

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Avaliação e otimização de Reações da Polimerase em Cadeia para
diagnóstico molecular e estudo epidemiológico de *Babesia bovis***

Danielle Andrade Almeida Pereira

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
FEVEREIRO DE 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Avaliação e otimização de Reações da Polimerase em Cadeia para
diagnóstico molecular e estudo epidemiológico de *Babesia bovis***

Danielle Andrade Almeida Pereira

Dr. Cláudio Roberto Madruga

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
FEVEREIRO DE 2006

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO.....	05
<i>Babesia bovis</i>	05
Histórico, Taxonomia e Morfologia.....	05
Ciclo evolutivo.....	06
Impacto econômico.....	07
Epidemiologia.....	07
Patogenia, Sinais Clínicos e Imunidade.....	08
Controle e profilaxia	10
Diagnóstico indireto.....	11
Diagnóstico direto.....	12
Mecanismos de evasão da resposta imune.....	14
Gene da subunidade ribossomal do RNA.....	15
Antígeno variável da superfície dos eritrócitos de <i>Babesia bovis</i> (VESA-1) e Proteína da membrana de eritrócito de <i>Plasmodium falciparum</i> (PfEMP-1).....	16
Referências.....	19
 Avaliação e otimização de Reações da Polimerase em Cadeia para diagnóstico molecular e estudo epidemiológico de <i>Babesia bovis</i>	31
RESUMO.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
Seleção de oligonucleotídeos iniciadores.....	34
Extração de DNA.....	35
Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	35
Avaliação da sensibilidade das reações da polimerase em cadeia (PCRs).....	36
Deteção de <i>B. bovis</i> em infecção experimental.....	36
Avaliação das PCRs em estudos epidemiológicos.....	36
Estabilidade enzoótica.....	36
Área livre.....	36
Avaliação da PCR-Ves 3 para estudo de epidemiologia molecular.....	37

Análise estatística.....	37
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	44

INTRODUÇÃO

Babesia bovis

O rebanho bovino brasileiro é um dos maiores do mundo, estimado em 198 milhões de cabeças segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2004. Dentre as infecções mais freqüentes que acometem os bovinos em áreas tropicais e subtropicais, destaca-se a babesiose bovina, transmitida por ixodídeos (Santos et al. 1998), tendo como agentes etiológicos os hemoprotozoários *Babesia bigemina* e *B. bovis*. Esse último hemoprotozoário apresenta uma patogenicidade maior, principalmente por causa da citoaderência de eritrócitos parasitados nas células endoteliais dos capilares do cérebro (Aikawa et al. 1992).

Babesia bovis é transmitida no Brasil por larvas do carrapato *Boophilus microplus* aos bovinos, tendo um período de incubação variável, entre sete e 14 dias, que depende da taxa de inoculação e da sensibilidade do hospedeiro (Callow 1984). Essa doença foi relatada no Brasil pela primeira vez por Fajardo (1901).

Histórico, Taxonomia e Morfologia

Babes (1888) investigou a doença que causava surto de hemoglobinúria no gado da Romênia e foi o primeiro a descrever piroplasma no sangue de bovinos. Inicialmente, acreditava-se que era uma bactéria e foi denominada de *Haematococcus bovis*, posteriormente foi caracterizada como um hemoprotozoário. Nos Estados Unidos, Smith & Kilborne (1893) demonstraram que o organismo que causava a “Febre do Texas” era *Pyrosoma bigeminum* (= *Babesia bigemina*) e que a doença era transmitida de um artrópode (*Boophilus annulatus*) para um hospedeiro mamífero. Em 1903, na Argentina, foram descritas duas formas de babesiose, a forma A e a forma C, que mais tarde foram denominadas de *B. bigemina* e *B. argentina* (= *B. bovis*) (Lignières, 1903).

Boophilus annulatus é o vetor presente na América do Norte, Europa e Ásia, *B. geigyi* na África e *B. microplus* na África, Austrália e América do Sul, incluindo o Brasil. Esse hemoprotozoário está presente entre os paralelos 32° de latitude Norte e Sul, e altitudes inferiores a 1200 metros acima do nível do mar, sendo que sua distribuição está relacionada com as condições favoráveis para o ciclo biológico do carrapato vetor (Friedhoff 1988).

Babesia bovis pode apresentar-se em forma arredondada ou anilhada, alargada ou piriforme, ocupando uma posição periférica na célula. A forma arredondada mede cerca de 1,0 a 2,5 µm e a piriforme mede 1,5 a 2,4 µm (Kessler & Schenk 1998). Atualmente a

classificação filogenética desse hemoprotozoário é a seguinte: filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiorida, subordem Piroplasmorida, família Babesiidae e gênero *Babesia* (Levine 1971, Allsopp et al. 1994).

Ciclo evolutivo

De acordo com Furlong e Evans (1991), no Brasil, *B. microplus* encontra condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento, desde a região Sul em direção ao Centro-oeste, região Norte e na maioria da região Nordeste. Nessas regiões pode potencialmente completar duas e meia, três ou mesmo cinco gerações por ano, em locais com temperaturas médias anuais acima de 17° C com precipitações pluviométricas apropriadas. Em regiões com períodos de secas severas, há limitação da sobrevivência do carrapato, podendo ocorrer uma completa paralisação na incubação, postura, e até mesmo o fracasso desses estágios (Barros et al. 2005).

O ciclo da transmissão de babesia é um processo complexo, formado por três elementos: o vetor, o parasita e o hospedeiro, e se inicia quando os parasitas no sangue infectado do hospedeiro são ingeridos pelo ixodídeo, algumas horas antes de completar o engurgitamento. Dessa forma inicia-se a infecção alimentária no lúmen do intestino do carrapato (Friedhoff 1988).

No intestino, os parasitas transformam-se em gametas, que se fundem dando origem aos zigotos. Esses penetram nas células epiteliais, iniciando uma divisão por esquizogonia, dando origem a esporocinetos ou merozoítos, que invadem a hemolinfa (Mahoney & Mirre 1979). A partir daí, iniciam-se ciclos de fissão múltipla nos diversos órgãos da fêmea ingurgitada, particularmente nas fibras musculares e inclusive nas células do ovário, o que resulta na infecção dos oocitos. Quando as larvas começam a se alimentar do sangue do bovino, a multiplicação continua nas células epiteliais das glândulas salivares, dando origem aos esporozoítos que são inoculados, através da saliva do carrapato. O desenvolvimento mais significativo ocorre quando os cinetos invadem as células da glândula salivar e sofrem uma reprodução assexuada produzindo esporozoítos infectantes. Isso ocorre nas primeiras 24 horas, após a fixação do carrapato infectado no hospedeiro mamífero (Dalglish et al. 1978).

Daí por diante, o parasita se multiplica por fissão binária dentro dos eritrócitos do hospedeiro dando origem a dois merozoítos. Esses, rompem a célula hospedeira e cada um irá penetrar em outro eritrócito, dando origem a dois novos merozoítos (Friedhoff 1988). Essa multiplicação continua até que o hospedeiro morra ou que o hospedeiro controle a infecção (Hodgson 1992).

Impacto econômico

Hemoprotozoários transmitidos por carrapatos são agentes etiológicos importantes de doenças que causam elevados índices de morbidez e mortalidade no gado. Os parasitas apicomplexos pertencentes ao gênero *Babesia* (Kjemtrup & Conrad 2000), constituem um dos principais fatores limitantes à bovinocultura em áreas tropicais e subtropicais do mundo, causando abortos, perdas na produção de carne e leite, altas taxas de morbidade e mortalidade, além de custos com medidas profiláticas (Araújo et al. 1998).

Não existem estudos econômicos sistemáticos na América Latina e consequentemente no Brasil, no que se refere à babesiose bovina. Entretanto, os dados existentes, embora discordantes, evidenciam elevado impacto econômico. Na Argentina as perdas foram cerca de US\$ 6,2 milhões anuais devido a babesiose (Guglielmone 1995), enquanto que no Uruguai, foram estimadas perdas que atingiriam US\$ 20 a 40 milhões por ano (Azambuja et al. 1994). No Brasil, os prejuízos causados pelo complexo Tristeza Parasitária Bovina (*Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*) foram estimados em US\$ 500 milhões de dólares anuais (Grisi et al. 2002).

Epidemiologia

A estabilidade endêmica de uma região é definida como o estado onde a relação entre hospedeiro, agente, vetor e ambiente é tal que raramente ou nunca ocorre doença clínica (Perry 1996), por isso a epidemiologia de *B. bovis* numa população de bovinos é determinada, pela idade, raça e ambiente em que vivem esses animais e principalmente a população de carrapatos do gênero *Boophilus* na região (Spath 1986). O conhecimento da situação epidemiológica de *Babesia spp* em uma região é importante, pois esta revela a probabilidade da ocorrência ou não de surtos (Mahoney 1975).

A maior parte do território brasileiro possui estabilidade endêmica, entretanto, existem algumas regiões com instabilidade endêmica ou áreas livres de *Babesia spp*. Animais que nascem em áreas livres de vetores são altamente sensíveis a babesiose. Em áreas de instabilidade endêmica, animais nascidos em épocas climáticas desfavoráveis ao vetor passam o período inicial de suas vidas sem sofrerem infecções, entretanto, tornam-se altamente suscetíveis às infecções por *Babesia* em idades mais avançadas, quando as condições climáticas favorecerem o desenvolvimento do vetor e os animais não estão mais protegidos pela imunidade passiva conferida pelo colostro (Kessler et al. 1983).

A ocorrência de repetidas infecções durante os primeiros meses de vida dos animais permitirá o desenvolvimento da imunidade ativa, favorecendo a proteção contra a doença; e, infecções subseqüentes funcionarão como estímulos antigênicos, protegendo os animais contra surtos de babesiose. Assim, esses tornam-se portadores, funcionando como carreadores persistentes e servindo de fonte de infecções para animais jovens ou recém-introduzidos no rebanho (Malacco 1998).

Com base nestes conceitos, é conhecido que as maiores perdas econômicas referentes à babesiose bovina ocorrem em áreas de instabilidade enzoótica ou por ocasião da transferência de animais de áreas livres para outras cuja situação epidemiológica seja de estabilidade. Estudos epidemiológicos realizados no Brasil têm caracterizado determinadas regiões como áreas de estabilidade enzoótica, com prevalências sorológicas acima de 80% para *B. bovis* (Linhares et al. 1992, Barci et al. 1995, Araújo et al. 1998, Madruga et al. 2000, Soares et al. 2000), assim como regiões de instabilidade enzoótica (Alves 1987, Vidotto et al. 1997, Lima et al. 1999, Barros et al. 2005).

Patogenia, Sinais Clínicos e Imunidade

A infecção por *B. bovis* pode ter um curso benigno com recuperação espontânea ou produzir uma infecção aguda grave que resulta em morte do animal (Larlos 1989), mas, mesmo nessa situação a parasitemia em geral não é elevada porque os eritrócitos infectados se aderem ao endotélio vascular de órgãos centrais. Em um animal com doença fatal, pode-se desenvolver aproximadamente 15.000 organismos/mm² de sangue e em casos agudos não fatais é possível demonstrar a presença de 5.000 organismos/mm³ representando uma parasitemia de 0,2% (Mahoney et al. 1973).

Em animais com uma forma moderada de babesiose, podem ocorrer episódios de parasitemia durante um período de uma a três semanas, com elevação de temperatura retal (39.0°C - 40.0°C) associada à anorexia e depressão. A hemoglobinúria é geralmente ausente, mas uma leve icterícia pode ser observada. Apesar da taxa de liberação de hemoglobina normalmente não ser tão alta, a destruição de eritrócitos do sangue do hospedeiro durante o percurso da doença pode ultrapassar a 50%. Em casos de infecções severas, a temperatura retal sobe e alcança um máximo de 41°C - 41,5°C entre dois e três dias, com aumentos de parasitemia. Já em animais com infecção fatal, a temperatura retal cai para níveis subnormais e estabiliza algumas horas antes da morte (Allred 1998).

As babesioses se caracterizam, principalmente, pela destruição eritrocítica, decorrente dos aspectos biológicos dos agentes em realizarem parte de seu ciclo no interior destas

células, sendo o grau de anemia proporcional ao número de hemácias parasitadas (Potgier & Els 1977). O início da queda do volume globular (VG) no gado com infecção por *B. bovis* é resultante, em grande parte, da hemodiluição associada ao estase circulatório (Wright & Kerr 1974). Mas, o quadro clínico se agrava quando eritrócitos infectados se aderem ao endotélio vascular de órgãos centrais, principalmente do cérebro, causando a babesiose cerebral que geralmente é fatal (Nevils et al. 2000).

Durante a reprodução assexuada do parasita, ocorre a liberação de pequenas moléculas que agem como toxinas e bloqueiam receptores de cortisol (um dos responsáveis pela homeostase). Com a diminuição da ação do cortisol, ocorre a ativação de prostaglandinas e complemento, consequentemente há ativação da cascata da coagulação, estimulando substâncias vasoativas como a caliceína e bradicinina que podem levar o animal a um choque hipovolêmico (Ahmed 2002). É provável que esses eventos sejam responsáveis pelas alterações circulatórias que ocorrem no cérebro, causando hipóxia e sinais clínicos neurológicos, onde se observa prostração, febre, anemia branda, icterícia, sialorréia, convulsões, complicações circulatórias, respiratórias, neurológicas e freqüentemente morte do animal (Allsopp 1994). A participação da imunidade inata e adquirida é muito importante para a recuperação do animal que sofreu infecção por *Babesia* spp. (Goff et al. 2001). Os macrófagos possuem papel relevante na remoção de eritrócitos parasitados da circulação sanguínea e participam da imunidade adquirida porque atuam como apresentadores de antígeno as células T. Outra provável atuação dos macrófagos na imunidade inata é a secreção de substâncias que inibem o crescimento de *B. bovis* (Montealegre et al. 1985). Portanto, o resultado da infecção em um animal imunogenicamente sensível dependerá do equilíbrio entre o hospedeiro e o parasita.

Foi demonstrado que monócitos esplênicos estimulados ex vivo com *B. bovis*, associados ao IFN- γ , expressaram NO (Goff et al. 2002). Além disso, linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, bem como as células NK e alguns tipos de células dendríticas estão envolvidas no processo de produção de IFN- γ (Goff et al. 2003). A população predominante de células que serão ativadas posteriormente são as seguintes: CD2⁺ e CD8⁺ que são o fenótipo de células NK de bovinos (Storset et al. 2004, Goff et al. 2006), e células NK produzem IFN- γ na presença de IL-12 e IL-18 quando *B. bovis* se expõe através de fagócitos mononucleares (Goff et al. 2006).

Um outro aspecto importante da babesiose é que os animais que se recuperam da enfermidade desenvolvem imunidade contra as manifestações clínicas da doença, sem eliminar a *B. bovis*, mantendo os bovinos portadores crônicos com flutuações decorrentes das

recidivas (Mahoney et al. 1973). Essa cronicidade é mantida devido ao seqüestro dos eritrócitos infectados com hemoprotozoários maduros na microcirculação, e a conseqüente citoadesão nas vênulas pós-capilares (Allred 1998).

Especificamente, existem alguns mecanismos pelos quais o sistema imune pode eliminar eritrócitos infectados, entre eles podemos citar a Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (ADCC) (Goff et al. 1984) e opsonização seguida de fagocitose (Jacobson et al. 1993). Outro mecanismo que ocorre no início da infecção quando a parasitemia ainda é baixa, é a síndrome do choque decorrente das reações antígeno-anticorpo ou pelos produtos formados pelo dano nos tecidos (Kessler & Schenk 1998).

Na necropsia, os principais achados que caracterizam uma infecção por *B. bovis* são: mucosas e serosas acentuadamente pálidas, hepatomegalia e esplenomegalia, vesícula biliar distendida e linfonodos aumentados e escuros. O cérebro pode apresentar acentuada congestão da rede capilar e, também, da substância cinzenta, tornando-se caracteristicamente avermelhada (Nevils et al. 2000).

Controle e profilaxia

O controle do carrapato *B. microplus* foi uma das primeiras formas de controle de sucesso para eventuais erradicações da *Babesia spp* nos Estados Unidos (Pegram et al. 2000). Essa forma de controle tem sido realizada desde a década de 50 através do uso de acaricidas (Pruett 1999) que se encontram disponíveis no mercado como as formamidinas, os piretróides e as avermectinas (Häuserman et al. 1992). Mas, existem estudos que têm demonstrado a crescente resistência apresentada por carrapatos a compostos químicos presentes nos carrapaticidas (Crampton et al. 1999).

Aliado ao controle do carrapato, o rápido desenvolvimento da biotecnologia tem alavancado o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas que surgiram nas décadas de 80 e 90, como uma boa alternativa ao método clássico de premunição (Bock et al. 2004).

Bock & de Vos (2001) avaliaram eficácia, grau e duração da imunidade providas por vacinas vivas contra infecções de *B. bovis* na Austrália (Combavac 3 em 1) e descobriram que elas promovem mais de 95% de proteção para os animais. Já a vacina brasileira contra a TPB surgiu de uma tecnologia desenvolvida pela Embrapa Gado de Corte e produzida pelo laboratório Hemopar no RS, estando disponível no mercado com o nome comercial de EMBRAVAC®-HEMOPAR. Esta é apresentada em três tubos criogênicos, sendo que cada tubo contém, separadamente, as cepas atenuadas de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. centrale* e um frasco contendo o diluente. A vacina é conservada congelada em nitrogênio líquido até o

momento do uso (Kessler et al. 1991) e segundo Sacco et al. (2001) a imunização de bovinos com amostras atenuadas desses parasitas, demonstrou ser inócua, imunogênica e eficiente.

Para a utilização da vacina, devem ser levadas em consideração as diversidades fisiográficas do País ou da região, sendo que bovinos criados em áreas livres sempre que forem importados para áreas endêmicas deverão ser vacinados. Em áreas de instabilidade endêmica, quando os nascimentos coincidirem com o período livre de carrapatos, é recomendável que se vacinem todos os bezerros, antes que o carrapato reapareça. E nas áreas de estabilidade endêmica, somente é recomendável a vacinação ao importar animais de áreas livres ou de instabilidade endêmica ou quando for implantado um programa de controle intensivo do carrapato na própria fazenda. Neste último caso, somente os bezerros nascidos no período de controle deverão ser vacinados (Kessler et al. 1987, Bock et al. 2004).

Diagnóstico indireto

Os estudos de prevalência de hemoparasitos como *B. bovis*, são importantes para a determinação da situação epidemiológica em uma região, indicando uma situação de instabilidade ou de estabilidade endêmica e, conseqüentemente, se há ou não a necessidade de adoção de medidas preventivas (Madruga et al. 2000).

Os testes sorológicos são ferramentas importantes na realização destes estudos epidemiológicos, uma vez que os anticorpos gerados na resposta imune à *Babesia* spp podem ser detectados no soro de bovinos por longos períodos (Böse et al. 1990, Boonchit et al. 2002).

Na determinação da prevalência da *B. bovis* bem como de outros parâmetros epidemiológicos, tal como taxa de inoculação, as provas sorológicas são fundamentais. Houve desenvolvimento de várias técnicas sorológicas com a finalidade de aprimorar a sensibilidade e especificidade (Johnston et al. 1973, Todorovic & Kuttler 1974, Barry et al. 1982, Waltisbuhl et al. 1987, Chieves et al. 1989, Kung'u & Goodger 1990). Mais recentemente, foram produzidos antígenos altamente purificados por técnicas de biologia molecular com a produção de subunidades antigênicas de especificidade definida (Goff et al. 1989, Bose et al. 1990), que foram utilizados em testes de imunoadsorção enzimática (ELISA). Apesar destes progressos tecnológicos da sorologia, a sensibilidade conseguida por estes testes não foi efetivamente superior ao da imunofluorescência indireta (Barry et al. 1982, Goff et al. 1989) para que possam alterar a interpretação de um levantamento sorológico. Inclusive, a alta

sensibilidade da imunofluorescência indireta possibilitou um elevado grau de concordância com a sonda de DNA (Goff et al. 1988).

Mas a imunofluorescência indireta (IFI) e os testes de imunoadsorção enzimática (ELISA) são provavelmente, as técnicas mais utilizadas, devido à elevada sensibilidade na detecção de anticorpos contra *Babesia* spp (Araújo et al. 1998). O ELISA apresenta a vantagem da automação na leitura, permitindo a análise de um maior número de soros (Madruga et al. 2000), mas todos esses testes podem ser usados para estudos epidemiológicos da *B. bovis* (Blandino et al. 1994, Molloy et al. 1998) e até mesmo caracterizar o Brasil na sua diversidade fisiográfica, como já tem sido feito (Araújo et al. 1997, Lima et al. 1999).

Diagnóstico direto

A babesiose pode ser diagnosticada presuntivamente pelos sintomas aparentes (Kessler et al. 1998). Entretanto, exames laboratoriais são fundamentais para a determinação do agente etiológico da enfermidade.

O exame parasitológico, por meio de esfregaço sanguíneo delgado e coloração de Giemsa May-Grunwald, consiste numa ferramenta importante para a confirmação do diagnóstico clínico (Callow et al. 1993). Entretanto, possui limitações na detecção de portadores, devido à baixa sensibilidade durante a fase crônica da doença. Isso ocorre porque nessa fase, há um reduzido número de eritrócitos infectados e estes preferencialmente se localizam em vasos sanguíneos de órgãos centrais (de Vos et al. 2000).

O advento da Biologia Molecular, ou seja, de técnicas que possibilitam a amplificação do DNA *in vitro*, proporcionou o diagnóstico direto de diversos agentes etiológicos de enfermidades de importância sanitária e econômica para humanos e animais (Williams et al. 1990, Conrad et al. 1992, Azambuja et al. 1994, Birkenheuer et al. 2003, Lew & Jorgensen 2005).

Os primeiros métodos biológicos moleculares desenvolvidos foram as sondas de DNA marcadas com P³² ou biotina, que reconhecem e hibridizam com seqüências alvos espécie-específica ou gênero-específica (McLaughlin et al. 1986, Singh 1997). Para incrementar a sensibilidade das reações baseadas em DNA, Müllis et al. (1986) desenvolveram a reação da polimerase em cadeia (PCR) que é um processo enzimático *in vitro* para a síntese de seqüências de DNA. A PCR permite amplificar milhares de vezes uma região específica do DNA. Por esse motivo, revolucionou o diagnóstico molecular de agentes patogênicos, devido a sua sensibilidade e especificidade, inclusive para diversos protozoários, tais como *Plasmodium* spp (Fabre et al. 2004), *Toxoplasma* spp (Spalding et al. 2002), *Trypanosoma*

(Snounou et al. 1993, Camargo et al. 2004) e os do gênero *Babesia* spp (Figuerola et al. 1992, Kawabuchi et al. 2005, Lew & Jorgensen 2005). As principais vantagens da PCR estão na detecção precoce das infecções e determinação de portadores (Figuerola et al. 1993). Comparativamente ao exame parasitológico como o de distensão de sangue corado com Giemsa May-Grunwald, a PCR apresenta uma sensibilidade significativamente maior (Calder et al. 1996, Gayo et al. 2003) e segundo Böse et al. (1995) é mais específica que os testes sorológicos existentes.

Mesmo assim, formas alternativas de PCR como PCR Multiplex, PCR-*nested* ou *semi-nested* têm sido desenvolvidas e aplicadas ao diagnóstico com a finalidade de prover a essa técnica uma sensibilidade e aplicabilidade maior. A PCR Multiplex é capaz de identificar diferentes espécies ou gêneros de organismos presentes em uma única amostra, utilizando dois ou mais pares de oligonucleotídeos iniciadores em uma única reação (Figuerola et al. 1993). Já a *nested* PCR é uma alternativa de execução da PCR que visa proporcionar uma maior sensibilidade. Nessa forma de PCR, o produto amplificado (*amplicon*) é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando oligonucleotídeos iniciadores homólogos às seqüências internas do segmento já amplificado. Geralmente na primeira PCR é utilizado um oligonucleotídeo iniciador gênero-específico e na segunda PCR um oligonucleotídeo iniciador espécie-específico do parasita em estudo (Rampersad et al. 2003, Queiroz et al. 2004). No caso da *semi-nested* PCR, utiliza-se apenas um novo oligonucleotídeo iniciador e o outro seria um dos utilizados na primeira reação (Birkenheuer et al. 2003). Esses dois últimos procedimentos incrementam a sensibilidade e especificidade da PCR.

Notomi et al. (2000) desenvolveram uma técnica de alta especificidade que amplifica DNA com eficiência e rapidez sob condições de isoterminia (aproximadamente 60 a 65°C). Esse método denominado amplificação circular isotérmica (*Loop mediated isothermal amplification* - LAMP) utiliza-se DNA polimerase e quatro conjuntos de primers específicos que reconhecem um total de seis seqüências distintas no DNA molde. Uma das primeiras LAMP foi empregada no diagnóstico do vírus da hepatite B (Notomi et al. 2000), e recentemente tem sido aplicado para detecção direta do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* em amostras de septo (Iwamoto et al. 2003) e *P. falciparum* (Poon et al. 2006). Finalmente, a inovação na tecnologia da PCR foi o desenvolvimento de equipamentos e técnicas que permitem o monitoramento da PCR em tempo real e elimina a necessidade da detecção dos produtos amplificados por eletroforese (Belak & Thoren 2001).

Mecanismos de evasão da resposta imune

Um dos mecanismos de evasão imune ocorre através da capacidade que os parasitas têm de alterar sistematicamente as moléculas da superfície celular, que são alvo da resposta imune humoral do hospedeiro (Gupta 2005).

Nos estudos para identificar os antígenos variáveis responsáveis pela citoadesão da superfície de eritrócitos infectados por *B. bovis*, foram utilizados marcadores radioativos [^{125}I] e [^3H] em eritrócitos parasitados para identificar proteínas e glicoproteínas. Esses estudos identificaram proteínas de peso molecular de aproximadamente 60, 115, e 118 kilodaltons (kDa) (Howard et al. 1980). Posteriormente, alterações antigênicas, em eritrócitos infectados por *B. bovis*, foram comprovadas usando métodos de captura de antígenos específicos (Allred & Ahrens 1993). Subseqüentemente, análises de antigenicidade de eritrócitos e anticorpos presentes durante a infecção com clones de *B. bovis* de isolados do México e dos Estados Unidos, demonstraram alterações progressivas no fenótipo de antígenos e respostas de anticorpos correspondentes, caracterizando dessa forma, variação antigênica (Allred et al. 1993).

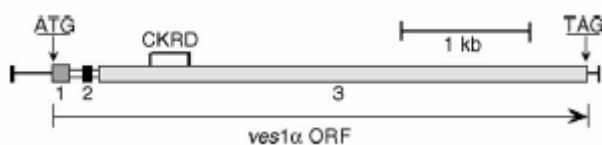
Eritrócitos que sofrem citoaderência e seqüestro em capilares e venulas pós-capilares estão parasitados com *B. bovis* em estágios maduros, trofozoítos e merontes (Callow & McGavin 1963, Wright 1972). Esta citoaderência é análoga à observada em humanos com eritrócitos infectados por *P. falciparum* (Luse & Miller 1971). Durante a evolução da interação parasito e hospedeiro, cada um desses agentes patogênicos adquiriu habilidades para expressar nos eritrócitos infectados modificações estruturais na membrana de eritrócitos, que facilitam a exibição de ligantes que permitem a adesão do eritrócito parasitado ao endotélio dos vasos sanguíneos (Chen et al. 1998). Embora, ainda não tenham sido identificada a totalidade de antígenos desses hemoparasitas na superfície de eritrócitos, VESA1 e PfEMP1, são os principais componentes para *B. bovis* e *P. falciparum*, respectivamente (Beeson & Brown 2002, Allred & Al-Khedery 2004).

Essas características demonstram uma importante correlação entre *B. bovis* e *P. falciparum* no que se refere à evasão da resposta imune, devido a presença de proteínas na superfície de eritrócitos infectados que migram para a microcirculação (Baruch et al. 1995). A citoaderência para ambas as espécies são organizadas em tipos de estruturas adesivas, otimizando sua interação com receptores endoteliais (O'Connor & Allred 2000). Assim, por evolução, ambos os parasitas por mecanismos distintos chegaram a soluções estruturais

semelhantes e comparáveis para estabelecer a longa infecção no portador. Portanto, apesar das semelhanças, há diferenças nos mecanismos genéticos e bioquímicos usados por *B. bovis* e *P. falciparum*, na geração de ligantes para a citoadesão, bem como na forma de indução da resposta do sistema imune do hospedeiro (Allred 1998).

A família multigênica *ves*, na qual pertence o gene *ves1a*, está presente em pelo menos três dos quatro cromossomos da *B. bovis* (Allred et al. 2000), sendo que o genoma completo da *B. bovis* é de aproximadamente 9.4 Mb (Jones et al. 1997). No caso do *P. falciparum*, os genes *var* são os responsáveis pela codificação das proteínas PfEMP-1, expostas na superfície dos glóbulos vermelhos parasitados e responsáveis pelo seqüestro de formas evolutivas dos parasitas por adesão e retenção dos mesmos nos capilares pós-venosos. Quando o seqüestro ocorre intensamente no cérebro, pulmão, rim e/ou placenta, desenvolvem-se patologias graves (Craig & Scherf 2001, Nogueira et al. 2001). Esses genes constituem uma família poligênica de 40 a 50 elementos, distribuídos nos quatorze cromossomos do parasita. Em contrapartida, o gene *ves1a* contém dois íntrons e se caracteriza por apresentar pequenas seqüências altamente conservadas ao longo do genoma com regiões de elevado polimorfismo (O'Connor & Allred 2000). A proteína VESA1 codificada por esse gene, provoca alterações na superfície dos eritrócitos, formando uma protuberância que se adere ao endotélio capilar (O'Connor et al. 1999). Devido ao polimorfismo genético, a proteína VESA1, apresenta variações antigênicas e estruturais que afetam a citoadesão (O'Connor & Allred 2000).

A estrutura do gene *ves1-α* está demonstrada esquematicamente, onde a organização cromossomal de um único gene *ves1-α* de *B. bovis* contém exons que codificam, enquanto que o dois introns, ambos perto do 5' final do open reading frame são mostrados como caixas vazias. O start codon ATG e stop codon TAG estão identificados, como também a região que codifica o domínio rico em cisteína-lisina (CKRD) (Allred & Al-Khedery 2006).



Gene da subunidade ribossomal do RNA

Alguns estudos para definir o genoma mitocondrial de apicomplexos revelaram a existência de duas moléculas extracromossomais (Feagin 1994). Algumas espécies revelaram que codificam uma pequena subunidade ribossomal de RNA (SSrRNA) (Gardner et al. 1994),

que tem características semelhante tanto para seqüências mitocondriais como para plasmidiais (Gardner et al. 1991).

O gene do RNA da sub-unidade ribossomal presente na maior parte dos eucariontes é arranjado em cópias múltiplas de genes quase idênticos (Long & Dawid 1980), e por essa razão é importante para o diagnóstico molecular. Estruturalmente, diferenças nos ribossomos de *Plasmodium* são devido a mutações que ocorrem principalmente em regiões variáveis que constituem 3,5% a 7% em toda a seqüência do gene SSrRNA (Gunderson et al. 1987, McCutchan et al. 1988).

O genoma “organelar” de *B. bovis* precisa ser caracterizado em alguns detalhes. Adicionalmente foi utilizada uma PCR para ampliar um fragmento de 552bp do gene de *B. bovis* que demonstrou significativa homologia com o gene “organellar” SSrRNA de várias espécies (Gozar & Bagnara, 1993). Este gene SSrRNA mostrou a identidade ainda mais alta com o gene “organellar” SSrRNA de 35bp de DNA circular de *P. falciparum*. Genes rRNA são altamente conservados para vários filos, e são apropriados para a amplificação por PCR de fragmentos do gene porque é relativamente fácil desenhar oligonucleotídeos específicos (Gozar & Bagnara, 1993).

Linhares et al. (2002) utilizou três pares de *primers* altamente específicos, desenhados a partir de seqüências do gene da pequena unidade ribossomal de RNA (SSrRNA), para identificar *B. bovis*, e obteve 100% de sensibilidade para todos eles. Além disso, esse gene tem sido altamente explorado através da biotecnologia para detecção de diversos parasitas (Calder et al. 1996, Gozar & Bagnara 1993, 1995). Portanto a utilização de *primers* desenhados a partir desse gene seria provavelmente um método sensível de diagnóstico e estudo epidemiológico.

Antígeno variável da superfície dos eritrócitos de Babesia bovis (VESA-1) e Proteína da membrana de eritrócito de Plasmodium falciparum (PfEMP-1)

B. bovis é um hemoparasita que se assemelha em certos aspectos com o *P. falciparum*, apesar de serem filogeneticamente distantes (Allred 1995). As semelhanças são com relação à rápida variação antigênica e citoaderência que contribuem significativamente com a evasão imune e patologia destas enfermidades (Allred 1998). Esses fatores são responsáveis por infecções persistentes e patologia dessas doenças, embora as estratégias genéticas e bioquímicas sejam distintas segundo Moll et al. (1990). Os eritrócitos infectados sofrem modificações bioquímicas e estruturais. Por exemplo, alterações na composição dos fosfolípidos e/ou assimetria da membrana de eritrócitos com translocação de fosfatidil-serina

(PS), do interior para o exterior da superfície de membrana (Maguire et al. 1991). Isso induziria uma mudança conformacional que causaria o não reconhecimento pelo sistema imunológico (O'Connor et al. 1997). Os lipídios predominantes em eritrócitos infectados por *B. bovis* são a fosfatidilcolina e ácidos fosfatídicos; já o *P. falciparum* sintetiza um lipídio de membrana denominado glicosil-fosfatidilinositol. Esses fosfolípidos, além de serem responsáveis pela aderência do parasita à membrana plasmática, também estimulam os macrófagos a produzirem o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α). Essa citocina aumenta a expressão de receptores das células endoteliais do hospedeiro, tornando a citoadesão mais eficiente (Florin-Christensen et al. 2000).

Como os parasitas encontram-se no interior dos eritrócitos, a superfície dos mesmos torna-se a interface entre o parasita e o sistema imunológico do hospedeiro, dificultando o acesso, principalmente devido ao seqüestro destas células no endotélio dos capilares (Allred et al. 1994).

As infecções causadas por *B. bovis* e *P. falciparum* clinicamente são muito similares. Ambas apresentam disfunções circulatórias generalizadas com ativação do sistema de coagulação, liberação de peptídeos vasoativos, consumo de fatores de complemento, hipotensão, febre alta, vasodilatação e hemólise terminal (Wright et al. 1988, Chen et al. 1998). As parasitemias são relativamente baixas, quando comparada com os outros hemoparasitos, sendo que a lesão mais característica é o seqüestro de eritrócitos no interior de capilares, especialmente no cérebro (Mahoney et al. 1973, Biggs et al. 1991).

Ambos parasitas são seqüestrados nos capilares de alguns tecidos do hospedeiro, uma atividade que contribui significativamente com a patogenia tanto da malária como da babesiose (Callow & McGavin 1963, Aikawa 1988), particularmente em complicações cerebrais que são características principais dessas duas doenças na fase aguda (Wright 1972, Maepherson et al. 1985). O fenômeno de citoadesão com seqüestro de eritrócitos possibilita condições favoráveis para esses parasitas evitarem a sua eliminação pelo sistema imune esplênico (Kyes et al. 2001). Porém, não há vantagem absoluta do parasita sobre o sistema imune do hospedeiro, pois a probabilidade de perpetuação dos parasitas depende da sobrevivência do hospedeiro para que haja transmissão pelo vetor artrópode. Portanto houve durante o processo evolutivo estabelecimento de um equilíbrio com seu hospedeiro mamífero. Nesse equilíbrio obtido, o hospedeiro tem participação, porque adquiriu capacidade de impedir a aderência de eritrócitos parasitados ao endotélio, através da formação de anticorpos direcionados aos componentes do parasita necessários para a citoadesão, expondo o parasita a ação imunoprotetora dos elementos do sistema imune localizados no baço (Allred 1995).

A citoaderência dos glóbulos vermelhos infectados com formas maduras do parasita malarial (trofozoítas e esquizontes) faz-se por interação de DBL - "Duffy binding like" da proteína PfEMP-1 com receptores endoteliais, que são as adesinas e integrinas, responsáveis por captação de glóbulos brancos nos processos de diapedese da corrente sanguínea para os tecidos. Os receptores identificados são ICAM-1 (inter cellular adhesion molecule-1), VCAM (vascular cell adhesion molecule), CD36, CD31 entre outros (Giha et al. 2000). Portanto, os parasitas se adaptaram e tornaram-se capazes de reconhecer receptores para realizar a citoaderência, que representa, para eles, um meio de evitar a passagem pelo baço, onde alterações da membrana celular dos eritrócitos provocariam sua captura e destruição por células fagocitárias (Biggs et al. 1991). Pesquisas de vários grupos permitiram identificar a região da molécula PfEMP-1 responsável pela especificidade de adesão pelos diferentes receptores. Assim, a citoaderência responsável pela seqüestração no cérebro foi identificada como dependendo dos receptores ICAM-1 e DBL-b (Smith *et al.* 2000). A forma grave da malária em gestantes é resultante da citoaderência de certas PfEMP-1, contendo DBL-g que reconhece como receptor radicais CSA (condroitin sulfato A) de certas glicoproteínas abundantes na placenta (Buffet *et al.* 1999). Portanto, a virulência de certas infecções de malária falcípara se explicaria, atualmente, pela associação de fatores do hospedeiro humano e do parasita: a expressão induzida de receptores regulados por certas citocinas de um lado e a expressão de certos genes *var* do parasita de outro (Craig & Scherf, 2001).

Tanto na babesiose, como na malária, o hospedeiro possui uma imunidade inata e monta uma resposta imune adquirida. Como os agentes etiológicos dessas enfermidades não são totalmente acessíveis ao sistema imune do hospedeiro, esses persistem por longos períodos como portadores, havendo produção de altos títulos de anticorpos (Allred & Al-Khedery 2004). Portanto, essa habilidade em estabelecer infecções assintomáticas e crônicas, é resultado de equilíbrio entre as defesas imunes anti-parasitárias do hospedeiro e os mecanismos de evasão imunes do parasita (O'Connor & Allred 2000).

O parasita da malária humana cresce e replica dentro de eritrócitos em parte do seu ciclo de vida. Esse estágio eritrocítico é responsável por toda a patologia associada com essa doença. O estágio invasivo do parasita (merozoíto) tem um conjunto de organelas apicais especializadas, que liberam substâncias no momento da invasão (Blackman & Bannister 2001). Acredita-se na ocorrência de interações protéicas do parasita com eritrócitos, que mediam uma série de eventos que conduzem a introdução do parasita para o interior do vacúolo parasitóforo (Taylor et al. 2002). Em protozoários como *P. falciparum*, a citoaderência ocorre de três formas: citoaderência ao endotélio de capilares sanguíneos;

autoaglutinação, onde os eritrócitos unem-se uns aos outros e; formação de “rosetas”, em que os eritrócitos não infectados formam uma coroa em torno dos infectados. Esses fenômenos dependem da proteína PfEMP-1 e dos genes *var* que a codificam. Já em infecções causadas por *B. bovis*, foram evidenciadas apenas as duas primeiras formas de citoaderência (Allred 1995).

Na fase assexuada, o parasita malarial induz modificações nas células vermelhas do hospedeiro, facilitando assim, a sua sobrevivência e o seu crescimento intraeritrocítico (Aikawa 1988). Estas modificações incluem a apresentação de proteínas imunogênicas da superfície de eritrócitos parasitados, como por exemplo, PfEMP-1, que é uma proteína bifuncional responsável pela citoaderência, bem como pela variação antigênica (Baruch et al. 1995, 1996, 1997, Gardner et al. 1996, Smith et al. 1998). Essa proteína induz uma resposta humoral (Bull & Marsh 2002) e é codificada pela família multigene *var*, que facilita a ligação de eritrócitos infectados a uma variedade de receptores no endotélio do hospedeiro. Esse fenômeno conduz à obstrução de vasos sanguíneos, contribuindo com a patologia e severidade da doença (Taylor et al. 2002).

No caso da *B. bovis*, o antígeno VESA-1 (antígeno variante de superfície de eritrócitos) é responsável pela cito-aderência de eritrócitos infectados e apresenta polimorfismo entre isolados com rápida variação antigênica. Essa proteína é heterodimérica e inclui duas subunidades individualmente variantes (O'Connor et al. 1997), sendo que a resposta imune bovina parece atingir apenas epitopos conformacionais. Assim, a variabilidade potencial da proteína VESA1 torna-se extremamente elevada (Allred & Al-Khedery 2004).

REFERÊNCIAS

- Ahmed JS 2002. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. *Parasitol Res* 88: S48-S50.
- Aikawa M 1988. Human cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 39: 3-10.
- Aikawa M, Pongponratn E, Tegoshi T, Nakamura K, Nagatake T, Cochrane A, Ozaki LS 1992. A study on the pathogenesis of human cerebral malaria and cerebral babesiosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 67: 297-301.
- Allred DR 1995. Immune evasion by *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: cliff-dwellers of the parasite world. *Parasitol Today* 11: 100-105.
- Allred DR 1998. Antigenic variation in *Babesia bovis*: how similar is it to that in *Plasmodium falciparum*? *Ann Trop Med Parasitol* 92: 461-472.

Allred DR, Ahrens KP 1993. *Babesia bovis*: A non-subjective assay for antigenic modifications of the parasitized erythrocyte surface. *J Parasitol* 79: 274-277.

Allred DR, Al-Khedery B 2004. Antigenic variation and cytoadhesion in *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: different logics achieve the same goal. *Mol Biochem Parasitol* 134: 27-35.

Allred DR, Al-Khedery B 2006. Antigenic variation as an exploitable weakness of babesial parasites. *Vet Parasitol* in press.

Allred DR, Carlton RL, Satcher JA, Long WC, Brown PE, Patterson RM, O'Connor RM, Stroup SE 2000. The *ves* multigene family of *Babesia bovis* encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface. *Mol Cell* 5: 153-162.

Allred DR, Cinque RM, Lane TJ, Ahrens KP 1994. Antigenic variation of parasite-derived antigens on the surface of *Babesia bovis*-infected erythrocytes. *Infect Immun* 89: 91-98.

Allred DR, Hines SA, Ahrens KP 1993. Isolate –specific parasite antigens of the *Babesia bovis* – infecte erythrocytes surface. *Mol Biochem Parasitol* 60: 121-132

Allsopp MT, Cavalier-Smith T, De Waal DY, Allsopp BA 1994. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitol* 108: 147-152.

Alves LC 1987. *Prevalência da babesiose bovina em gado leiteiro no município de Garanhuns, Estado de Pernambuco*. Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 123 pp.

Araújo FR, Madruga CR, Almeida MAO, Leal CRB, Miguita M 1997. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de aglutinação rápida. *Revta Bras Parasitol Vet* 6: 111-115.

Araújo FR, Madruga CR, Leal CRB, Schenk MAM, Kessler RH, Marques APC, Lemaire DC 1998. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* 74: 101-108.

Azambuja C, Gayo V, Solari M, Suarez M, Stoll M 1994. Biotechnology applied to the detection of infectious agents in cattle. Diagnosis of *Babesia bovis* by PCR. *Revta Brás Parasitol Vet* 3: 1-4.

Babes V 1888. *Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf*. Comptes rendus hebdomadaires dès seances de l'Academie des Sciences, Paris. 107: 692-694.

Barci LA, Oliveira MR, Machado RZ, Oliveira DA, Araújo RSF 1995. Epidemiologia da babesiose bovina no Estado de São Paulo: I Estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do Município de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba. *Revta Bras Parasitol Vet* 3: 79-82.

Barros SL, Madruga CL, Araújo FR, Menk CF, Almeida MAO, Melo EPS, Kessler RH 2005. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies

in cattle from the semi-arid region the of satate of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 613-617.

Barry DN, Rodwell BJ, Timms P, McGregor W 1982. A microplate enzyme immunoassay for detecting and measuring antibodies to *Babesia bovis* in cattle serum. *Aust Vet J* 59: 136-140.

Baruch D, Gormley JI, Ma C, Howard RJ, Pasloske BL 1996. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3497-3502.

Baruch D, Ma XC, Singh H, Pasloske B, Howard R 1997. Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. *Blood* 90: 3766-3775.

Baruch DI, Paslosk BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF, Howard RJ 1995. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitised human erythrocytes. *Cell* 82: 77-87.

Beeson JG, Brown GV 2002. Pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria: the roles of parasite adhesion and antigenic variation. *Cell Mol Life Sci* 59: 258-271.

Belak S, Thoren P 2001. Molecular diagnosis of animal disease: some experiences over the past decade. *Expert Rev Mol Diagn* 1: 434-443.

Biggs BA, Gooze L, Wycherley K, Wollish W, Southwell B, Leech JH, Brown GY 1991. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9171-9174.

Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB 2003. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. *J Clin Microbiol* 41: 4172-4177.

Blackman MJ, Bannister LH 2001. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* 117: 11-25.

Blandino T, Alonso M, Barrera M 1994. Detection of antibodies to *Babesia bovis* using an ELISA test. *Arch Med Res* 25: 219-222.

Bock RE, De Vos AJ 2001. Immunity following use of Australia tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust Vet J* 79: 832-839.

Bock RE, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitol* 129: S247-S269.

Boonchit S, Xuan X, Yokoyama N, Goff WL, Wagner G, Igarashi I 2002. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant rhoptry-associated protein 1 antigen aganst *Babesia bovis* for the detection of specific antibodies in cattle. *J Clin Microbiol* 10: 3771-3775.

- Bose R, Jacobson RH, Gale KR, Waltisbuhl DJ, Wright IG 1990. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either native or a recombinant *B. bovis* antigen. *Parasitol Res* 76: 648-652.
- Bose R, Jorgensen WK, Dalglish RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol* 57: 61-74.
- Buffet PA, Gamain B, Scheidig C, Baruch D, Smith JD, et al. 1999. *Plasmodium falciparum* domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2743-2748.
- Bull PC, Marsh K 2002. The role of antibodies to *Plasmodium falciparum*-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria. *Trends Microbiol* 10: 55-58.
- Calder JAM, Reddy L, Chieves CH, Courtney R, Littell JR, Livengood RAI, Norval C, Smith JB, Dame GR 1996. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *J Clin Microbiol* 34: 2748-2755.
- Callow LL, McGavin M 1963. Cerebral babesiosis due to *Babesia Argentina*. *Aust Vet J* 39: 15-21.
- Callow LL 1984. Piropasms. In *Animal Health in Australia, Protozoal and Rickettsial Diseases*, vol. 5, Australian Bureau of Animal Health, AGPS, Canberra. p. 121-160.
- Callow LL, Rogers RJ, De Vos AJ 1993. Tick-borne diseases: cattle-pathology and serology. In *AUSTRALIAN standard diagnostic techniques for animal diseases*, CSIRO Information Services, Corner. p. 1-16.
- Camargo RE, Uzcanga GL, Bubis J 2004. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Vet Parasitol* 123: 67-81.
- Chen BQ, Barragan A, Fernandez V, Sundström A, Schlichtherle M, Sahlén A, Carlson J, Datta S, Wahlgren M 1998. Identification of *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1) as the Rosetting Ligand of the Malaria Parasite *P. falciparum*. *J Exp Med* 187: 15-23.
- Chieves L, Wagner GG, Byers PT, Frerichs WM 1989. Rapid card test for bovine babesiosis. In *National veterinary hemoparasite disease conference*, Proceedings. St. Louis, MI: Veterinary Hemoparasitic Disease Research Workers, St. Louis. p.341-347.
- Conrad PA, Thomford JW, Marsh A, Telford SR, Anderson JF, Spielman A, Sabin EA, Yamane I, Persing DH 1992. Ribosomal DNA probe for differentiation of *Babesia microti* and *B. gibsoni* isolates. *J Clin Microbiol* 30: 1210-1215.
- Craig A, Scherf A 2001. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol* 115: 129-143.

- Crampton AL, Baxter GD, Barker SC 1999. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 377-384.
- Dalgliesh J, Stewart P, Callow L 1978. Transmission of *Babesia bigemina* by transfor of adult male *Boophilus microplus*. *Aust Vet J* 54: 205-206.
- De Vos AJ, Molloy JB, Jorgensen WK 2000. Bovine babesiosis. In *Office International des Epizooties. Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products*, vol. 4. p. 412-422.
- Fabre R, Berry A, Morassin B, Magnaval JF 2004. Comparative assement of conventional PCR with multiplex real-time PCR using SYBR Green I detection for the molecular diagnosis of imported malaria. *Parasitol* 128: 15-21.
- Fajardo FA 1901. A piroplasmose no Rio de Janeiro. *Rev Med SP* 4: 315-319.
- Feagin J E 1994. The extrachromosomal DNAs of apicompiexan parasites. *Ann Rev Microbiol* 48: 81-104.
- Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM 1992. Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol* 30: 2576-2582.
- Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM 1993. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol* 50: 69-81.
- Florin-Christensen J, Suarez CE, Florin-Christensen M, Hines SA, McElwain TF, Palmer GH 2000. Phosphatidylcholine formation is the predominant lipid biosynthetic event in the hemoparasite *Babesia bovis*. *Mol Biochem Parasitol* 106: 147-156.
- Friedhoff KT 1988. Transmission of *Babesia*. In M Ristic, *Babesiosis of domestic animals and man*, Boca Ration, CRC, Florida. p. 23-52.
- Furlong J, Evans D 1991. Epidemiologia do carrapato *Boophilus microplus* no Brasil: Necessidade de uma abordagem compreensível para seu estudo realístico. In *Seminário brasileiro de parasitologia veterinária VLL*. Simpósio sobre moscas do chifre *Haematobia irritans*, São Paulo. p. 48-50.
- Gardner MJ, Feagin JE, Moore DJ, Spencer DF, Gray MW, Williamson DH, Wilson RJM 1991. Organisation and expression of small subunit ribosomal RNA genes encoded by a 35-kilobase circular DNA in *Plasmodium falciparum*. *Mol Bioch Parasitol* 48: 77-88.
- Gardner MJ, Goldman N, Barnett P, Moore PW, Rangachari K, Strath M, Whyte A, WiEiamson DH, Wilson RJM 1994. Phylogenetic analysis of the *rpoB* gene from the plastid-like DNA of *Plasmodium falciparum*. *Mol Bioch Parasitol* 66: 221-231.
- Gardner JP, Pinches RA, Roberts DJ, Newbold CI 1996. Variant antigens and endothelial receptor adhesion in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3503-3507.

Gayo V, Romito M, Nel LH, Solari MA, Viljoen GJ 2003. PCR-based detection of the transovarial transmission of Uruguayan *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* vaccine strains. Onderstepoort. *J Vet Res* 70: 197-204.

Giha HA, Staalsoe T, Dodoo D, Roper C, Satti GMH, Arnot DE, Hviid L, Theander TG 2000. Antibodies to variable *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface antigens are associated with protection from novel malaria infections. *Immunol Lett* 71: 117-126.

Goff W, Barbet A, Stiller D, Palmer D, Knowles D, Kocan K, Gorham J, McGuire TC 1988. Detection of *Anaplasma marginale*-infected tick vectors using cloned DNA probe. *Proceed Nat Acad Sc USA* 85: 919-923.

Goof WL, Johnson WC, Parish SM, Barrington GM, Tuo W, Valdez RA 2001. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunol* 23: 463-471.

Goff WL, Johnson .WC, Horn RH, Barrington GM, Knowles DP 2003. The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunol* 25: 185-188.

Goff WL, Johnson WC, Parish SM, Barrington GM, Elsasser TH, Davis WC, Valdez RA 2002. IL-4 and IL-10 inhibition of IFN-g- and TNF-a-dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. *Vet Immunol Immunopathol* 84: 237-251.

Goff WL, Palmer GH, McElwain TF, Davis WC 1989. Development of ELISA diagnostic test for *Babesia* infections using highly immunogenic specie-specific and strain common surface glycoproteins. In *National veterinary hemoparasite disease conference*, St Louis Proceedings, Veterinary Hemoparasitic Disease Research Workers, St. Louis. p. 353-376.

Goff, W.L., Storset, A.K., Johnson, W.C., Brown, W.C., 2006. Bovine splenic NK cells synthesize IFN-g in response to IL-12 containing supernatants from monocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites in the presence of IL-18. *Parasite Immunol* 28: in press.

Goof WL, Wagner GG, Craig TM 1984. Increased activity of bovine ADCC effector cells during acute *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol* 16: 5-15.

Gozar MM, Bagnara AS 1993. Identification of a *Babesia bovis* gene with homology to the small subunit ribosomal RNA gene from the 35-kilobase circular DNA of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 23: 145-148.

Gozar MM, Bagnara AS 1995. An Organelle-like Small Subunit Ribosomal RNA Gene from *Babesia bovis*: Nucleotide sequence, Secondary Structure of the Transcript and Preliminary Phylogenetic Analysis. *Int J Parasitol* 25: 929-938.

Grisi L, Massard CL, Borja GEM, Pereira JB 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet* 21: 8-10.

Guglielmone AA 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol* 57: 109-120.

Gunderson JH, Sogin ML, Wollett G, Hollingdale M, de la Cruz V, Waters AP, McCutchan TF 1987. Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science* 238: 933-937.

Gupta S 2005. Parasite immune escape: new views into host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 8: 428-440.

Häuserman W, Friedel T, Hess EA, Strong MB 1992. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks In *Proceedings of XIX International Congress of Entomology*, Beijing, China, 138 pp.

Hodgson J 1992. Biology and transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. *Ann N Y Acad Sci* 16: 42-50.

Howard RJ, Rodwell BJ, Smith PM, Callow LL, Mitchell GF 1980. Comparison of the surface proteins and glycoproteins on erythrocytes of calves before and during infection with *Babesia bovis*. *J Protozoology* 27: 241-247.

Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K 2003. Loop- mediated isothermal amplification for direct detection of *Micobacterium tuberculosis* complex, *M. avium* and *M. intracelulare* in seputum sample. *J Clin Microbiol* 41: 2616-2622.

Jacobson RH, Parrodi F, Wright IG, Fitzgerald CJ, Dobson C 1993. *Babesia bovis*: in vitro phagocytosis promoted by immune serum and by antibodies produce against protective antigens. *Parasitol Res* 101: 221-226.

Johnston LAY, Pearson RD, Leatch G 1973. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Babesia argentina* infection in cattle. *Aust Vet J* 49:373-377.

Jones SH, Lew AE, Jorgensen WK, Barker SC 1997. *Babesia bovis*: genome size, number of chromosomes and telomeric probe hybridisation. *Int J Parasitol* 27: 1569-1573.

Kawabuchi T, Tsuji M, Sado A, Matoba Y, Asakawa M, Ishihara C 2005. *Babesia microti*-like parasitesdetected in feral raccoons (*Procyon lotor*) captured in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 67: 825-827.

Kessler RE, Sastre AM, Moreira MA, Madruga CR, Roner MR 1991. Experiencias con vacunas vivas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale centrale* conservadas por congelación en Brasil. *Revta Cub Cienc Vet* 22: 189-196.

Kessler RH, Madruga CR, De Jesus EF, Semprebom DV 1987. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. *Pesq Agropec Bras* 22: 747-752.

Kessler RH, Schenk MAM, Madruga CR, Gomes A 1998. Viability of a method for the isolation of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* to create a strain bank from five physiographical regions of Brazil. *Revta Bras Parasitol Vet* 7: 91-94.

Kessler RH, Schenk MAM 1998. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB): conceito, etiologia, transmissão, epidemiologia, diagnóstico e controle. In RH Kessler, MAM Schenk, *Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos bovinos*, Embrapa, Campo Grande. p. 48-67.

Kessler RH, Madruga CR, Schenk MA, Ribeiro OC 1983. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* em bezerros no Estado do Mato Grosso do Sul. *Pesq Agrop Bras* 18: 931-935.

Kjemtrup AM, Conrad PA 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int J Parasitol* 30: 1323-1337.

Kung'u MW, Goodner BV 1990. A slide enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of *Babesia bovis* infections and for screening of *Babesia* specific monoclonal antibodies. *Int J Parasitol* 20: 341-345.

Kyes S, Horrocks P, Newbold C 2001. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Ann Rev Microbiol* 55: 673-707.

Larlos F 1989. Fisiopatologia de la babesiosis bovina. In GA Morilla, *Immunologia veterinária*, Editorial Diana, México. p. 215-221.

Levine ND 1971. Taxonomy of the piroplasms. *Trans Am Microsc Soc* 90: 2-33.

Lew A, Jorgensen W 2005. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *Afr J Biotechnol* 4: 292-302.

Lignières J 1903. Bovine babesiosis. New investigations and observations on the multiplicity, the evolution and natural transmission on the parasites involved in the disease and on vaccination. *Arch Parasitologie* 7: 398-407.

Lima FVA, Molnar E, Molnar L, Silva CMS, Lima FVA 1999. Seroepidemiological study of bovine babesiosis (*Babesia bovis*) by indirect ELISA test in the State of Para, Brazil. *Rev ciênc agrár* 32: 55-64.

Linhares GFC, Massard CL, Araújo JL de B, Alves LC 1992. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babes, 1888) em bovinos na Região Centro-Oeste do Brasil. *Arq Univ Fed Rur RJ* 15: 85-91.

Linhares GFC, Santana AP, Laueman LH, Madruga CR 2002. Assesment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. *Cienc Anim Bras* 3: 27-32.

- Long EO, Dawid IB 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 49: 727-764.
- Luse SA, Miller LH 1971. *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am J Trop Med Hyg* 20: 655-660.
- Madruga CR, Araújo FR, Marques APC, Carvalho CME, Cusinato FQ, Crocci AJ, Kessler RH, Miguita M 2000. Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. *Pesq Vet Bras* 20: 167-170.
- Maepheson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warell DA 1985. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* 119: 385-401.
- Maguire PA, Prudhomme J, Sherman IW 1991. Alterations in erythrocyte membrane phospholipid organization due to intracellular growth of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitol* 102:179-186.
- Mahoney DF, Mirre GB 1979. A note on the transformation of *Babesia bovis* (Syn. *B. argentina*) by the one host tick *Boophilus microplus*. *Rev Res Vet Sci* 26: 253-254.
- Mahoney DF 1975. The diagnosis of babesiosis in Australia. In EA Wells, *Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis)*, CIAT, Cali. p. 49-62.
- Mahoney DF, Wright I, Mirre G 1973. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. *Ann Trop Med* 67: 197-203.
- Malacco MAF 1998. Tristeza Parasitária Bovina – Babesiose e Anaplasmoses. *Vet News* 5: 8-11.
- McCutchan TF, de la Cruz VF, Lal AA, Gunderson JH, Elwood HJ, Sogin ML 1988. Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 28: 63-68.
- McLaughlin GL, Edlind TD, Ihler GM 1986. Detection of *Babesia bovis* using DNA hybridization. *J Protozool* 33: 125-128.
- Moll GN, Vial HJ, Bevers EM, Ancelin ML, Roelofsen B, Comfurius P 1990. Phospholipid asymmetry in the plasma membrane of malaria infected erythrocytes. *Biochem Cell Biol* 68: 579-85.
- Molloy JB, Bowles PM, Bock RE, Turton JA, Katsande TC, Katende JM, Mabikacheche LG, Waldron SJ, Blight GW, Dalgliesh RJ 1998. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle in Australia and Zimbabwe. *Prev Vet Med* 33: 59-67.
- Montealegre F, Levy MG, Ristic M, James MA 1985. Growth inhibition of *Babesia bovis* in culture by secretions from bovine mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 50: 523-526.
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symp. *Biol* 51: 263-273.

- Nevils MA, Figueroa JV, Turk JR, Canto GJ, Le V, Ellersieck MR, Carson CA 2000. "Cloned lines of *Babesia bovis* differ in their ability to induce cerebral babesiosis in cattle." *Parasitol Res* 86: 437-443.
- Nogueira PA, Wunderlich G, Pereira LHS 2001. Variant antigens of *Plasmodium falciparum* encoded by the var multigenic family are multifunctional macromolecules. *Res Microbiol* 152: 141-147.
- Norimine J, Suarez CE, McElwain TF, Florin-Christensen M, Brown WC 2002. Immunodominant epitopes in *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 that elicit memory CD4(+)-T-lymphocyte responses in *B. bovis*-immune individuals are located in the amino-terminal domain. *Infect and Immun* 70: 2039-2048.
- Notomi T, Okayama H, Masabuchi H, Yonekawa, Watanabe K, Amiono N, Hase T 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl Ac Res* 28: E63.
- O'Connor RM, Lane TJ, Stroup SE, Allred DR 1997. Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. *Mol Biochem Parasitol* 89: 259-270.
- O'Connor RM, Allred DR 2000. Selection of *Babesia bovis* infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms. *J Immunol* 164: 2037-2045.
- O'Connor RM, Long JA, Allred D 1999. Cytoadherence of *Babesia bovis*-infected erythrocytes to bovine brain capillary endothelial cells provides an in vitro model for sequestration. *Infect Immun* 67: 3921.
- Pegram RG, Wilson DD, Hansen JW 2000. Past and present national tick control programs. Why they succeed or fail. *Ann NY Acad Sc* 916: 546-554.
- Perry BD 1996. Epidemiological indicators and their application to the control of tick-borne diseases. In Manual on Tick and Tick-borne Disease Control . FAO, Rome. p. 115-130.
- Poon LLM, Wong BWY, Ma EHT, Chan KH, Chow LMC, Abeyewickreme W, Tangpukdee N, Yen KY, Guan Y, Looareesuwan S, Peiris M 2006. Sensitive and inexpensive molecular test for *Plasmodium falciparum* Malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Cl Chem* 52: 303-306.
- Potgieter FT, Els HJ 1977. The fine structure of intra-erythrocytic stages of *Babesia bigemina*. *Onderst J Vet Res* 44: 157-168.
- Pruett JH 1999. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. *International J Parasitol* 29: 25-32.
- Queiroz PR, Valadares-Inglis MC, Inglis PW 2004. Survival in soil and detection of co-transformed *Trichoderma harzianum* by nested PCR. *Pesq Agrop Bras* 39: 403-405.

Rampersad JN, Cesar E, Campbell MD, Samlal M, Ammons D 2003. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Vet Parasitol* 114: 81-87.

Sacco MAS, Kessler RH, Madruga CR 2001. Cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da Tristeza Parasitária Bovina. *Cienc Rural* 31: 849-855.

Santos TRB, Gonzales JC, Chies JM, Farias NAR 1998. Transmissão transovariana de *Babesia bigemina*, (Smith & Kilborne, 1893) por partenóginas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Rev Bras Parasitol Vet* 7: 7-10.

Singh B 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *Int J Parasitol* 27: 1135-1145.

Smith T, Kilborne FL 1893. Investigations into the nature, causation and prevention of Southern cattle fever. In *Bureau of animal Industry*, U.S. Department of Agriculture, DC (Bulletin, n.1), Washington. p. 177-304.

Smith JD, Craig AG, Kriek N, Hudson-Taylor D, Kyes S, et al. 2000. Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1766-1771.

Smith JD, Kyes S, Craig AG, Fagan T, Hudson-Taylor D, Miller LH 1998. Analysis of adhesive domains from the A4VAR *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 identifies a CD36 binding domain. *Mol Biochem Parasitol* 97: 133-48.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosário VE, Thaithong S, Brown KN 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 61:315-320.

Soares CO, Souza JCP, Madruga CR, Madureira RC, Massard CL, Fonseca AH 2000. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião região Nortefluminense. *Pesq Vet Bras* 20: 75-79.

Spalding SM, Amendoeira MRR, Coelho JMC, Angel SO 2002. Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. *J Bras Patol Med Lab* 38: 105-110.

Spath A 1986. Un estudio epidemiológico de babesiosis y anaplasmosis bovina en el Valle de Lerma, provincia de Salta. *Revue Méd Vét* 67: 274-281.

Storset AK, Kulberg S, Berg I, Boysen P, Hope JC, Dissen E 2004. NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *Eur J Immunol* 34: 669-676.

Taylor HM, Grainger M, Holder AA 2002. Variation in the expression of a *Plasmodium falciparum* protein family implicated in erythrocyte invasion. *Infect Immun* 70: 5779-5789.

Todorovic RA, Kuttler KL 1974. A babesiosis card agglutination test. *Am J Vet Res* 35: 1347-1350.

Vidotto O, Andrade GM, Amaral CHS, Barbosa CS, Freire RL, Rocha MA, Vidotto MC 1997. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. *Arq Bras Med Vet Zootec* 49: 655-659.

Waltisbuhl DJ, Goodger BV, Wright JG, Commings MA, Mahoney DF 1987. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitol Res* 73: 126-131.

Williams JGK, Kubelik A, Livak K, Rafalsky JA, Tingery SV 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531-6535.

Wright IG 1972. An electron microscopic study of intravascular agglutination in the cerebral cortex due to *Babesia Argentina* infection. *Int J Parasitol* 2: 209-215.

Wright IG, Goodger BV, Clark IA 1988. Immunopathophysiology of *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum* infections. *Parasitol Today* 4: 214-218.

Wright IG, Kerr JD 1974. The preferential invasion of young erythrocytes in acute *Babesia bigemina* infections of splenectomised calves. *Z Parasitenkd* 43: 63-69.

Avaliação e otimização de Reações da Polimerase em Cadeia para diagnóstico molecular e estudo epidemiológico de *Babesia bovis*

Evaluation and optimization of Reactions of Polymerase in Chain for molecular diagnosis and epidemic study of *Babesia bovis*

Babesia bovis é um hemoprotosoário que causa doença caracterizada por febre, fraqueza, ataxia, hemoglobinúria e anemia, provocando assim, grandes perdas econômicas na bovinocultura. Com a finalidade de um diagnóstico preciso e eficaz, a reação da polimerase em cadeia com os primers GAU3-5'-CTGGTTGATCCTGCCAGTAG-3' e GAU10-5'-GCACGGACGGAGACCGA-3' (PCR-S) (Linhares et al. 2002) e semi-nested SNPCR que utilizou o primer forward GAU9-5'-CTGTCGTACCGTTGGTTGAC-3' e o reverse GAU10 baseados no gene SSrRNA, foram avaliadas juntamente com a PCR-Ves3 que utilizou primers Ves3F-5'-TGCCTCTGGGTTACGGGATGAAGT-3' e Ves3R-5'-CAGGGGAGCCGTATGTCGTATTG-3' da sequência do gene ves1 α de *Babesia bovis*. Na determinação da prevalência de animais de duas regiões de estabilidade enzoótica (CO e S) a PCR-Gau3/10, SNPCR-Gau9/10 e PCR-Ves3 apresentaram 78% , 91% e 50,6% de positivos respectivamente, além de estatisticamente apresentarem diferenças significativas entre elas, e no modelo experimental, a SNPCR-Gau9/10 confirmou elevada sensibilidade (59%). Todos os animais avaliados aos sete dias de idade foram positivos na SNPCR-Gau9/10, sugerindo que há uma elevada taxa de infecção nos primeiros dias de vida e que possivelmente também ocorra transmissão vertical da *B. bovis* no sistema de criação do rebanho estudado. Portanto, os resultados demonstram que a SNPCR-Gau9/10 é apropriada para estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: *Babesia bovis* – PCR – ves1-alpha – SSrRNA – diagnóstico

Babesia bovis is a hemoprotosoário that causes disease characterized by fever, weakness, ataxia, hemoglobinúria and anemia, provoking like this, great economical losses in the bovinocultura. With the purpose of a necessary and effective diagnosis, the reaction of the polimerase in chain with the primers GAU3-5'-CTGGTTGATCCTGCCAGTAG-3' and GAU10-5'-GCACGGACGGAGACCGA-3' (PCR-S) (Linhares et al. 2002) and semi-nested SNPCR that used the primer forward GAU9-5'-CTGTCGTACCGTTGGTTGAC-3' and the

reverse GAU10 based on the gene SSrRNA, they were appraised together with PCR-Ves3 that used primers Ves3F-5'-TGCTCTGGGTACGGGATGAAGT-3' and Ves3R-5'-CAGGGGAGCCGTATGTCGTATTG-3' of the sequence of the gene *ves1* of *Babesia bovis*. In the determination of the prevalence of animals of two areas of stability enzoótica (CO and S) PCR-Gau3/10, SNPCR-Gau9/10 and PCR-Ves3 presented 78%, 91% and 50,6% of positive respectively, besides estatisticamente they present significant differences among them, and in the experimental model, SNPCR-Gau9/10 confirmed high sensibility (59%). All the appraised animals to the seven days of age were positive in SNPCR-Gau9/10, suggesting that there is a high infection tax in the first days of life and that possibly also happens vertical transmission of the *B. bovis* in the system of creation of the studied flock. Therefore, the results demostram that SNPCR-Gau9/10 is adapted for epidemic studies.

Key-Words: *Babesia bovis* – PCR – *ves1-alpha* – SSrRNA – diagnosis

Babesia bovis é um pequeno babesídeo dos bovinos que é transmitido por larvas do carrapato *Boophilus microplus* e que juntamente com *Babesia bigemina* e a riquetsia *Anaplasma marginale* causam a Tristeza Parasitária Bovina. A infecção por *B. bovis* no bovino susceptível, induz doença clínica severa caracterizada por febre, anemia, distúrbios circulatórios, distúrbios neurológicos e, frequentemente, morte (Wright et al. 1979).

O Brasil apresenta grande diversidade climática e topográfica, o que resulta em variadas situações epidemiológicas da *Babesia* spp. Embora a maioria do território brasileiro seja caracterizada por área de estabilidade endêmica, existem regiões com instabilidade enzoótica, devido a períodos prolongados de ausência ou reduzida precipitação pluviométrica, como no polígono da seca, no Nordeste do país (Barros et al. 2005) ou no extremo sul do Brasil decorrente das baixas temperaturas e localização geográfica (Leite et al. 1989). A introdução de animais livres de *Babesia* em áreas endêmicas, bem como a redução e o controle da população de carrapatos, seja por condições climáticas, tratamento com produtos químicos ou por vacinações, propiciam o aparecimento da doença (Madruga et al. 1983, Rodríguez et al. 1995). Essa enfermidade apresenta uma morbidade que ocasiona perdas na produção de carne e leite, além de altas mortalidades (McCosker 1981). Por essas razões, em países de clima tropical e subtropical, como o Brasil, a babesiose constitui fator limitante para o desenvolvimento da pecuária (Araújo et al. 1998).

A anamnese e a avaliação clínica da sintomatologia são essências para o diagnóstico presuntivo, contudo, os testes laboratoriais são importantes para a confirmação do agente etiológico da infecção (Mahoney & Mirre 1979). O diagnóstico parasitológico por meio de distensão sanguínea apresenta alta sensibilidade e especificidade na fase aguda da infecção, entretanto, tem baixa sensibilidade no período pré-patente e na fase crônica, devido à baixa parasitemia. Em estudos epidemiológicos diversas provas sorológicas para detecção de anticorpos têm sido bastante utilizadas, principalmente o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) que é a prova que confere melhores resultados por ser mais sensível e específica (Araújo et al. 1998, Madruga et al. 2000).

Nos últimos anos, foram desenvolvidas provas moleculares utilizando sondas de DNA, que aumentaram a sensibilidade do diagnóstico da *B. bovis* (Cowman et al. 1984, Dalrymple 1990, Jasmer et al. 1990). Entretanto, o advento da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), possibilitou um incremento considerável na sensibilidade, porque tornou possível detectar parasitemias da ordem de 10^{-6} a 10^{-9} , que é uma sensibilidade 100 vezes maior que o exame parasitológico do esfregaço de sangue corado com Giemsa May-Grunwald. Além disso, a PCR tem sido eficiente para detectar polimorfismo genético entre populações e subpopulações de organismos apicomplexos, inclusive os do gênero *Babesia*, em diferentes regiões fisiográficas. Através dessa técnica, utilizando os *primers* Bv80 e BvVA1, foi possível caracterizar diversidade genética entre diferentes isolados de *B. bovis* na Austrália (Dalrymple et al. 1992, Lew et al. 1997). *B. bovis* e *Plasmodium spp* também foram caracterizados distintos em diferentes isolados geográficos (Perrin et al. 1985, Palmer et al. 1991, Suarez et al. 1991). No Brasil, um estudo de epidemiologia molecular foi realizado com isolados de *B. bigemina* das cinco regiões fisiográficas do país, onde os isolados do Nordeste e Centro-Oeste demonstraram maior diversidade genética, enquanto que os isolados do Sudeste e Sul foram os mais próximos (Madruga et al. 2002). Enfim, os marcadores moleculares têm sido bastante utilizados no estudo da análise da variabilidade genética entre e dentro de populações (Blott et al. 1999), demonstrando polimorfismo entre isolados de *B. bovis* (Cowman et al. 1984, Dalrymple 1990, Jasmer et al. 1990).

Por esses motivos, métodos de diagnóstico precisos, sensíveis e específicos, tanto para a fase aguda, como crônica da doença, são essenciais para a determinação do diagnóstico etiológico e epidemiológico e estabelecimento de medidas racionais para o controle dessa doença.

A escolha dos genes para seleção dos *primers* empregados nesse trabalho, está fundamentada no fato de que a PCR com *primers* baseados nas seqüências do gene *SSrRNA* da sub-unidade ribossomal demonstrou uma alta sensibilidade e especificidade ao analisarem sangue de bovinos com parasitemia de *B. bovis* em animais de várias regiões do Brasil (Linhares et al. 2002), assim como já tem sido demonstrado para vários hemoprotozoários (Kimura et al. 1997, Rubio et al. 1999, Sehgal et al. 2001). Além disso, o desenvolvimento de PCR *semi-nested* utilizando *primers* desse gene poderia aumentar ainda mais a sensibilidade da mesma (Ano et al. 2001, Rampersad et al. 2003). O gene *ves-1 α* foi escolhido pelo fato que o mesmo está presente em pelo menos três dos quatro cromossomos do genoma de *B. bovis* (Jones et al. 1997). A identificação de polimorfismo genético entre isolados brasileiros pode ser relevante, pois esse gene codifica uma proteína denominada VESA-1 (antígeno variante de superfície de eritrócitos) (Allred et al. 1993) que foi associada a citoadesão dos eritrócitos infectados pela *B. bovis* ao endotélio de órgãos centrais, principalmente do cérebro, causando a babesiose cerebral (O'Connor et al. 1997, Callow & McGavin 1963). Portanto, essa proteína constitui-se num candidato potencial para a produção de uma vacina, e por essa razão, a determinação do polimorfismo entre populações e subpopulações é relevante.

O objetivo desse trabalho foi de desenvolver uma PCR com elevada sensibilidade quando aplicada a estudos epidemiológicos, utilizando a PCR *semi-nested* pelo fato desta apresentar sensibilidade maior que a PCR padrão (Ano et al. 2001, Rampersad et al. 2003).

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção de oligonucleotídeos iniciadores - Um par de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específico foi construído a partir do gene *vesI-a* de *B. bovis* (Genbank, acesso nº AF 173158), isolado do México, linhagem MO7. Para isso, foi utilizado o software Lasergene DNA star e o programa Primer Select 3.1. Esses oligonucleotídeos iniciadores foram os seguintes: Ves3F - 5'-TGCTCTGGGTTACGGGATGAAGT-3' e Ves3R - 5'-CCAGGGGAGCCGTATGTCG TA TTG-3'.

Foram utilizados também, oligonucleotídeos iniciadores das seqüências do gene *SSrRNA* de *B. bovis* (GenBank U06105) descritos por Linhares et al. (2002), para avaliação da eficiência dos mesmos para o diagnóstico etiológico e epidemiológico. Os oligonucleotídeos iniciadores de escolha foram: GAU3 - 5'-CTGGTTGATCCTGCCAGTAG-3' como forward e GAU10 - 5'-CGCACGGACGGA GACCGA-3' reverse. Uma PCR *semi-nested* que utilizou os oligonucleotídeos iniciadores GAU9 - 5'- CTGTCGTACCGTTGGTTGAC-3' como forward e, GAU10 como reverse foi também avaliada.

Extração de DNA - A extração de DNA genômico foi realizada com o Kit Easy DNA[®] (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante. Além disso, todas as amostras foram submetidas a eletroforese para verificação da presença ou não de DNA e verificação de sua qualidade para a realização de um PCR.

Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) - A PCR com os primers GAU3 e GAU10 (PCR-GAU3/10), foi executada basicamente de acordo com a descrição de Linhares *et al.* (2002). Resumidamente, a reação foi em um volume de 25 µL, onde utilizou-se Tampão 10x contendo 50 mM de KCl, 1,5 mM MgCl₂ e 10 mM Tris-HCl (Amersham Pharmacia Biotech[®]); 200 µM de dNTP (Life Technologies[®]); 20 µM de cada primer (Alpha DNA); 1.25 U de Taq DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech[®]) e 1 µL de DNA genômico. As demais PCRs foram otimizadas após teste de várias concentrações dos reagentes. A reação *semi-nested* (SNPCR-Gau 9/10) foi realizada também num volume total de 25 µL, utilizando Tampão 5x Colorless GoTaq[™] (Promega[®]), 200 µM de dNTPs (Deoxinucleotídeo trifosfato-Promega [®]) e cada *primer* (Alpha DNA) a 20 µM, 1.5U de Taq DNA polimerase (Cenbiot^{Enzimas}) e 1 µL de DNA. A PCR-ves3 utilizou as mesmas concentrações de reagentes e volume de DNA da PCR-Gau3/10, exceto os primers (XX IDT-Integrated DNA Technologies) que foram 40 ng cada. A programação do termociclador para a SNPCR-Gau 9/10 foi executada da seguinte forma: um ciclo de 1 minuto a 94°C, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos. A PCR-Ves3 foi submetida a um ciclo de 94°C por 2 minutos, e posteriormente 30 ciclos de 94°C, 1 minuto, 59°C por 1 minuto e 30 segundos, e 72°C por 2 minutos. Adicionalmente foi realizada uma extensão a 72°C por 5 minutos.

Os produtos das PCRs foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% submerso em tampão acetato EDTA (TAE), juntamente com o marcador de massa

molecular 1Kb DNA Ladder (Promega®). Na corrida eletroforética foi utilizado um aparato horizontal (Amersham Pharmacia Biotech). Posteriormente, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), sendo que a visualização do resultado foi feita em transiluminador (Spectroline Model TL-312A). A fotodocumentação dos resultados obtidos foi realizada no programa Alpha-DigiDoc (Alpha Innotec, US).

Avaliação da sensibilidade das reações da polimerase em cadeia (PCRs)

Deteção de B. bovis em infecção experimental - Um bezerro anelorado com três meses de idade criado na área de isolamento da Embrapa Gado de Corte foi esplenectomizado, imunossuprimido diariamente com dexametazona em concentrações crescentes (2mg, 4mg, 8mg, 16mg, 32mg) e posteriormente nas mesmas concentrações de forma decrescente. Esse animal foi inoculado com 2×10^8 organismos de *B. bovis* isolado Centro-Oeste por via subcutânea. A seguir, foram realizadas colheitas de sangue diariamente para extração de DNA e confecção de esfregaços sanguíneos a partir de sangue obtido da orelha que foram corados com Giemsa May-Grünwald. O período de colheita foi desde a inoculação até 14 dias após o desaparecimento da parasitemia de acordo com os resultados do esfregaço sanguíneo, totalizando vinte e três dias de acompanhamento clínico-laboratorial do animal.

Avaliação das PCRs em estudos epidemiológicos

Estabilidade enzoótica - Setenta e sete bovinos de regiões com presença do carrapato *Boophilus microplus* foram submetidos à provas moleculares. Quarenta amostras de sangue foram de bezerros desmamados da raça Nelore (cerca de oito meses de idade) da Embrapa Gado de Corte Campo Grande - Mato Grosso do Sul, que tinham um manejo de criação extensiva. Trinta e sete amostras foram de animais da região sul do Brasil (Capão do Leão – Rio Grande do Sul), sendo vinte e duas vacas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) e quinze bezerros de sete dias de idade nascidos destas vacas inseminadas com sêmen de bovino da raça Braford.

Área livre - Trinta e quatro amostras de sangue de bovinos do Uruguai (Município de Rivera), sendo dezessete vacas e dezessete bezerros também foram avaliadas nas PCRs. Nessa região os animais foram submetidos a banhos por aspersão com Amitraz a cada 21 dias e havia também o uso de endectocidas. O pastoreio era rotativo e infestações por *B. microplus* não foram observadas, assim como não houve relato de Tristeza Parasitária Bovina.

Avaliação da PCR-Ves3 para estudo de epidemiologia molecular - Os DNAs de isolados de *B. bovis* das cinco regiões fisiográficas do Brasil (Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste) com parasitemias de 0,2%; 0,1%; 3,4%; 0,5% e 0,5% respectivamente, foram analisados através da PCR-Ves3 com a finalidade de averiguar polimorfismo entre isolados de *B. bovis*, utilizando um gel de poliacrilamida 10% corado com sais de prata utilizando o kit DNA Silver Staining kit – Plus One™ (Amersham Biosciences).

Análise estatística – Os dados obtidos através das PCRs realizadas, foram analisadas por um teste exato para dados categóricos (Cox & Snel 1989). Em função da correlação entre os resultados do sangue coletado em uma mesma data, optou-se por testar a equivalência entre os testes com base apenas nos dados que apresentaram discrepâncias em uma mesma data. Foram feitas comparações dos testes dois a dois, sendo assumida uma distribuição Binomial com parâmetro N igual ao número de dias com resultados discrepantes e p igual a 0,5 para o número de ocorrências em favor do teste mais positivo. O valor de p foi calculado multiplicando o resultado obtido por dois, em função do teste ser bilateral.

RESULTADOS

A PCR-Gau 3/10 produziu amplicon de 1212 pares de bases, enquanto que a SNPCR-Gau 9/10 e PCR-Ves3 produziram amplicons de 541 pb e 700 pb, respectivamente (Fig. 1).

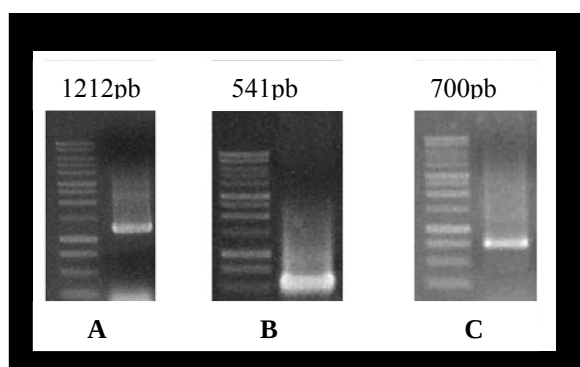


Fig. 1: Amplicons de Reações da Polimerase em Cadeia (PCR) para o diagnóstico de *Babesia bovis*. A: PCR com iniciadores baseados no gene SSrRNA (PCR-Gau3/10); B: PCR semi-nested com iniciadores baseados no gene SSrRNA (SNPCR-Gau9/10); C: PCR baseados no gene *ves-1α* (PCR-Ves3).

As sensibilidades das três reações da polimerase em cadeia e do exame parasitológico com relação ao bezerro experimentalmente infectado podem ser observadas na Tabela I.

TABELA I

Resultados das reações da polimerase em cadeia, PCR-Gau3/10, SNPCR-Gau9/10 e PCR-Ves3 e do exame parasitológico de esfregaço sanguíneo do bovino inoculado experimentalmente com 2×10^8 organismos de *Babesia bovis*,

Infecção Experimental	Reação da Polimerase em Cadeia			Exame parasitológico
Identificação numérica das reações	1	2	3	4
Dias Pós-inoculação	PCR-Gau 3/10	SNPCR-Gau 9/10	PCR-Ves3	Parasitemia (%)
0	-	-	-	-
2	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	+	+	-	$\leq 0,001$
9	+	+	-	$\leq 0,001$
10	+	+	-	$\leq 0,001$
11	+	+	-	-
12	+	+	-	-
13	+	+	-	-
14	+	+	-	-
15	-	+	-	-
17	-	+	-	-
19	-	+	-	-
20	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
Total de positivos	7	10	0	3

Estatisticamente, o resultado da infecção experimental foi o seguinte: A reação 1 foi significativamente superior a 3 ($p = 0,0156$) e não diferiu de 4 ($p = 0,125$). A reação 2 foi significativamente superior a 3 e a 4 ($p = 0,0020$ e $0,0156$ respectivamente) e não diferiu da 1 ($p = 0,25$). A reação 4 não diferiu da 3 ($p = 0,25$).

No estudo de prevalência de *B. bovis* a SNPCR-Gau9/10 detectou um número de bovinos portadores significativamente maior ($p \leq 0,0001$) nas áreas de estabilidade enzoótica das regiões Centro-Oeste e Sul (Fig. 2 e 3) e estatisticamente as três reações tiveram diferenças significativas entre si.

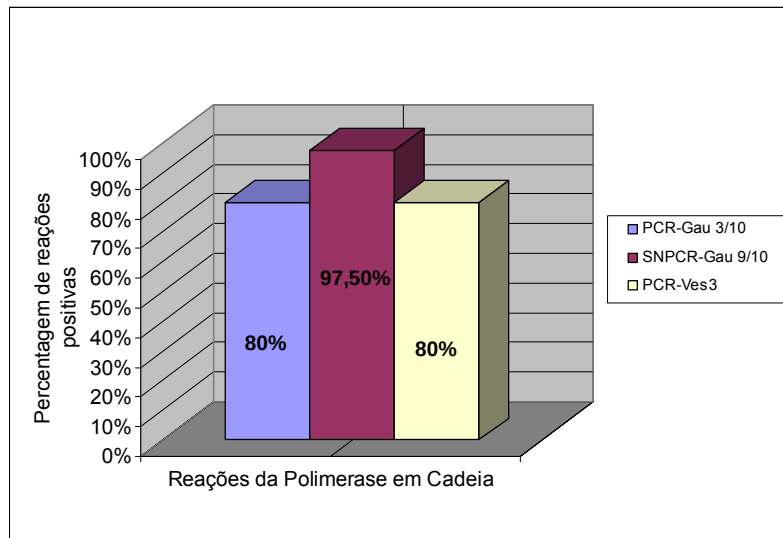


Figura 2. Percentagem de amostras positivas nas reações da polimerase em cadeia, PCR-Gau3/10, SNPCR-Gau9/10 e PCR-Ves3 em animais da região enzoótica do Centro-Oeste, Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

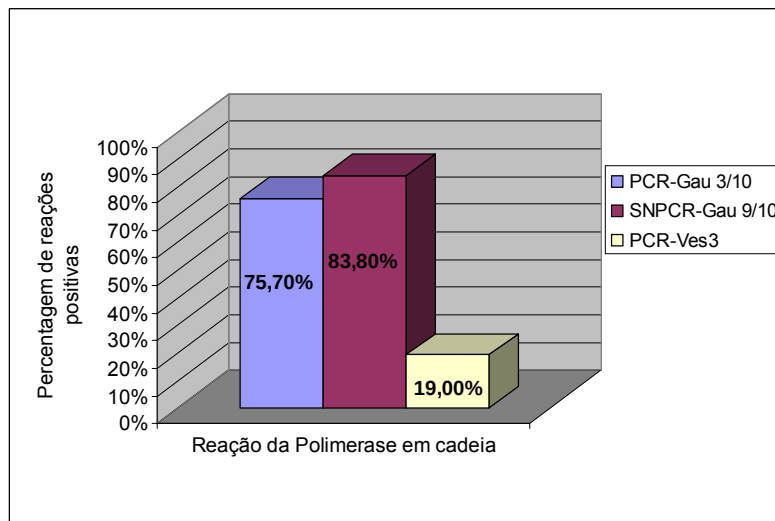


Figura 3. Percentagem de amostras positivas nas reações da polimerase em cadeia, PCR-Gau3/10, SNPCR-Gau9/10 e PCR-Ves3 em animais da região enzoótica do extremo Sul (Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil).

No estudo de prevalência da região Centro-Oeste, dentre os quarenta animais, que constituíram a amostragem, 39 foram constatados positivos na SNPCR-Gau9/10, enquanto que na PCR-Gau3/10, 32 animais foram positivos. A PCR-Ves3 também detectou 32 animais positivos. Na região Sul, das 22 vacas submetidas ao estudo de prevalência, 13 foram positivas na PCR-Gau 3/10, 16 na SNPCR-Gau 9/10 e sete na PCR-Ves3. Todos os 15 bezerros foram positivos tanto na PCR-Gau 3/10 quanto na SNPCR-Gau 9/10. Na PCR-Ves3

não foi detectada nenhuma reação positiva. A percentagem total de reações positivas dessa região enzoótica nas três PCRs pode ser verificada na Fig. 2 e 3.

A maior sensibilidade da SNPCR-Gau 9/10 pode ser verificada na figura 4.



Fig. 4: Reações da Polimerase em Cadeia para diagnóstico de *Babesia bovis* com primers do gene *SSrRNA* PCR-Gau 3/10 (A) e SNPCR-Gau 9/10 (B) em amostras de DNA de sangue bovinos das regiões enzoóticas do Brasil. Colunas 1 – 10 amostras testadas, coluna 11 controle positivo, coluna 12 controle negativo.

Na área livre de carrapato os trinta e quatro animais apresentaram reações negativas nas três PCRs.

A PCR-Ves3 com DNA de cinco isolados brasileiros de *B. bovis* apresentou todos amplicons com 700 pb (Fig. 5).

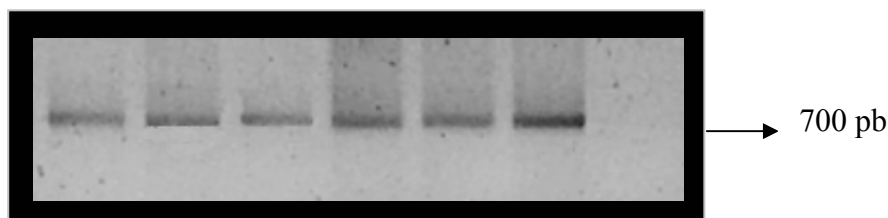


Fig. 5: Gel de poliacrilamida: Reações da Polimerase em Cadeia baseadas nos primers desenhados a partir do gene *ves1-α* (PCR-Ves3) de cinco isolados brasileiros. Coluna 1: isolado região Norte, coluna 2: isolado região Nordeste, coluna 3: isolado região Sudeste, coluna 4: isolado região Centro-Oeste, coluna 5: isolado região Sul, coluna 6: controle positivo, coluna 7: controle negativo..

DISCUSSÃO

PCR com *primers* desenhados na sequência do gene *SSrRNA* tem sido utilizada no diagnóstico de parasitos de diversos gêneros como *Trypanossoma* (Noyes et al. 1999) *Plasmodium* (Di Santi et al. 2004), *Cryptosporidium* (Chalmers & Grinberg 2005) e *Theileria* (Gubbels et al. 1999). Isso porque esse gene possibilita desenvolver testes com elevada sensibilidade como foi verificado nesse trabalho com PCR-Gau3/10 e SNPCR-Gau9/10. Anteriormente, para o diagnóstico de *B. bovis* foram desenvolvidas PCRs com primers desenhados no gene *SSrRNA* que apresentaram bom desempenho como diagnóstico (Gozar &

Bagnara 1993), inclusive detectando parasitemias de 10^{-7} a $10^{-8}\%$ (Calder et al. 1996) que são consideravelmente mais baixas que aquelas detectadas pelo exame parasitológico. A prevalência significativamente superior da SNPCR-Gau9/10 (91,0%) com relação a PCR *standard* PCR-Gau 3/10, indica a maior sensibilidade da primeira PCR. Esse resultado é esperado, pois as PCRs *nested* e *semi-nested* apresentam sensibilidade e especificidade superiores quando comparadas com a PCR *standard* (Birkenheuer et al. 2003, Rampersad et al. 2003, Queiroz et al. 2004).

A prevalência encontrada pela SNPCR-Gau9/10 nas duas regiões de estabilidade enzoótica apresenta melhor concordância com a situação epidemiológica em que o carrapato *Boophilus microplus* está presente e não há controle intensivo do mesmo. As prevalências nessas regiões normalmente estão acima de 90,0 % como foram identificadas por estudos soro-epidemiológicos em vários estados brasileiros onde *B. bovis* ocorre endemicamente. Na região Sudeste, estado do Rio de Janeiro ocorreram 91,0% de bovinos sororeagentes no teste de imunofluorescência indireta (Soares et al. 2000), no Centro-Oeste, microregião de Goiânia 98,9% foram positivos no teste de imunoabsorção enzimática com antígeno bruto (Santos et al. 2001) e 95,5% na região nordeste, estado da Bahia, município de Euclides da Cunha (Barros et al. 2005). Com base nesses resultados podemos concluir que a SNPCR-Gau9/10 é apropriada para estudos de prevalência no Brasil.

A maior sensibilidade da PCR *semi-nested* (SNPCR-Gau9/10) com relação as demais PCRs avaliadas também foi confirmada no modelo de infecção experimental. Como já havia sido verificado anteriormente, as PCRs com *primers* baseados na sequência do gene *SSrRNA* (Figuerola et al. 1992, Calder et al. 1996, Noyes et al. 1999) apresentaram sensibilidade significativamente superior ao esfregaço de sangue corado com May-Grünwald-Giemsa. Apesar do nível de parasitemia ter sido bastante baixo nesse experimento ($\leq 0,001\%$), esses dados comprovam o trabalho realizado por Gayo et al. (2003). No trabalho realizado por esses autores, foi possível detectar organismos de *Babesia* a partir do quinto dia pós-infecção, enquanto que no esfregaço sanguíneo foi apenas após o 11º dia. Foi demonstrado também que organismos de *B. bovis* podem ser detectados após três meses da inoculação quando submetidos a PCR mas não por microscopia onde os resultados positivos foram detectados apenas até o 14º dia pós-infecção. Além disso, a vantagem da sensibilidade da PCR *semi-nested* pode ser constatada pelo trabalho de Rampersad et al. (2003) que em estudo comparativo entre esfregaço de sangue, PCR *standard* e PCR *nested* detectou dez animais positivos para *Babesia equi* no exame parasitológico, 16 na primeira PCR e 36 na segunda PCR num total de 105 cavalos.

Considerando que mesmo na fase aguda de *B. bovis* a parasitemia tende a apresentar-se baixa, a sensibilidade do exame de esfregaço sanguíneo pode ser diminuída (Mahoney et al. 1973) e o mesmo pode ocorrer em algumas imunizações com a vacina viva atenuada. Entretanto, as PCRs são apropriadas não somente para o diagnóstico como também para determinar a infectividade destes imunógenos vivos atenuados. A PCR-Ves3 apresentou resultado inferior com relação as outras PCRs, não produzindo nenhuma reação positiva no animal infectado experimentalmente e tendo inclusive desempenho igual ao exame parasitológico. Esse desempenho foi surpreendente, porque esse gene está presente em pelo menos três dos quatro cromossomos que compõe o genoma desse parasita (Jones et al. 1997), o que seria um fator para aumentar a sensibilidade. Adicionalmente, a PCR-Ves3 apresentou reação positiva com DNA dos isolados das cinco regiões fisiográficas do Brasil. Portanto, a aplicação da PCR-Ves3 se reduziria unicamente ao estudo de polimorfismo do gene *ves1 α* , entre isolados de *B. bovis*, o que estaria relacionado ao diagnóstico de epidemiologia molecular. Mesmo assim, a PCR-Ves3 não apresentou polimorfismo de tamanho, demonstrando *amplicons* de 700 pb nos isolados de *B. bovis* das cinco regiões fisiográficas do Brasil. Entretanto, uma análise de sequenciamento dos amplicons dos diferentes isolados poderá definir a utilidade dos mesmos em estudos de epidemiologia molecular. Essa constatação indica que nem todas as PCRs tem sensibilidade maior que o exame parasitológico como foi verificado nesse trabalho e por diversos autores (Azambuja et al. 1994, Gubbels et al. 1999, Ruef et al. 2000).

Considerando que poderia haver um polimorfismo do gene *ves1- α* durante a infecção no hospedeiro que permitiria alterações antigênicas da proteína VESA-1 resultando em mecanismo de evasão imunológica de *B. bovis* incluindo citoaderência ao endotélio dos vasos da microcirculação sanguínea (O'Conner & Allred 2000) à semelhança que ocorre na infecção por *P. falciparum* em humanos (Biggs et al. 1991), alterações genéticas ao acaso, mutações, rearranjos no gene (Florin-Christensen et al. 2002), poderiam ser os responsáveis pela baixa sensibilidade do teste.

Bezerros nascidos em áreas endêmicas podem ser infestados com larvas de *B. microplus* no primeiro dia de vida, portanto tem a probabilidade de se infectarem com *B. bovis* que é transmitida por esse estágio do carrapato (Rieck 1966). Essa ocorrência é maior em bovinos de origem européia segundo Guglielmone et al. (1989), a percentagem de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* infectados com *Babesia* spp. varia de 0 a 5% em *Bos indicus* e em *Bos taurus* a presença dessas fêmeas varia de 18 a 40%. Além disso, num estudo realizado por Rodrigues et al. (2005), de 20 animais que apresentaram babesiose cerebral

confirmado por exames de esfregaços do córtex corados por panótico rápido, 65% eram de raças européia e 25% de animais mestiços, indicando assim a maior probabilidade de ocorrência da babesiose na raça européia. Entretanto, não há evidência de babesiose, porque os bezerros adquirem, através do colostro imunidade passiva (Hall 1960). Portanto, aos sete dias os bezerros poderiam ser portadores de *B. bovis*, apesar da imunidade mediada pelos anticorpos colostrais.

O fato de ter sido detectada 100% das reações positivas em animais de uma semana de vida há a possibilidade que tenha ocorrido em uma parcela destes animais, a transmissão congênita. Apesar dessa forma de transmissão da *B. bovis* ser considerada incomum, Trueman & McLennan (1987), relataram um aborto causado por *B. bovis* no oitavo mês de gestação. Segundo esses pesquisadores isso ocorreu devido a fatores nutricionais, após um período prolongado de seca que levou a uma diminuição nos níveis de anticorpos, o que possibilitou a multiplicação do parasita durante a gestação. Casos esporádicos de transmissão congênita têm sido relatados no Brasil. Barbosa et al. (1994) descrevem que um bezerro da raça holandesa foi a óbito minutos após o nascimento. Bracarense et al. (2001) relataram um caso de morte de um bezerro com três dias de idade decorrente de infecção por *B. bovis*. Segundo estes autores, durante a gestação, o estresse e o aumento dos níveis de esteróides podem provocar imunossupressão, favorecendo a ativação de infecções latentes e na presença de qualquer lesão das membranas placentárias poderia ocorrer a transmissão congênita de *Babesia*. Essa transmissão vertical foi também observada por Osaki et al. (2002) em dois bezerros de 14 avaliados na região de Umuarama, no Paraná, utilizando PCR.

A elevada especificidade das PCRs foi demonstrada com os animais criados em áreas livres de carrapato o que favorece o uso dessas técnicas moleculares no diagnóstico, particularmente, a PCR *semi-nested* que apresentou vantagens sobre as demais. As provas moleculares apresentam vantagens sobre as sorológicas. Embora estas últimas sejam de grande valia para estudos epidemiológicos são apropriadas para o conhecimento da distribuição geográfica e permitem estabelecer critérios de áreas endêmicas, epidêmicas e livres (Böse et al. 1995), mas têm limitações devido a probabilidade de reações-cruzadas. Já as provas moleculares, determinam de fato os animais portadores de *B. bovis* ao contrário das provas sorológicas que são métodos de diagnóstico indireto baseados na detecção de anticorpos que no caso desse hemoprotozoário permanece com imunoglobulinas anti-babesia mesmo quando o animal não mais está infectado.

Portanto, SNPCR-Gau9/10 é um teste útil para o diagnóstico etiológico e epidemiológico da *B. bovis* o que favorece o tratamento e o estabelecimento de medidas preventivas.

REFERÊNCIAS

- Allred DR, Hines SA, Ahrens KP 1993. Isolate –specific parasite antigens of the *Babesia bovis* – infecte erythrocytes surface. *Mol Biochem Parasitol* 60: 121-132
- Ano H, Makimura S, Harasawa R 2001. Detection of babesia species from infected dog blood by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci* 63: 111-113.
- Araújo FR, Madruga CR, Leal CRB, Schenk MAM, Kessler RH, Marques APC, Lemaire DC 1998. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* 74: 101-108.
- Azambuja C, Gayo V, Solari M, Suarez M, Stoll M 1994. Biotechnology applied to the detection of infectious agents in cattle. Diagnosis of *Babesia bovis* by PCR. *Rev Bras Parasitol Vet* 3: 1-4.
- Barbosa MFR, Costa JO, Tafuri WL 1994. Transmissão congênita de *Babesia bovis*: relato de um caso autóctone em Minas Gerais – Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 5: 519-26.
- Barros SL, Madruga CL, Araujo FR, Menk CF, Almeida MAO, Melo EPS, Kessler RH 2005. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region the of satate of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 613-617.
- Biggs BA, Gooze L, Wycherley K, Wollish W, Southwell B, Leech JH, Brown GY 1991. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9171-9174.
- Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB 2003. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. *J Clin Microbiol* 41: 4172-4177.
- Blott SC, Williams JL, Haley CS 1999. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82: 613-619.
- Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol* 57: 61-74.
- Bracarense APFL, Vidotto O, Cruz GD 2001. Transmissão congênita de *Babesia bovis*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 53: 479-481.

Calder JAM, Reddy L, Chieves CH, Courtney R, Littell JR, Livengood RAI, Norval C, Smith JB, Dame GR 1996. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *J Clin Microbiol* 34: 2748-2755.

Callow L, McGavin M 1963. Cerebral babesiosis due to *Babesia Argentina*. *Aust Vet J* 39: 15-21.

Chalmers RM, Grinberg A 2005. Significance of *Cryptosporidium parvum* in horses. *Vet Rec* 156: 49-50.

Cowman AF, Bernard O, Stewart N, Remp DJ 1984. Genes of the protozoan parasite *Babesia bovis* that rearrange to produce RNA species with different sequences. *Cell* 37: 653-660.

Cox DR, Snell EJ 1989. *Analysis of binary data*. 2nd ed., Chapman e Hall, London, 236 pp.

Dalrymple BP 1990. Cloning and characterization of the rRNA genes and flanking regions from *Babesia bovis*: use of the genes as strain discriminating probes. *Mol Biochem* 43: 117-124.

Dalrymple BP, Jorgensen WK, de Vos AJ, Wright IG 1992. Analysis of the composition of samples of *Babesia bovis* and the influence of different environmental conditions on genetically distinct subpopulations. *Int J Parasitol* 22: 731-737.

Di Santi SM, Kirchgatter K, Brunialti KC, Oliveira AM, Ferreira SR, Boulos M 2004. PCR-based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. *Rev Inst Med Trop SP* 46: 183-187.

Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM 1992. Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol* 30: 2576-2582.

Gayo V, Romito M, Nel LH, Solari MA, Viljoen GJ 2003. PCR-based detection of the transovarial transmission of Uruguayan *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* vaccine strains. Onderstepoort. *J Vet Res* 70: 197-204.

Gozar MM, Bagnara AS 1993. Identification of a *Babesia bovis* gene with homology to the small subunit ribosomal RNA gene from the 35-kilobase circular DNA of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 23: 145-148.

Gubbels JM, de Vos AP, Van der Weide M, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, Jongejan F 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 37: 1782-1789.

Guglielmone AA, Mangold AJ, Aguirre DH, Rios LG, Olsen AA 1989. Vacunación simultánea con *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* atenuadas, congeladas en nitrógeno líquido com DMSO o glicerol como crioprotectores. *Rev Med Vet* 70: 176-182.

Hall WTK 1960. The immunity of calves to *Babesia argentina* infections. *Aust Vet J* 36: 361-366.

Jasmer DPM, Reduker DW, Goff WL, Stiller D, McGuire TC 1990. DNA probes distinguish geographical isolates and identify a novel DNA molecule of *Babesia bovis*. *J Parasitol* 76: 834-841.

Jones SH, Lew AE, Jorgensen WK, Barker SC 1997. *Babesia bovis*: genome size, number of chromosomes and telomeric probe hybridisation. *Int J Parasitol* 27: 1569-1573.

Kimura M, Kaneko O, Qing L, Mian Z, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K 1997. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Int* 46: 91-95.

Leite AMO, Arnoni J, Silva SS, Farias N, Cruz M, Nishikawa U 1989. Serological study of bovine babesiosis in a marginal area of Brazil. In Veterinary hemoparasites disease research workers, *Proceedings of eighth national Veterinary hemoparasite disease conference*, St. Louis, MO, p. 624-635.

Lew AE, Dalrymple BP, Jeston PJ, Bock RE 1997. PCR methods for the discrimination of *Babesia bovis* isolates. *Vet Parasitol* 71: 223-237.

Linhares GFC, Santana AP, Laueman LH, Madruga CR 2002. Assesment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. *Cienc Anim Bras* 3: 27-32.

Madruga CR, Aycardi E, Putt N 1983. Epidemiologia da anaplasmoze, babesiose em bovinos da região de cerrado do Estado do Mato Grosso do Sul: I - Prevalência. *Arq Bras Med Vet Zootec* 35: 631-640.

Madruga CR, Araújo FR, Marques APC, Carvalho CME, Cusinato FQ, Crocci AJ, Kessler RH, Miguita M 2000. Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. *Pesq Vet Bras* 20: 167-170.

Madruga CL, Leal CRB, Ferreira AMT, Araújo FR, Bonato LV, Kessler RH, Schenk MAM, Soares CO 2002. Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil. *Pesq Vet Bras* 22: 153-160.

Mahoney DF, Wright I, Mirre G 1973. Bovine babesiasis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. *Ann Trop Med* 67: 197-203.

Mahoney DF, Mirre GB 1979. A note on the transformation of *Babesia bovis* (Syn. *B. argentina*) by the one host tick *Boophilus microplus*. *Rev Res Vet Sci* 26: 253-254.

McCosker PJ 1981. The global importance of babesiosis. In M Ristic, JP Kreier, *Babesiosis*, Academic Press, New York. p. 1-24.

Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P 1999. Corrigendum to "A nested PCR for the SSrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma sp.* in wombats and kangaroos in Australia". *Int J Parasitol* 29: 331-339.

O'Connor RM, Lane TJ, Stroup SE, Allred DR 1997. Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. *Mol Biochem Parasitol* 89: 259-270.

O'Connor RM, Allred DR 2000. Selection of *Babesia bovis* infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms. *J Immunol* 164: 2037-2045.

Osaki SC, Vidotto O, Marana ERM, Vidotto MC, Yoshihara E, Pacheco RC, Igarashi M, Minho AP 2002. Ocorrência de Anticorpos Anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça Nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil. *Revta Bras Parasitol Vet* 11: 77-83.

Palmer GH, McElwain TF, Perryman LE, Davis WC, Reducker DR, Jasmer, DP, Shkap V, Pipano E, Goff WL, McGuire TC 1991. Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface-exposed epitopes. *Infect Immun* 59: 3340-3342.

Perrin LH, Merkii B, Gabra MS, Stocker JW, Chizzolini C, Richle R 1985. Immunization with *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen induces a partial immunity in monkeys. *J Clin Invest* 75: 1718-1721.

Queiroz PR, Valadares-Inglis MC, Inglis PW 2004. Survival in soil and detection of co-transformed *Trichoderma harzianum* by nested PCR. *Pesq Agrop Bras* 39: 403-405.

Rampersad JN, Cesar E, Campbell MD, Samlal M, Ammons D 2003. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Vet Parasitol* 114: 81-87.

Rieck RF 1966. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (*Sporozoa: Piroplasmidea*) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J Agric Res* 17: 247-254.

Rodrigues A, Rech RR, Figuera RA, Barros RR, Barros CSL 2005. Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. *Cienc Rural* 35: 121-125.

Rodriguez M, Penichet ML, Mouris AE, Labarta V, Lorenzo L, Rubira R, Cordoves P 1995. Control of *Boophilus microplus* population in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol* 57: 339-349.

Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, Garcia ML, Mico M, Edu M, Alvar J 1999. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 60:183-187.

Ruef B, Ward TJ, Oxner CR, Conley PG, Brown WC, Rice-Ficht AC 2000. Phylogenetic analysis with newly characterized *Babesia bovis* hsp70 and hsp90 provides strong support for paraphyly within the piroplasms. *Mol Biochem Parasitol* 109: 67-72.

Santos HQ, Linhares GFC, Madruga CR 2001. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e ELISA. *Cienc Anim Bras* 2: 133-137.

Sehgal RNM, Jones HI, Smith TB 2001. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Mol Ecology* 10: 2319-2327.

Soares CO, Souza JCP, Madruga CR, Madureira RC, Massard CL, Fonseca AH 2000. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião região Nortefluminense. *Pesq Vet Bras* 20: 75-79.

Suarez CE, McElwain TF, Stephens EB, Mishra VS, Palmer GH 1991. Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other apicomplexa. *Mol Biochem Parasitol* 49: 392-332.

Trueman KF, McLennan MW 1987. Bovine abortion to prenatal *Babesia bovis* infection. *Aust Vet J* 64: 62-63.

Wright IG, Goodger BV, McKenna RV, Mahoney DF 1979. Acute *Babesia* infection: a study of the vascular lesions in kidney and lung. *Z Parasitenkd* 60: 19-27.