorológicos apresentam limitações em relação à sensibilidade, especificidade, custo e padronização (WEILAND & REITER, 1988).

Os resultados dos testes sorológicos indicam a presença de imunoglobulinas específicas e indiretamente a presença do agente. Na IFI existe a possibilidade de haver resultados falso positivos, pois a presença de anticorpos pode ser de uma exposição passada ao patógeno ou ainda anticorpos oriundos do colostro ingerido de uma mãe imune e não necessariamente devido à presença do agente naquele momento (MAHONEY, et al., 1979).

O uso de técnicas moleculares como diagnóstico de hemoparasitos teve um rápido desenvolvimento nesta última década, pois permite identificar diretamente o agente, até mesmo em pequenas quantidades circulantes, provando ser mais específico, sensível e decisivo (FIGUEROA et al., 1992).

Dentre estas técnicas moleculares, a técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR tem sido utilizada para demonstrar a presença/ausência de *Babesia* spp. em bovinos portadores sadios (FIGUEROA et al., 1993; CALDER et al., 1996; SALEM et al., 1999; BENAVIDES et al., 2001). Estes autores padronizaram a técnica de PCR para diagnosticar portadores sadios de *B. bovis*.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a técnica de PCR na identificação de bovinos portadores sadios de *Babesia bigemina*, no Sul do Rio Grande do Sul.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia

Atualmente encontram-se descritas mais de 100 espécies de *Babesia* parasitando diferentes espécies animais; no entanto, *B. bigemina* e *B. bovis* são as únicas encontradas infectando bovinos no Brasil, sendo transmitidas exclusivamente pelo carrapato *Boophilus microplus* (VANZINI & RAMIRES, 1995).

As espécies de *Babesia* são heteroxenas, ou seja, necessitam de dois hospedeiros para completar o ciclo biológico, especificamente no caso da *B. bigemina*, o bovino e o carrapato; no bovino, hospedeiro vertebrado, ocorre somente reprodução assexuada dos protozoários e no carrapato, hospedeiro invertebrado, ocorre tanto reprodução assexuada como sexuada (FRIEDHOFF, 1988).

A fêmea do carrapato se infecta com *B. bigemina* no final da fase parasitária no bovino. No intestino do carrapato inicia-se a reprodução sexuada dando origem aos oocinetos que invadem todos os órgãos do carrapato, inclusive ovários, num processo contínuo de divisão assexuada. Através da infecção dos ovários, os oocinetos passam aos ovos e larvas, configurando a transmissão transovariana, de geração a geração. O processo de esporogonia continua nas larvas, invadindo também todos os órgãos, inclusive as células da glândula salivar, onde são produzidos os esporozoítos que serão transmitidos

aos bovinos por ocasião do parasitismo do carrapato. Nos bovinos, os esporozoítos vão diretamente parasitar os eritrócitos, se transformando em merozoítos que por reprodução assexuada formam novos parasitos que invadem novas células e assim sucessivamente (FRIEDHOFF, 1988).

Como conseqüência desta merogonia o hospedeiro bovino poderá ou não apresentar a doença clínica, dependendo de vários fatores entre os quais, a virulência do parasito, a quantidade de inóculo e o nível de resistência do hospedeiro.

A destruição de eritrócitos por *Babesia* spp. continua até que o hospedeiro morra ou, por tratamento ou processo imunológico, elimine ou diminua o parasito, passando a ser um portador sadio (JOYNER & DONNELLY, 1979).

2.2 Imunidade

A resistência dos bovinos à infecção por *Babesia* spp. é determinada pelas características inatas dos animais, como raça, idade e pela resposta imune específica, como a imunidade induzida por uma infecção ativa ou por transferência passiva de elementos protetores imunes (anticorpos), sendo que a imunidade protetora requer componentes da resposta humoral e celular (MADRUGA et. al., 2001).

As diferenças entre raças de bovinos influenciam diretamente na população de carrapatos e conseqüentemente no nível de infecção por *Babesia*. Os animais com origem *Bos indicus* são mais resistentes ao *B. microplus* quando comparados com *Bos taurus* que são mais sensíveis aos carrapatos e aos hemoparasitos (FRANCIS, 1966), bem como ocorrem diferenças dentro da mesma raça, ou seja, variações individuais.

No Rio Grande do Sul, a tradição do uso de raças de origem européia agrava o problema com as hemoparasitoses, já que estas raças são mais sensíveis ao transmissor da babesiose (EVANS et al., 2000).

Em relação ao fator idade, os animais jovens até aproximadamente nove meses de idade, apresentam uma maior resistência à *Babesia* spp. devido aos anticorpos colostrais recebidos da mãe, à presença de resquícios da

hemoglobina fetal, à intensa hematopoiese e a um fator sérico, dialisável, de peso molecular baixo (14 Kda) que inibe a multiplicação do parasito, promovendo sua eventual morte no interior dos eritrócitos (LEVY et al., 1982). Segundo estes autores este fator sérico foi identificado em terneiros com sorologia negativa para *Babesia* spp., em áreas livres de carrapatos, ou seja, independente da presença de anticorpos.

A defesa imune específica é formada a partir de uma infecção ativa ou por transferência passiva de elementos protetores imunes, dependente de componentes da resposta humoral e celular. Os linfócitos T auxiliares ativos induzem os anticorpos protetores a neutralizarem a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos e potencializam a fagocitose dos parasitos na fase extracelular, evidenciando a cooperação entre componentes da imunidade específica e inata (TEIXEIRA et al., 2000).

Os anticorpos colostrais e os outros fatores citados acima protegem o terneiro, porém é necessária a inoculação natural dos hemoprotozoários pelo carrapato, ou artificial através de vacinação ou premunição, para que possam desenvolver a própria resposta imune, a imunidade ativa, a qual os protegerá posteriormente contra novas infecções (HALL, 1963).

Os monócitos, os macrófagos, os neutrófilos e as células "Natural Killers" constituem a primeira linha de defesa celular. As principais funções dessas células são fagocitose, produção de citocinas e a explosão oxidativa, que atuam como fatores de resistência às infecções por diversos parasitos (ALLISON & EUQUI, 1983), incluindo *B. bovis* (JOHNSON et al., 1996; COURT et al., 2001).

Recentemente, foi constatado que os macrófagos ativados induzem a produção de óxido nítrico e atuam inibindo o crescimento de *B. bovis* "in vitro" e expressam elevados níveis de IL-1 β , IL-12 e TNF- α ; estas citocinas inflamatórias estimulam as respostas imune inata e adquirida do hospedeiro contra estes hemoparasitos (SHODA et al., 2000).

Após a superação da infecção primária com ou sem sintomas de babesiose, o bovino estará imunizado contra os hemoparasitos. MAHONEY et al. (1973) afirmaram que após uma infecção aguda os animais inoculados com

Babesia desenvolvem baixas parasitemias, permanecendo como portadores assintomáticos por cerca de até dois anos para *B. bigemina*, estimulando, dessa forma a imunidade do hospedeiro.

Portanto, o controle da infecção por *Babesia* ocorre por interação da imunidade inata, das respostas imune humoral e celular e da imunidade adquirida (MADRUGA et al., 2001).

2.3 Epidemiologia

A transmissão de *Babesia* spp. é influenciada por vários fatores que interferem na epidemiologia destes parasitos, entre eles: clima, raça, idade, manejo, uso de carrapaticidas e presença de agricultura na região. Caso ocorra um desequilíbrio nos componentes do ciclo: parasito, hospedeiro e vetor, o quadro clínico ou subclínico pode se estabelecer nos rebanhos (FRIEDHOFF & SMITH, 1981).

MAHONEY (1975) descreveu três situações epidemiológicas: áreas endêmicas - locais onde as condições climáticas permitem a presença do carrapato durante praticamente todo o ano, sendo a *Babesia* spp. continuamente inoculada nos animais a partir do nascimento quando são mais resistentes, permitindo que estes não adoeçam e desenvolvam uma imunidade específica suficiente, o que os tornará adultos resistentes. Nestas regiões, normalmente não ocorrem casos clínicos de babesiose nos animais nativos; áreas epidêmicas - onde as condições climáticas ou questões de manejo e controle de carrapato não permitem a presença constante deste, não há transmissão contínua dos protozoários aos bovinos, estes podem passar a fase jovem sem serem inoculados, não desenvolvendo imunidade específica adequada e tornando-se adultos sensíveis. Estas regiões são conhecidas como epidêmicas, instáveis ou de instabilidade enzoótica, ou seja, pode ocorrer surto da doença clínica, com grande número de mortes; áreas livres - que não oferecem condições para manutenção da população de carrapatos, devido às condições climáticas adversas, não ocorrendo casos de babesiose, como em regiões do extremo Sul do Brasil e da Argentina, onde ocorre um longo período

de frio responsável pela ausência do carrapato, tornando os animais totalmente desprotegidos, sem anticorpos, por não terem contato com *Babesia* spp.

A babesiose na maioria do território brasileiro caracteriza-se por estabilidade endêmica. Entretanto, esta situação epidemiológica não impede que esta enfermidade cause prejuízos acima de 250 milhões de dólares anuais no Brasil (MADRUGA et al., 2001). No Rio Grande do Sul, a situação predominante é a de instabilidade enzoótica (BRASIL et al., 1982), onde o conhecimento e o controle do estado imunológico dos animais é extremamente importante para que se possa decidir quais os métodos de controle e imunização devem ser utilizados (YOUNG, 1988).

Conforme GUGLIELMONE (1995), dependendo da raça explorada, manejo, níveis de infestações do carrapato *B. microplus*, áreas consideradas estáveis podem tornar-se instáveis e vice-versa. Certas práticas de manejo, como a diminuição das populações de carrapato por excesso de uso de acaricidas, conseqüentemente diminuindo a transmissão de hemoprotozoários, ou até mesmo por falhas no tratamento com o aumento da taxa de infecção do carrapato, podem acarretar surtos de babesiose se os animais não estiverem devidamente protegidos (SOLARI & QUINTANA, 1994).

2.4. Diagnóstico

Para o diagnóstico da infecção por *Babesia* spp. devem ser levados em conta dados epidemiológicos, sinais clínicos, exames laboratoriais e lesões observadas na necropsia.

No caso de animais com sinais clínicos, surtos ou mortes, o mais importante é o diagnóstico clínico, imediato, através da avaliação dos sintomas como febre, anemia, icterícia, anorexia, hemoglobinúria e sintomas nervosos. O diagnóstico pelos sinais clínicos é relativamente simples, porém muitas vezes a doença se apresenta de forma super aguda, onde os sintomas nem sempre são identificados. Além disso, a avaliação dos sinais clínicos de forma isolada não permite um diagnóstico específico, já que os sintomas podem ser comuns a outras enfermidades (MADRUGA et al., 1986).

A infecção pode ser avaliada de forma indireta através da técnica de Imunofluorescência Indireta (GUGLIELMONE et al., 1991), de forma direta através da subinoculação em terneiros esplenectomizados (MAHONEY et al., 1973) e pela técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR (FIGUEROA et al., 1992).

Para um diagnóstico de certeza deve-se fazer uma avaliação dos sinais clínicos e dos resultados dos exames laboratoriais (KESSLER & SCHENK, 1998). O exame laboratorial direto identifica o agente intraeritrocitário, através de esfregaços de sangue periférico dos animais doentes, colhidos da ponta da cauda, orelha e até mesmo da jugular, obtendo um diagnóstico de certeza e específico (BÖSE et al. 1995). Também faz parte do exame laboratorial, estimar a porcentagem de eritrócitos, através da técnica do microhematócrito (KESSLER et al., 1992). O esfregaço sanguíneo ainda é o método de diagnóstico mais apropriado para a detecção de um animal portador de hemoparasitos na fase aguda da doença, porém torna-se inviável em estudos epidemiológicos para a identificação de animais portadores sadios (ALMERIA et al., 2001).

O diagnóstico epidemiológico é de grande valia para verificar a presença e intensidade do agente no meio ambiente, através da identificação de animais portadores sadios, permitindo a programação de medidas profiláticas adequadas (MAHONEY et al. 1973). A identificação dos animais cronicamente infectados, ou seja, sem apresentar sintomatologia clínica, pode ser feita de maneira indireta ou direta.

O imunodiagnóstico através de testes sorológicos é capaz de verificar a presença e intensidade de anticorpos específicos no soro dos animais e serve indiretamente como indicador da presença do agente (MAHONEY, 1962-a). Segundo BÖSE et al. (1995), muitos testes têm sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos para *Babesia* spp.; entretanto, três são rotineiramente mais utilizados: os testes de Imunofluorescência Indireta, ELISA e Fixação de Complemento .

Cada prova sorológica apresenta vantagens e desvantagens, conforme seu nível de sensibilidade, especificidade, simplicidade e custo (WEILAND &

REITER, 1988). As técnicas sorológicas de rotina, particularmente, Imunofluorescência Indireta, oferece alguns inconvenientes como a subjetividade do operador durante a leitura, número limitante de amostras, por ser extenuante ao leitor e nem sempre é muito específica (BÖSE et al., 1995), bem como em algumas situações, os animais podem apresentar resultados positivos sem apresentar a infecção, como no caso de anticorpos colostrais em animais jovens ou quando tenham sido esterilizados por quimioterapia (JOHNSTON et al., 1973; MAHONEY, et al., 1979).

Com os avanços da biologia molecular, as novas técnicas de diagnóstico oferecem algumas vantagens em relação aos testes sorológicos mais utilizados, pois são mais específicos, sensíveis e mais ágeis, permitindo que as medidas de controle sejam adotadas com maior segurança (GASSER, 1999).

O primeiro estudo sobre amplificação de genes ou de fragmentos a partir de pequenas quantidades de DNA, foi realizado por SAIKI et al. (1985). Posteriormente, MULLIS et al., (1986) utilizaram a técnica de reação em cadeia da polimerase para a identificação do gene da beta-globina humana.

Com o avanço das técnicas moleculares, foi possível identificar patógenos de bovinos pela análise direta do seu material genético, já que cada espécie possui seqüências de DNA específicas e isto possibilita evidenciar, através da PCR, por exemplo, o agente através da amplificação destas seqüências (AZAMBUJA et al., 1994).

Testes com *Babesia* spp. utilizando a técnica de PCR, foram desenvolvidos para detecção de DNA de parasitos no sangue de animais portadores sadios. Estes testes foram capazes de revelar parasitemias de 10^{-9} , provando ser 100 vezes mais sensível que a detecção do parasito no exame direto, através da microscopia óptica (FIGUEIROA et al. 1992a).

O diagnóstico de portadores de agentes patogênicos, através da PCR, foi desenvolvido para muitas doenças em bovinos, como a tuberculose, brucelose, leptospirose e leucose (AZAMBUJA et al., 1994). Em humanos esta técnica vem sendo utilizada na identificação de portadores crônicos de diversos agentes patogênicos, como *Trypanosoma cruzi* (CARRIAZO et al., 1998).

Assim como em outras áreas, a PCR na parasitologia veterinária está tendo grande aplicabilidade, permitindo a identificação e sistemática de parasitas, caracterização genética, isolamento, caracterização de genes, detecção de drogas resistentes e também o desenvolvimento de vacinas (GASSER, 1999).

A técnica de PCR permite a confirmação da presença e a discriminação dos parasitos quando em níveis muito baixos no sangue de animais portadores sadios, sendo fundamental para a elaboração de programas de controle da doença (ALMERIA et al., 2001).

AZAMBUJA et al. (1994) afirma que através da PCR, é possível diferenciar *B. bovis* de *B. bigemina* e outros hemoparasitos dos bovinos, devido à alta especificidade da técnica.

Segundo MADRUGA et al. (2002), através da PCR foi possível diferenciar e caracterizar, geneticamente e antigenicamente, os isolados de *B. bigemina*, em cinco regiões fisiográficas diferentes do Brasil, contribuindo para estudos epidemiológicos deste hemoparasito, bem como o desenvolvimento de vacinas de subunidade.

SEQUEIRA et al. (2005) utilizaram a técnica de PCR para estimar a taxa de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* no sangue de bovinos, em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, bem como em ovos deste ácaro.

A alta especificidade e sensibilidade analítica da PCR tornaram esta técnica uma ferramenta valiosa para realizar estudos epidemiológicos em uma determinada região, permitindo traçar medidas de controle eficazes, principalmente em casos de infecções latentes nos bovinos (FIGUEROA et al., 1992).

2.5. Controle

A elaboração de estratégias adequadas de controle depende, principalmente, de informações sobre a epidemiologia da babesiose, especialmente na dinâmica da transmissão pelo carrapato (MORZARIA et al., 1992).

O controle da babesiose é realizado através do tratamento químico específico ou controle através da quimioprofilaxia ou imunoprofilaxia. O tratamento químico é realizado com drogas babesicidas derivadas da diamidina como o diaceturato de diminazina ou com dipropionato de imidocarb.

O controle profilático está baseado em medidas de controle/imunização do rebanho utilizadas para evitar o aparecimento da doença (VANZINI & RAMIREZ, 1995). Estas medidas são as vacinas atenuadas, premunição, quimioprofilaxia e vacinas de sub-unidades/recombinantes, além de técnicas de manejo de animais e de campo que envolvam cuidados com a distribuição do vetor, hospedeiro e com o meio ambiente (FRIEDHOFF & SMITH, 1981), de maneira a assegurar a imunidade e/ou proteção do rebanho (GUGLIELMONE, 1995).

A premunição é um método que foi e ainda é muito utilizado; consiste na inoculação de sangue de bovinos portadores de *Babesia* spp. em animais sensíveis com objetivo de induzir a resposta imune. Existe o risco de inocular outros agentes infecciosos, induzir a auto-imunidade, bem como provocar reações graves nos animais pela virulência da cepa ou número elevado de parasitos inoculados (SILVA & LIMA, 1995).

A quimioprofilaxia é uma maneira de imunizar os animais com a utilização de químicos como, por exemplo, o dipropionato de imidocarb e subsequente exposição dos animais à infestação pelo carrapato de maneira constante. A proteção química dura em torno de 28 dias, sendo necessário garantir uma infestação de carrapatos logo após a utilização da droga para o desenvolvimento da resposta imune (KUTTLER & JOHNSON, 1996).

Nas áreas endêmicas, ou seja, com condições climáticas que permitam o desenvolvimento normal do carrapato durante todo ano, deve-se evitar a superinfestação por carrapatos, através de um manejo eficaz, como por exemplo, a aplicação de banhos estratégicos (MAHONEY, 1962-b). Em regiões estáveis, é importante que os terneiros (naturalmente mais resistentes aos hemoparasitos) sejam expostos à infestação pelo carrapato para que se tornem adultos imunes, constituindo uma medida profilática natural (MAHONEY & ROSS, 1972). Anualmente a imunidade deve ser reforçada através de

infestações leves dos bovinos com o vetor para propiciar uma situação de estabilidade com risco mínimo (VANZINI & RAMIREZ, 1995).

Em áreas de instabilidade enzoótica o controle é mais difícil, uma vez que as condições climáticas oferecem simultaneamente, condições favoráveis e desfavoráveis de sobrevivência tanto para os agentes como para os vetores, consideradas áreas marginais (MAHONEY & ROSS, 1972). Nestas regiões, por serem instáveis, podem ocorrer estímulos de infecções inconstantes, insuficientes para produzir imunidade no rebanho, o que traz grandes possibilidades de surtos (SOLARI & QUINTANA, 1994). Conforme YOUNG (1988), nas regiões instáveis o conhecimento do estado imunológico do rebanho é importante para poder decidir pela utilização, ou não, de métodos de controle e imunização.

Nas áreas livres deve-se evitar a entrada de agentes e vetores, os quais podem provocar surtos, bem como os animais destas áreas, devem ser protegidos antes de serem transportados para regiões endêmicas (VANZINI & RAMIREZ, 1995).

3.MATERIAL E MÉTODOS

Esta dissertação de Mestrado foi realizada a partir do projeto de pesquisa 06.1999.724 – “Avaliação imunológica, em relação aos agentes da TPB, em animais submetidos a diferentes métodos de controle do *Boophilus microplus*”, de responsabilidade de Ana Maria Sastre Sacco, sub projeto 06.1999.724.02 – “Identificação de bovinos portadores sadios de *Babesia* spp. através da técnica de PCR”, de responsabilidade de Magda Vieira Benavides. Este projeto foi cadastrado e financiado pela Embrapa em 1999 e também recebeu financiamento da FAPERGS.

3.1 Local de Execução

O experimento foi realizado nos campos experimentais e laboratórios de Hemoparasitologia e Genética Animal da Embrapa Pecuária Sul (CPPSul) - Bagé, RS (54°23'W e 30°47'S) no período de 2002 a 2003.

3.2 Animais Experimentais

Foram utilizadas nove vacas da raça Hereford com quatro anos de idade, sensíveis, sorologicamente negativas para *B. bigemina* e *B. bovis*, as quais formaram o grupo portador sadio/doador e nove terneiros da raça Holandesa com um ano e meio de idade, sensíveis, sorologicamente negativos

para *B. bigemina* e *B. bovis*, esplenectomizados, os quais formaram o grupo receptor. Durante toda fase experimental os animais foram mantidos em poteiros livres de carrapatos, sob condições iguais de clima, pastejo e manejo geral e como medida profilática foram banhados quinzenalmente em banho de imersão com carrapaticida a base de amitraz¹.

Os grupos de animais foram assim divididos:

- nove vacas de campo, portadoras sadias para *B. bigemina*;
- nove terneiros receptores, sensíveis, esplenectomizados, com aproximadamente um ano e meio de idade;

3.3. Obtenção de animais portadores sadios

Para obtenção de animais portadores sadios, nove vacas comprovadamente negativas (grupo portador sadio/doador) foram inoculadas com 1,6 ml de sangue, via subcutânea contendo 1×10^7 eritrócitos parasitados com cepa atenuada de *B. bigemina*. O inóculo foi fornecido pelo Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (CNPGC-Campo Grande/MS) da Embrapa.

3.4 Confirmação do estado de portador sadio

A confirmação do estado de portador sadio foi feita através da subinoculação (via endovenosa) de 500ml sangue de cada vaca do grupo portador sadio/doador em cada terneiro sensível do grupo receptor (Tabela 1), nove meses após a inoculação.

¹ Tac Plus® Allvet Química Industrial LTDA

TABELA 1 – Relação dos animais doadores e seus respectivos receptores

VACAS DOADORAS	TERNEIROS RECEPTORES
212	351
213	368
229	350
250	349
257	348
265	369
283	359
309	353
333	360

3.5 Procedimentos e técnicas utilizadas no experimento

3.5.1 Verificação de temperatura

A verificação da temperatura retal nas vacas iniciou cinco dias após a inoculação e continuou até a subinoculação nos terneiros, em dias alternados.

Nos terneiros a temperatura retal foi aferida a partir do quarto dia pós-subinoculação até 22 dias após, sendo verificada em dias alternados como o demonstrado na Figura 1.

O procedimento de verificação da temperatura retal nos animais experimentais foi realizado sempre pelo turno da manhã.

3.5.2. Microhematócrito

A verificação do volume globular dos animais foi feita através da técnica de microhematócrito, as colheitas de sangue foram realizadas no período da manhã.

O acompanhamento dos resultados de volume globular nas vacas iniciou após cinco dias da inoculação, continuando alternadamente até o dia da subinoculação nos terneiros, nos quais os valores de volume globular foram avaliados do quarto ao 22º dia pós-subinoculação, também em dias alternados (Figura 1).

3.5.3. Exame direto – esfregaço sanguíneo

A estimativa da parasitemia dos animais experimentais foi feita pelo exame direto do agente no sangue dos mesmos. O sangue foi colhido diretamente da ponta da cauda. Os esfregaços sanguíneos foram fixados em álcool metílico durante cinco minutos e corados por 45 minutos em Giemsa-May-Grünwald. Foi realizado o exame microscópico em 100 campos do esfregaço com objetiva de imersão (aumento de 1000x). Os procedimentos de colheita de sangue foram feitos sempre pela manhã.

Foi feito acompanhamento das vacas inoculadas quanto à presença de parasitos circulantes através do esfregaço sanguíneo a partir do quinto dia pós-

inoculação até o dia da subinoculação, com colheitas de sangue em dias alternados.

No quarto dia após a subinoculação iniciou-se o processo de acompanhamento da reação ao inóculo, a partir dos resultados de parasitemia dos terneiros. O esfregaço sanguíneo foi realizado em dias alternados até 22 dias após a subinoculação (Figura 1).

3.5.4 Imunofluorescência Indireta

O sangue para obtenção de soro dos animais experimentais foi colhido através de punção da veia jugular, em tubos a vácuo de 10ml sem anticoagulante. Após a formação do coágulo, o material foi centrifugado, o soro foi colhido, separado em alíquotas devidamente identificadas e armazenado a -20°C até a realização da técnica de Imunofluorescência Indireta para a detecção de anticorpos específicos.

A detecção de anticorpos específicos anti-*B. bigemina* no soro das vacas e dos terneiros foi feita através da técnica de Imunofluorescência Indireta, realizada conforme MADRUGA et al. (2001). As lâminas com antígeno, retiradas do freezer no momento do uso e levadas para estufa a 37°C por 10 minutos, foram marcadas com círculos feitos com esmalte onde foram adicionadas as diferentes diluições dos soros. A seguir, as lâminas foram incubadas a 37°C em câmara úmida por 30 minutos. Logo após, procederam-se três lavagens sob fraca agitação com PBS- "Phosphate Buffer Solution" pH 7,2 por 10 minutos cada, para retirar o excedente de soro e secas com o auxílio de ventilador. Em cada círculo foi adicionado o conjugado (anti-IgG bovina conjugada com isotiocianato de fluoresceína²) na diluição de 1:320 em PBS. As lâminas foram incubadas mais uma vez nas mesmas condições e lavadas por duas vezes em PBS, por um período de 10 minutos cada e uma vez em tampão fosfato, logo em seguida foram secas como descrito anteriormente.

Para controle da reação, em cada lâmina de antígeno foram utilizados dois soros padrão positivo e um negativo, além de um círculo somente com

² Sigma Chemical Company®

PBS para controle de especificidade da prova. Os soros foram diluídos em PBS, em diluições seriadas a partir de 1:80. A visualização das reações foi realizada em microscópio com fonte de luz ultravioleta, através de objetiva de 25x.

Para a análise sorológica das vacas foi realizada uma colheita de sangue para obtenção do soro 15 dias antes da inoculação nas mesmas e mensalmente a partir de 45 dias da inoculação até o dia da subinoculação.

As colheitas de sangue para sorologia dos terneiros foram realizadas no dia da subinoculação e 13 dias após.

3.5.5 Extração de DNA

A extração de DNA dos parasitos foi efetuada conforme metodologia descrita por FIGUEROA et al. (1992). Foi realizada apenas uma colheita de sangue das nove vacas no dia da subinoculação nos terneiros, colhido diretamente da jugular em dois tubos de 5ml com EDTA para a extração de DNA. As amostras de sangue foram centrifugadas por 10min. a 3500rpm., o plasma e a camada de leucócitos foram desprezados, ficando apenas a papa de hemácias. Foram transferidos 600µl da papa de hemácias para um tubo de 1,5ml e igual volume de solução hipotônica (68mM KCL); os tubos foram invertidos e agitados no “vortex”. A amostra foi centrifugada por 11min. a 10000rpm, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em um ml de PBS (mantido a 4°C); os tubos foram invertidos e passados no “vortex” novamente. As etapas de lavagem com PBS foram realizadas três vezes e após a última centrifugação o sedimento foi ressuscitado em 500µl de tampão de digestão e os tubos foram incubados a 50°C por 18 horas.

Após incubação foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e novamente centrifugados por 10min. a 10000rpm e o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5ml. Foram adicionados meio volume de 7,5M de acetato de amônio e dois volumes de etanol 100% (mantido em -20°C). Os tubos foram invertidos, as amostras centrifugadas novamente e

precipitado lavado com 1ml de etanol 70%. Os sedimentos de DNA foram secos em temperatura ambiente com ar forçado dentro da capela, ressuspensos em 25µl de tampão TE pH 8.0 e mantidos no freezer. Os DNAs genômicos foram conferidos em gel de agarose a 1%, carregados com bromofenol azul. A quantidade de DNA de cada amostra para conferência foi de 2µl. A eletroforese foi realizada utilizando voltagem de 100V, corrente de 100mA e potência de 10W por 20min.

3.5.6 Reação em cadeia da polimerase – PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando concentrações de 2,5U de Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase³; 1,5mM MgCl₂; 1X de tampão de PCR; 200µM de dNTPs (dideoxynucleotídeos); DNA genômico com concentração aproximada de 20ng; 0,32µM de “primer forward” e 0,32µM de “primer reverse” de seqüências específicas para *Babesia bigemina* e água estéril para um volume final de 25µl de reação. O teste de especificidade dos “primers” foi realizado através do uso de DNA de *Babesia bovis* e DNA bovino em uma reação com os primers sintetizados⁴ para este estudo e então o resultado da PCR foi negativo.

A seqüência do “primer forward” – 5' CAT CTA ATT TCT CTC CAT ACC CCT CC 3' foi descrita por FIGUEROA et al., (1992) e o “primer reverse” – 3' AAA TTC CTC GGC TTC AAC TCT GAG 5' foi desenhado a partir da seqüência descrita no acesso S45366 do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank). Após a mistura dos componentes da reação de PCR, os tubos foram alocados em um Termociclador MJ Research®.

As condições de PCR foram: 1º ciclo de 95°C por 2 min, 57°C por 1 min, 73°C por 1 min e 30 seg. seguido de 40 ciclos compostos de 95°C por 1 min, 57°C por 1 min, 73°C por 1 min e 30 seg e a extensão final a 73°C por 15 min.

A “Taq” DNA polimerase foi adicionada após os 2 min de desnaturação do 1º ciclo. Cada bateria de reações possuiu um controle positivo com DNA

³ Cenbiot – Centro de Biotecnologia/UFRGS

⁴ Biogen Distribuidora

genômico oriundo de sangue parasitado com *B. bigemina* e controle negativo utilizando DNA de amostra de sangue dos terneiros no dia da subinoculação.

O produto das reações de PCR foi carregado em gel de poliacrilamida 10%. O marcador de peso molecular utilizado foi o 100bp DNA "ladder"⁵ e o tamanho de fragmento amplificado foi de 288 pares de base.

As condições de eletroforese foram de uma voltagem de 500V, corrente de 50mA, potência de 30W, em um tempo de 1h e 50min.

Como controle positivo das reações de PCR foi utilizado o sangue colhido de um terneiro (nº 348) quando este apresentou a maior percentagem de parasitemia e como controle negativo das reações de PCR foram utilizados os terneiros receptores antes de terem sido subinoculados.

Para a realização das reações de PCR nas vacas foi realizada uma colheita de sangue no dia da subinoculação nos terneiros.

Nos terneiros as reações de PCR foram realizadas com 10 ml de sangue colhidos da jugular no dia da subinoculação até 22 dias após, em dias alternados.

3.5.7 Visualização da amplificação da PCR – gel de poliacrilamida

A visualização das bandas foi realizada através de um gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata.

3.6 Cronograma de colheitas

O cronograma das colheitas realizadas nos animais experimentais está apresentado na Figura1.

⁵ PBL Productos Biologicos/ Universidad Nacional de Quilmes

		Pré- Inoculação	Inoculação	Dias pós-inoculação (5;8;11;12;14;19;47;74; 88;102;117;133;146;159; 175;189; 207; 224; 235)	1,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 M.P.I	Dias pré- subinoculação (3;6;8)	Subinoculação	4; 6; 7; 8; 9;10;11; 12;14,18 D.P.S	13 D.P.S	20 e 22 D.P.S
VACAS	Tº			X			X			
	VG			X			X			
	P			X			X			
	IFI	X			X		X			
	PCR						X			
TERNEIROS	Tº					X	X	X	X	X
	VG					X	X	X	X	X
	P					X	X	X	X	X
	IFI						X		X	
	PCR						X	X	X	

VG – volume globular

Tº - temperatura

P – parasitemia

M.P.I – meses pós-inoculação

D.P.S – dias pós-subinoculação

FIGURA 1 - Cronograma de colheitas no período de pré-inoculação/inoculação/pós-inoculação com cepa atenuada de *Babesia bigemina* nas nove vacas receptoras e pré-subinoculação/subinoculação/pós-subinoculação nos terneiros receptores.

4.RESULTADOS

4.1 Inoculação

4.1.1 Temperatura e volume globular

Os valores mais elevados de temperatura nas vacas inoculadas ocorreram do oitavo ao 11º dia pós-inoculação, coincidindo com os valores de parasitemia máxima. As percentagens de volume globular mostraram um decréscimo do quinto ao 11º dia pós inoculação, porém mantiveram-se dentro dos valores fisiológicos (26 a 46%) até o final do experimento (Figura 2).

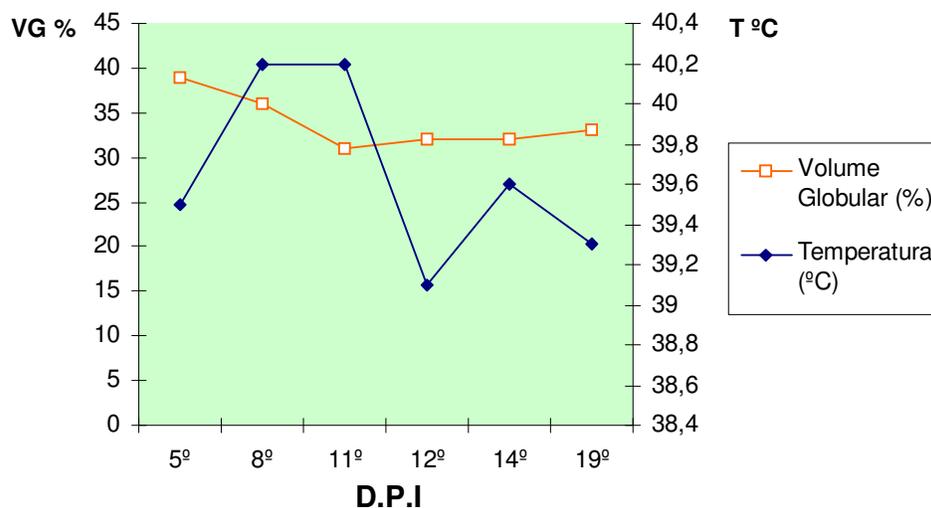


FIGURA 2 – Médias de temperatura (T °C) e volume globular (VG %) das vacas do quinto ao 19º dia pós-inoculação (D.P.I) com cepa atenuada de *Babesia bigemina*.

4.1.2 Parasitemia

As nove vacas inoculadas com cepa atenuada de *B. bigemina* apresentaram parasitemia patente no 8º dia pós-inoculação (DPI) comprovando a infecção. A infecção manteve-se patente do 8º ao 19º dia (Figura 3) quando então as vacas passaram a apresentar leitura de esfregaço sangüíneo negativa nas colheitas mensais de acompanhamento, até o final do experimento – nove meses após.

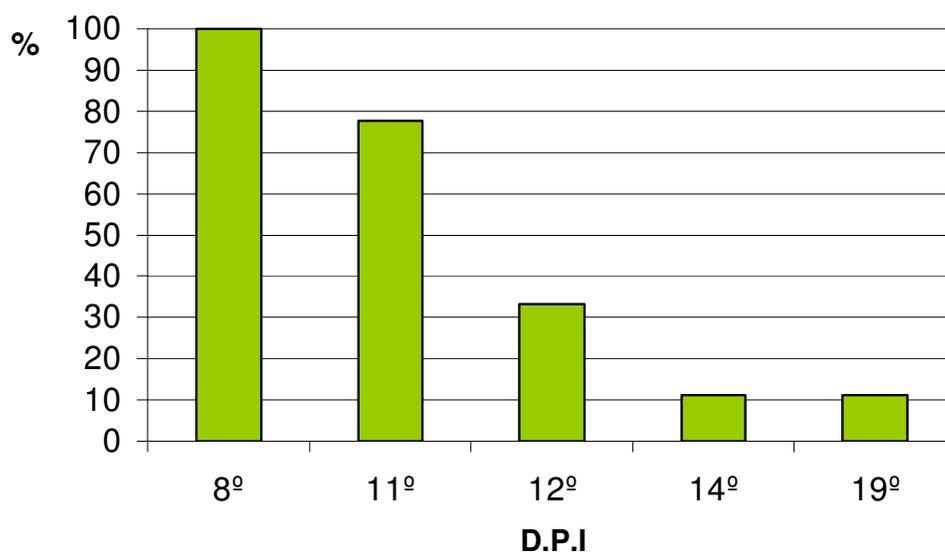


FIGURA 3 -Percentagem de vacas com parasitemia detectável em esfregaço sangüíneo no período entre o oitavo e o 19º dia pós-inoculação (D.P.I.) com cepa atenuada de *Babesia bigemina*.

4.1.3 Sorologia - Imunofluorescência Indireta

A análise do soro obtido da colheita de sangue das vacas quinze dias antes da inoculação demonstrou resultado positivo em uma vaca, a qual apresentou anticorpos específicos anti-*B. bigemina* na titulação de 1:80. Após 45 dias da inoculação, 66,6% das vacas apresentaram títulos de 1:640, e as demais apresentaram títulos que variaram entre 1:160 a 1:2560. A seguir foi observado um decréscimo gradativo dos títulos de todas as vacas até o dia da subinoculação, quando quatro vacas (44,4%) apresentaram títulos de 1:160 e as demais apresentaram títulos que variaram entre 1:80 a 1:640. A moda da titulação de anticorpos específicos e a prevalência de vacas positivas a partir da inoculação estão apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 – Valores modais e percentagens das titulações de anticorpos específicos anti-*Babesia bigemina* nas vacas nos meses pós-inoculação (M.P.I) com cepa atenuada de *Babesia bigemina*.

M.P.I	MODA	%Tit ≥1:80	n
1,5	640	100	9
3	640	100	9
4	640	100	9
5	640	100	9
6	160	100	9
7	160	100	9
8	160	100	9
9	160	100	9

n – número de vacas

4.1.4 Reação em cadeia da polimerase – PCR

As nove vacas pré-inoculadas com cepa atenuada de *B. bigemina* foram avaliadas quanto à presença deste hemoparasito no dia da subinoculação

através da técnica de PCR. Das nove vacas doadoras, seis (66,6%) apresentaram reações de PCR positivas neste dia e as demais não reagiram a PCR.

4.2 Subinoculação

4.2.1 Temperatura e volume globular

Os terneiros receptores apresentaram aumento de temperatura retal no sétimo dia após a subinoculação, atingindo valores entre 38,4°C e 39,8°C durante todo o período de observação (Figura 4).

A partir do sexto dia pós-subinoculação (D.P.S) houve um decréscimo médio de 29% para 25% nos valores de volume globular dos terneiros, os quais mantiveram-se até o 10º D.P.S, após este período houve um aumento médio diário, atingindo média de 29% no 22º dia (Figura 4).

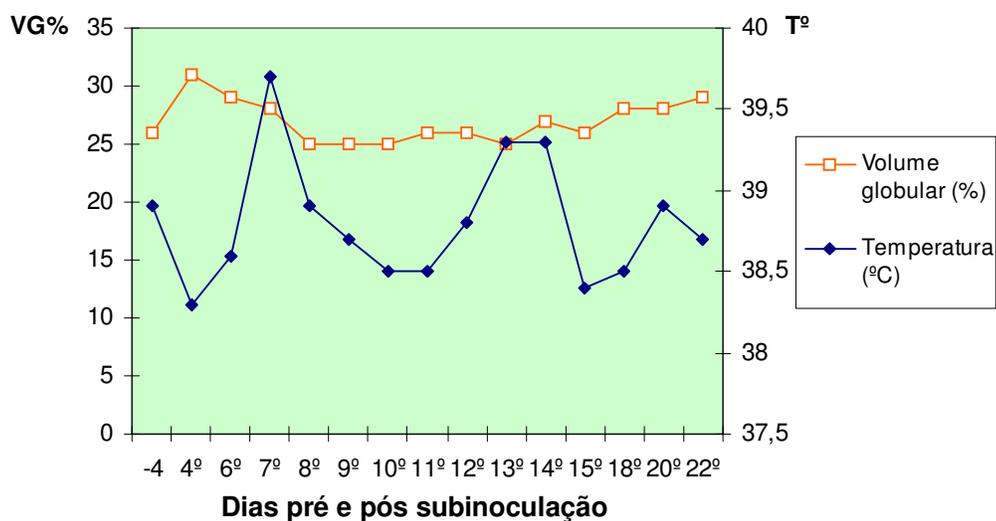


FIGURA 4 – Valores médios de temperatura e volume globular dos terneiros no período pré e pós-subinoculação.

4.2.2 Parasitemia

Os terneiros de número 348, 350, 360, apresentaram parasitemias de 0,4%, 0,1% e 0,1%, respectivamente a partir do sexto dia pós-subinoculação. No sétimo dia estes animais apresentaram um aumento da parasitemia, chegando a 7,8%, 1,88% e 1,1%, respectivamente, havendo necessidade de tratamento específico para babesiose.

O terneiro de número 349 reagiu no 10^o dia pós-subinoculação com parasitemia de 0,008%, alcançando parasitemia de 1,1% no 12^o dia quando foi tratado. Nos cinco terneiros restantes (55,5%) não foi detectada parasitemia patente através do exame de esfregaço sanguíneo durante todo o período de observação. Um destes cinco terneiros foi tratado erroneamente sete dias após a subinoculação. Do 13^o ao 22^o dia todos os terneiros receptores foram negativos ao exame direto através do esfregaço sanguíneo.

4.2.3 Sorologia - IFI

A análise do soro obtido da colheita pré-subinoculação demonstrou resultado positivo em dois terneiros (22,2%) que apresentaram anticorpos específicos anti-*B. bigemina*, com títulos de 1:80. Após 13 dias da subinoculação, cinco terneiros (55,6%) apresentaram títulos entre 1:80 e 1:640.

4.2.4 Reação em cadeia da polimerase - PCR

Os nove terneiros receptores (100%) comprovaram a ausência de parasitos a partir das amostras de sangue coletadas, através da técnica de PCR no dia da subinoculação.

Dos nove terneiros, três foram subinoculados com sangue de três vacas com resultados negativos nas reações de PCR no dia da subinoculação, porém nestes terneiros as reações de PCR foram positivas entre o quarto e o sexto dia pós-subinoculação.

Oito (88,9%) dos terneiros estavam positivos na PCR no quarto dia pós-subinoculação e no sexto dia o terneiro restante também apresentou PCR

positiva. Ainda no sexto dia, um dos terneiros positivos (nº 348) na PCR no quarto dia apresentou parasitemia de 0,4% e PCR negativa.

4.2.5 Visualização da amplificação da PCR

As amplificações dos DNA de animais portadores sadios de *B. bigemina* resultaram em uma banda de aproximadamente 288 pares de base no gel de poli-acrilamida 10% corado com nitrato de prata (Figura 5).

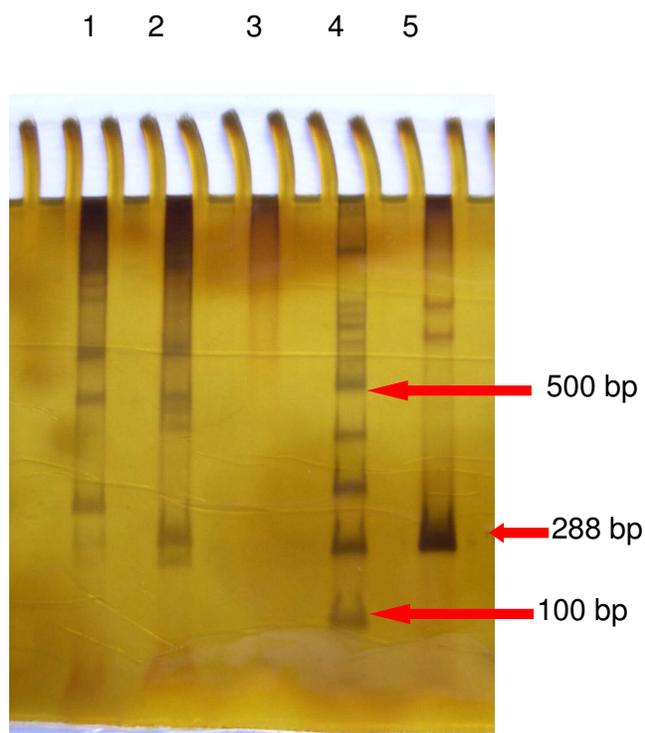


FIGURA 5 - Gel de poli-acrilamida 10% corado com nitrato de prata.

Raia 1: vaca nº 250 portadora no dia da subinoculação nos terneiros;

Raia 2: vaca nº 213 portadora no dia da subinoculação nos terneiros;

Raia 3: controle negativo – terneiro nº348 no dia da subinoculação;

Raia 4: marcador de peso molecular 100bp ladder;

Raia 5: controle positivo – animal parasitado com *Babesia bigemina*.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a técnica de reação em cadeia da polimerase como diagnóstico de portador sadio em nove vacas após nove meses da inoculação com *B. bigemina*. Esta técnica também foi avaliada por FIGUEROA et al. (1992); FIGUEROA et al. (1994) quando demonstraram a sensibilidade e especificidade desta técnica, sendo capaz de detectar a presença de *Babesia* spp. em infecções latentes.

A disponibilidade de um método de diagnóstico prático e eficaz para detecção de animais portadores sadios com boa sensibilidade e, principalmente, especificidade auxiliaria no estudo de medidas de controle a partir do conhecimento epidemiológico de rebanhos em áreas enzoóticas, como é o caso de grande parte do Brasil. MADRUGA et al. (2002) com a intenção de conhecer geneticamente os isolados de *B. bigemina* em cinco regiões do Brasil, realizaram um estudo em que utilizaram a técnica de PCR para a análise genética destas cepas, a qual demonstrou ser uma técnica sensível e específica, diferenciando e caracterizando cada isolado nas diferentes regiões.

No período pós-inoculação com *B. bigemina* nas vacas, os parâmetros de temperatura e volume globular não apresentaram alterações consideráveis. Os períodos de maior temperatura coincidiram com os dias de maior parasitemia, o que também foi observado por SACCO (1996) em estudos realizados com bovinos infectados com esta mesma cepa.

Em relação à parasitemia das vacas, o período pré-patente foi do oitavo ao 19º dia após a inoculação, verificado através de esfregaços sanguíneos. Os valores variaram de apenas presença até 0,64% de hemácias parasitadas. Em estudos feitos por GUGLIELMONE et al. (1989) também foram descritos períodos pré-patentes em torno do oitavo dia pós-inoculação com *B. bigemina*.

Durante a fase de reação à infecção nas vacas não houve necessidade de tratamento, o que também foi descrito por AGUIRRE et al. (1991) e SOLARI et al. (1992), quando todos os animais infectados com *Babesia* spp. apresentaram recuperação plena de todos os parâmetros analisados sem necessidade de tratamento.

A detecção dos primeiros anticorpos específicos, através da Imunofluorescência Indireta ocorreu após 45 dias da inoculação nas vacas, quando 100% apresentaram soroconversão na IFI, os títulos variaram de 1:80 a 1:2560 em um período de nove meses de observação. A soroconversão é um indicador confiável que os animais foram infectados, como afirma JOHNSTON et al. (1973).

A sorologia também foi importante para confirmar a ausência de anticorpos específicos nas vacas que iriam ser inoculadas, para isso foi realizada uma colheita de sangue das mesmas antes da inoculação e os resultados mostraram que uma vaca apresentou presença de anticorpos específicos de *B. bigemina* com titulação de 1:80. Este resultado é discutível, pois estas vacas eram consideradas sensíveis e foram sempre mantidas em áreas livres de carrapatos, sendo possível que tenha ocorrido uma reação inespecífica ou subjetividade do operador.

Em relação aos resultados da PCR e subinoculação nos animais experimentais foi possível evidenciar respostas diferentes, com isso pode-se discutir os resultados separadamente.

Em um total de nove vacas inoculadas, 66,7% apresentaram reações de PCR positivas a partir de uma colheita de sangue de 10ml no dia da subinoculação nos terneiros (nove meses após), o que também foi verificado em estudos feitos por, quando trabalhavam com *B. bovis* e identificaram 16 bovinos portadores sadios através da técnica de PCR em um total de 20 animais no período de 11 meses. FIGUEROA et al. (1992) verificaram reações

positivas nas reações de PCR em 100% dos terneiros cronicamente infectados com *B. bigemina* após 11 meses, concordando com ALMERIA et al. (2001), os quais comprovaram a sensibilidade e eficácia da técnica de PCR em estudos feitos com bovinos portadores sadios de *Babesia* spp.

As três vacas restantes deste experimento apresentaram resultados negativos nas reações de PCR, este fato pode ser explicado pela ausência de hemácias parasitadas no volume de sangue coletado (10ml), confirmando a afirmação feita por FAHRIMAL et al. (1992) que sugerem a realização de duas reações de PCR a partir de uma amostra de sangue ou coletar sangue em dias diferentes do mesmo animal.

Ainda que avaliar os resultados da subinoculação não tenha sido o objetivo deste trabalho, o processo de subinoculação foi realizado como contraprova da técnica de PCR. Os resultados da subinoculação comprovaram o estado de portador sadio em 50% das vacas a partir dos resultados de temperatura, volume globular e principalmente parasitemia verificada do sexto ao décimo dia pós-subinoculação nos terneiros.

No período de reação ao hemoparasito *B. bigemina*, detectado pelos resultados de parasitemia, foi necessário fazer o tratamento em todos os terneiros que reagiram, ao contrário de PAYNE et al. (1990), em que o tratamento específico foi necessário em apenas 18% dos animais no período de reação as babesias. Isto pode ser explicado pelo fato dos terneiros utilizados no presente estudo serem esplenectomizados, conseqüentemente mais sensíveis.

A administração errônea de tratamento em um dos terneiros receptores, sete dias após a subinoculação, impediu o pleno desenvolvimento da infecção a partir do tratamento, impossibilitando a avaliação do estado de portador sadio da vaca doadora para este terneiro.

As reações de PCR nos terneiros não estavam sendo avaliadas, mas os resultados positivos serviram para confirmar a presença de infecção nos receptores que não reagiram (ausência de parasitemia) durante todo o período de observação. Oito terneiros apresentaram resultados positivos na PCR no quarto dia pós-subinoculação e um foi positivo no sexto dia; os resultados negativos nas reações de PCR dos terneiros sugerem que nas amostras de

sangue coletadas a quantidade de DNA de parasitos era insuficiente para ser amplificada.

Se os resultados de PCR e subinoculação fossem comparados poderia ser verificado que tanto uma técnica quanto a outra detectam animais portadores sadios, porém a subinoculação é mais onerosa, demorada e não poderia ser utilizada como método de diagnóstico de animais portadores sadios em um rebanho. ALMERIA et al. (2001) descrevem a subinoculação como um método inviável para estudos epidemiológicos com intenção de identificar animais portadores sadios. Já a PCR é mais sensível e mais rápida e não necessita gastos com animais esplenectomizados, medicamentos, logo seria de grande valia para detectar portadores sadios em rebanhos ou em levantamentos epidemiológicos, os quais permitiriam estudos de medidas de controle mais eficazes (FIGUEIROA et al., 1994).

Estes resultados sugerem que a técnica de PCR tem grande aplicabilidade no diagnóstico de portadores sadios, porém deve-se avaliar os resultados falso negativos que provavelmente, estão relacionados com problemas de amostragem como: volume de sangue coletado, número de reações de PCR realizadas com a mesma amostra de sangue, intervalo de tempo entre coletas de sangue para as reações.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que:

- É possível detectar animal portador sadio de *Babesia bigemina* através da técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR.
- É preciso levar em conta que no diagnóstico de portadores sadios através da PCR podem ocorrer resultados falso negativos, quando na amostra de sangue coletada não houver quantidade suficiente de DNA do parasito *Babesia bigemina* para ser amplificado.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A técnica de PCR, por sua sensibilidade e especificidade tem um grande potencial de utilização no diagnóstico das condições epidemiológicas de rebanhos, podendo ser empregada na otimização de programas estratégicos de controle da babesiose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, D.H.; MANGOLD, A.J.; RIOS, L.G. de; GUGLIELMONE, A.A. Respuesta clínica y evolución del peso corporal en terneros (*Bos taurus*) vacunadas simultáneamente contra babesiosis y anaplasmosis con inmunógenos vivos. **Revista de Medicina Veterinária**, v.8, n.2, p.95-101, 1991.

ALLISON, A. C.; EUQUI, E. M. The role of cell-mediated immune responses in resistance to malaria with special reference to oxidant stress. **Annual Review of Immunology**, London, v.1, p. 361-392, 1983.

ALMERIA, S.; CASTELLÀ, J.; FERRER, D.; ORTUÑO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUTIÉRREZ, J.F. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR - based and light microscopy detection. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.249-259, 2001.

AZAMBUJA, C. J.; GAYO, V.; SOLARI, M.; SUAREZ, M.; STOLL, M. Biotechnology applied to the detection of infectious agents in cattle. Diagnosis of *Babesia bovis* by PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.3, n.1, p.1-4. 1994.

BENAVIDES, M.V.; SACCO, A.M.S.; WEIMER, T.A.; VALENTE, P.D.; FRANK, B.M. **Identificação de bovinos portadores sadios de *Babesia* spp através da técnica de PCR**. Documentos, Embrapa-CPPSul, n.30, 22p.,2001.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEHOFF, K.T.; De VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.61-74, 1995.

BRASIL, A.G.; MONMANY, L.F.; SÁ, M.L.G.; SÁ, N.F. Premunição contra a tristeza parasitária em bovinos a campo. **A Hora Veterinária**, ano 2, n.10, p. 4-8, 1982.

CALDER, J. A. ; REDDY, G. R.; CHIEVES, L.; COURTNEY, C. H.; LITTELL, R.; LIVENGOOD, J. R.; NORVAL, R. A.; SMITH, C.; DAME, J. B. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR- based tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 11, p. 2748-2755, 1996.

CALLOW, L.L. Ticks and tick-borne diseases as a barrier to the introduction of exotic cattle to the tropics. **World Animal Review**, v. 28, p. 20-25, 1978.

CARRIAZO, C.S.; SEMBAJ, A.; AGUERRI, A.M.; REQUENA, J.M.; ALONSO. C.; BUÁ, J.; RUIZ, A.; SEGURA, E.; BARRAL, J.M. Polymerase Chain Reaction Procedure to Detect *Trypanosoma cruzi* in Blood Samples from Chronic Chagasic Patients. **Diagnostic Microbiology Infections Disease**, v.30, p. 183-186, 1998.

CORREA, W.M.; CORREA, C.N.M; GOTTSCHALK, A.F. Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Gardenvale, v.42, n.2, p.227-228, 1978.

COURT, R. A.; JACKSON, L. A.; LEE, R.P. Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 19, p. 29-30, 2001.

EVANS, D.E.; MARTINS, J.R.; GUGLIELMONE, A.A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.4, p.453-470, 2000.

FAHRIMAL, Y.; GOFF, W.L.; JASMER, D.P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasites DNA. **Journal Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1374-1379, 1992.

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; BUENING, G.M. Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.10, p. 2576-2582, 1992.

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. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 69-81, 1993.

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; GOOF, W.L.; BUENING, G.M. Polymerase chain reaction-based diagnostic assay to detect cattle chronically infected with *Babesia bovis*. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v.36, n.1, p.47-55,1994.

FRANCIS, J. Resistance of zebu and other cattle to tick infestation and babesiosis with special reference to Australia: an historical review. **British Veterinary Journal**, London, v. 7, p.301-307, 1966.

FRIEDHOFF, K.T.; SMITH, R.D. Transmission of *Babesia* by ticks. In: RISTIC, M., KREIER, J.P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, p. 267-321, 1981

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc., 1988. Cap. 2, p. 23-52.

GASSER, R. B. PCR - based technology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 229-258, 1999.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v.57, p. 109-119, 1995.

GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; AGUIRRE, D.H.; GAIDO, A.B. Vacunas congeladas contra la babesiosis y la anaplasmosis de los bovinos: viabilidad luego de la descongelación. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias**, v. 22, n.3, p. 233-240, 1991.

GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; AGUIRRE, D.H.; RIOS, L.G. de; OLSEN, A.A. de. Vacunación simultânea com *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* atenuadas, congeladas em nitrógeno líquido com DMSO o glicerol como crioprotectores. **Revista de Medicina Veterinária**, v.70, n.4, p.176-182, 1989.

HALL, W.T.K. The immunity of calves to tick-transmitted *Babesia argentina* infection. **Australian Veterinary Journal**, v.39, p.386-389, 1963.

JOHNSON, W. C.; CLUFF, C.W.; GOFF, W. L.; WYATT, C. R. Reactive oxygen and nitrogen intermediates and products from polyamine degradation are babesicidal in vitro. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 791, p. 136-147, 1996.

JOHNSTON, L.A.Y.; PEARSON, R.D.; LEATCH, G. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Babesia argentina* infection in cattle. **Australian veterinary journal**, v.49, n.8, p. 373-377, 1973.

JOYNER, L.P., DONNELLY, J. The epidemiology of Babesial infections. **Advances in Parasitology**, v.17, p.115-140, 1979.

KESSLER, R.H, SCHENK, M.A. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB): conceito, etiologia, transmissão, epidemiologia, diagnóstico e controle. In: **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. Embrapa Campo Grande, 1998. p.47-67.

KESSLER, R.H., SCHENK, M.A.M., MADRUGA, C.R., SACCO, A.M.S., MIGUITA, M. Tristeza Parasitária dos Bovinos (TPB). In: CHARLES, T.P., FURLONG, J. **Doenças parasitárias dos Bovinos de Leite**. Coronel Pacheco, MG: Embrapa-CNPGL, 1992. p.1-30.

KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton, Florida, 1988. p.1-22.

KUTTLER, K.L.; JOHNSON, L.W. Chemoprophylactic activity of imidocarb, diaminazene and oxytetracycline against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v.21, p.107-118, 1996.

LEVY, M.G., CLAUBAUGH, G., RISTIC, M. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. **Infection and Immunity**, v.37 n.3, p.1127-1131, 1982.

Mc COSKER, P.J. The global importance of babesiosis. In: Ristic, M; Kreier, J.P. **Babesiosis**. New York, Academic, p. 1-24, 1981.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte, 360p, 2001.

MADRUGA, C.R.; BERNE, M.E.A.; KESSLER, R.H.; GOMES, R.F.C.; LIMA, J.G.; SCHENK, M.A.M. **Diagnóstico da tristeza parasitária bovina no**

Estado de Mato Grosso do Sul: inquérito de opinião. Fundação Cargill, 1986. 40p. il. (EMBRAPA-CNPGC. Circular Técnica, n.18).

MADRUGA, C.R.; LEAL, C.R.B.; FERREIRA, A.M.T.; ARAÚJO, F.R.; BONATO, L.V.; KESLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; SOARES, C.O. Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n.4, p. 153-160, 2002.

MAHONEY, D.F. Bovine babesiosis: diagnosis of infection by a complement fixation test. **Australian Veterinary Journal**, v.38, p.48-52, 1962 a.

MAHONEY, D.F. The epidemiology of babesiosis in cattle. **The Australian Journal of Science**, v.24, p.310-313, 1962 b.

MAHONEY, D.F. Vaccination against babesiosis in Australia. In: SEMINÁRIO SOBRE HEMOPARÁSITOS, CIAT, Cali, Colômbia, **Anais...** 1975, p.17-22.

MAHONEY, D.F.; KERR, J.D.; GOODGER, B.V.; WRIGHT, I.G. The immune response of cattle to *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. **International Journal for Parasitology**, v.9, p.297-306, 1979.

MAHONEY, D.F.; ROSS, D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v.48, p. 292-298, 1972.

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 infection. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.67, n.2, p.197-203, 1973.

MORZARIA, S.; KATENDE, J.; KAIRO, A.; NENE, V.; MUSOKE, A. New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, supl. III, p. 201-205, 1992.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHERF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Symposium of Quantitative Biology 51**. Ed Cold Spring Harbor. p. 263-274, 1986.

PAYNE, R.C.; OSORIO, O.; YBAÑEZ, A. Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. Immunization against anaplasmosis and babesiosis. **Tropical Animal Health and Production**, v.22, p.101-108, 1990.

SACCO, A.M.S. **Babesiose bovina: avaliação de diferentes imunógenos no processo de imunização de bovinos e da resposta humoral produzida, através da RIFI e ELISA**. Belo Horizonte, 1996. 257 f. Tese (Doutorado em Parasitologia – Protozoologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

SAIKI, R.K; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B; HORN, G.T; ERLICH, H.A; ARNHEIM, M. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, n.4732, p.1350-1354, 1985.

SALEM, G.H.; LIU, X.J.; JOHNSRUDE, J.D.; DAME, J.B.; REDDY, R. G. Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis. **Molecular Cell Probes**, v.13, n.2, p. 107-113, 1999.

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

SHODA, L. K. M.; PALMER, G. H.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; GODSON, D. L.; BROWN, W. C. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1 β , tumor necrosis factor alpha, and nitric

oxide and inhibit parasite replication in vitro. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.9, p. 5139-5145, 2000.

SILVA, A.C.; LIMA, J.D. Utilização de inóculo padronizado na premunicação de bovinos contra anaplasmoses e babesioses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, n.2, suplemento 1, p.212, 1995.

SOLARI, M.A.; NARI, A.; CARDOZO, H. Impact of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* on the production of beef cattle in Uruguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, supplement III, p. 143-149, 1992.

SOLARI, M.A.; QUINTANA, S. Epidemiología y prevención de los hemoparasitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. In: NARI, A. & FIEL, C. **Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases Epidemiológicas para su prevención y control**. Montevideo: Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., 1994. cap.24, p. 481-507.

SWIFT, B.L.; REEVES, J.D.; THOMAS, C.M. Testicular degeneration and libido loss in beef bulls experimentally inoculated with *Anaplasma marginale*. **Theriogenology**, Los Altos, v.11, p. 277-290, 1979.

TEIXEIRA, M. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, T.R.T. Immunoregulation in parasitic infection: insights for therapeutic intervention. **Immunology Today**, Oxford, v.21, n.11, p. 536-538, 2000.

VANZINI, V.R.; RAMIREZ, L.M. Babesiosis y anaplasmosis bovina – diagnóstico, epidemiología y control. **Veterinária Argentina**, n.25, v.3, p.137-190, 1995.

WEILAND, G.; REITER, I. Methods for the measurement of the serological response to *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc., 1988. Cap.9, p. 143-162.

WRIGHT, I.G. Towards a synthetic *Babesia* vaccine. **International Journal Parasitology**, v.21, n.2, p.155-159, 1991.

YOUNG, A. S. Epidemiology of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc. cap.5. 1988. p.81-98.

ANEXO 1

Tampões utilizados na IFI:

Tampão de lavagem: solução A + B

Solução A: Na_2HPO_4 – 9,46g / 1000ml H_2O destilada.

Solução B: KH_2PO_4 – 11,34g / 1000ml H_2O destilada.

Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2.

Solução A (pH = 9,16).....	12,5ml
Solução B (pH = 4,43).....	28ml
NaCl	8,5g
H_2O destilada q.s.p	1000ml

Autoclavar por 30 min.

Ajustar o pH em 7,2 com ácido clorídrico ou NaOH 1N antes de completar o volume final de 1 litro.

Solução A+B: 100ml A + 50ml B

ANEXO 2

Soluções utilizadas para a coloração do gel de poliacrilamida 10% com nitrato de prata:

Solução A – Etanol.....12ml
Ácido acético..... 0,6ml
q.s.p..... 120ml

Homogeinizar com agitador magnético

Solução B – Nitrato de prata.....0,067g
Solução A..... 40ml

Fazer solução no momento do uso e manter em local escuro absoluto e homogeinizar com agitador magnético

Solução C – Hidróxido de sódio..... 0,9g
Formaldeído..... 0,12ml
H₂O destilada.....40ml

Fazer solução no momento do uso e manter em local escuro, homogeinizar com agitador magnético

Coloração:

- 1º) Submergir o gel de poliacrilamida 10% em 40ml da solução A por 5 min.;
- 2º) Aspirar a solução A;
- 3º) Submergir o gel de poliacrilamida 10% em 40ml da solução B por 5 min. no escuro absoluto;
- 4º) Aspirar a solução B;
- 5º) Submergir o gel de poliacrilamida 10% em 40ml de H₂O destilada por 5 min.;
- 6º) Aspirar a água destilada;
- 7º) Submergir o gel de poliacrilamida 10% em 40ml da solução C por 20 min. ou até começar aparecer as bandas no gel;
- 8º) Aspirar a solução C;
- 9º) Submergir o gel de poliacrilamida 10% em 40ml da solução A por 20 min.