

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/03/2020.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Babesia*  
*bovis* EM BOVINOS DE CORTE AMOSTRADOS NO  
PANTANAL SUL MATOGROSSENSE**

**Natalia Serra Mendes  
Bióloga**

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Babesia*  
*bovis* EM BOVINOS DE CORTE AMOSTRADOS NO  
PANTANAL SUL MATOGROSSENSE**

**Natalia Serra Mendes  
Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

**2019**

M538o Mendes, Natalia Serra  
Ocorrência e diversidade genética de Babesia bovis em bovinos de corte amostrados no Pantanal sul matogrossense. / Natalia Serra Mendes. -- Jaboticabal, 2019  
80 p. : il., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: Marcos Rogério André

1. Babesiose bovina. 2. Babesia bovis. 3. Diversidade genética. 4. Pantanal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Babesia bovis* EM BOVINOS DE CORTE AMOSTRADOS NO PANTANAL SUL MATOGROSSENSE

AUTORA: NATALIA SERRA MENDES

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

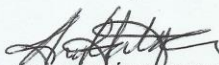
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV-UNESP / Câmpus de Jaboticabal



Profa. Dra. ANA PATRÍCIA YATSUDA NATSUI  
Departamento Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas-FCFRP/USP / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 01 de março de 2019

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**Natalia Serra Mendes** – nascida na cidade de Jaboticabal, São Paulo, em 25 de julho de 1989. Graduada em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, no ano de 2017. Durante a graduação, foi aluna de Iniciação Científica no laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP pelo programa PIBIC/ICSB, trabalhando com pesquisa na área de Parasitologia Veterinária sob a orientação do professor Dr. Marcos R. André. Ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária na FCAV/UNESP em março de 2017 com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **EPÍGRAFE**

"O correr da vida embrulha tudo,  
a vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem".

Fragmento do livro "Grande sertão Veredas" – Guimarães Rosa

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Marcos Rogério André pela orientação concedida durante este estudo e por toda a confiança depositada no meu trabalho desde a Iniciação Científica. Obrigada pelo exemplo diário de trabalho e dedicação na docência e na pesquisa.

À Inalda Angélica de Souza Ramos, por todo trabalho dedicado à colheita das amostras utilizadas neste estudo. Também pela troca diária de conhecimento, amizade e companheirismo no laboratório.

Ao professor Heitor Miraglia Herrera e seus alunos João Bosco Vilela Campos, João Vitor de Almeida Alves e Gabriel Carvalho de Macedo, pelo auxílio na escolha das propriedades e na colheita das amostras.

À Imunodot (Indústria Pesquisa Produtos para Diagnósticos- Jaboticabal) pela parceria no diagnóstico sorológico das amostras.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2015/14896-1) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (2014/401.403.120.16-5) pelos Auxílios à Pesquisa que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Às professoras Rosangela Zacarias Machado, Darci Moraes Barros- Battesti e Ana Patricia Yatsuda Matsui pelas contribuições feitas ao trabalho nas bancas de qualificação e defesa.

À minha amiga Ana Cláudia Calchi. Obrigada pela sua amizade, pelo convívio e troca de experiências no laboratório, mas, sobretudo por sempre me deixar saber que eu tenho com quem contar nos dias difíceis e compartilhar comigo além da bancada, todas as lamentações, angústias e êxitos durante o percurso dos nossos trabalhos desde que nos conhecemos.



Aos amigos Luiz Ricardo Gonçalves e Thiago Merighi da Silva por compartilharem o período de intensa atividade e grandes aprendizados durante o estágio docência no ano passado.

Agradeço a todos os colegas de Laboratório que estão ou estiveram aqui no mesmo tempo que eu pela convivência diária, respeito e troca de experiências. Em especial agradeço à Victória Valente Califre de Mello, minha parceira de seminários durante as disciplinas do mestrado. Obrigada Vick, por você ser essa pessoa tão fácil de conviver e por sempre considerar a minha opinião. Você só deixa luz por onde quer que passe.

À FCAV e os professores do curso de Ciências Biológicas e ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária agradeço pela contribuição na minha formação.

Aos meus maravilhosos amigos Vitor Barbosa Cardoso, Leonardo Sambini Longhini e Carlos Silva Júnior. Sou muito feliz de poder ter compartilhado meu tempo de FCAV com vocês, e muito grata pela amizade franca que vocês me oferecem e de dividirem comigo as mesmas preocupações sociais, políticas e o caminho de pedras que é fazer ciência no Brasil.

Ao meu irmão Joaquim e minha sobrinha Olívia, por garantirem a suavidade e alegria dos poucos momentos que passamos juntos, e por estarem presentes no meu dia a dia, ainda que um pouco distantes.

Por fim, mas desde o início, agradeço à minha mãe Vera, pois, ainda que marcada por uma vida de dificuldades e sem acesso ao ensino formal, nunca deixou de me amparar e incentivar a seguir em frente. Você sempre será meu maior e melhor referencial de força, coragem, trabalho e de “endurecer sem perder a ternura”.

**OBRIGADA!**

## Sumário

Resumo .....	iv
Abstract .....	v
1. Introdução .....	1
2. Revisão de Literatura .....	3
2.1. Histórico e taxonomia .....	3
2.2. Ciclo Biológico.....	4
2.3. Importância da babesiose bovina.....	6
2.4. Prevalência sorológica e molecular de <i>Babesia bovis</i> em bovinos no Brasil... 8	8
2.5. Patogenia, sinais clínicos e achados de necropsia .....	13
2.6. Diagnóstico .....	15
3. Objetivos .....	27
3.1. Objetivo geral .....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. Material e Métodos.....	28
4.1. Autorização da Pesquisa .....	28
4.2. Animais amostrados e área de estudo .....	28
4.3. Colheita das amostras .....	29
4.4. Diagnóstico Sorológico .....	30
4.4.1. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireta (iELISA) para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Babesia bovis</i> e anti- <i>B. bigemina</i> .....	30
4.5. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) .....	31
4.5.1. Extração de DNA das amostras de sangue de bovinos .....	31
4.5.2. Reação de Amplificação para o gene endógeno GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) .....	32
4.5.3. “Nested” PCR para detecção de <i>Babesia bovis</i> baseada no gene <i>sbp-2</i> (“proteína de corpo esférico 2”).....	32
4.6. Eletroforese em gel de agarose.....	34
4.7. Reações de Clonagem e Sequenciamento .....	35
4.7.1. Reação de ligação do produto amplificado com o vetor pGEM-T Easy.....	35
4.7.2. Transformação das células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5α .....	36
4.7.3. Minipreparação do DNA plasmidial (Método da lise alcalina).....	36
4.8. Reação de amplificação do fragmento do DNA plasmidial contendo insertos dos genes <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> .....	37

4.9. Reações de Sequenciamento .....	38
4.9.1. Purificação dos amplicómeros .....	38
4.10. Análise das sequências .....	39
4.10.1. Inferência filogenética .....	39
4.10.2. Análise de identidade entre sequências .....	40
4.10.3. Entropia de aminoácidos.....	40
4.10.4. Diversidade de haplótipos.....	40
5. Resultados .....	42
5.1. Frequência de anticorpos IgG anti- <i>B. bovis</i> e anti- <i>B. bigemina</i> .....	42
5.2. Qualidade das amostras de DNA extraídas – PCR para o gene GAPDH de mamíferos.....	42
5.3. Triagem das amostras a partir de “nested” PCR baseada em um fragmento do gene <i>sbp- 2</i> de <i>Babesia bovis</i> .....	43
5.4. Reações de amplificação para <i>Babesia bovis</i> baseadas no gene <i>msa-2b</i> .....	44
5.5. Reação de amplificação para <i>Babesia bovis</i> baseada no gene <i>msa-2c</i> .....	44
5.6. Análise da identidade das sequências pelo BLASTn .....	45
5.6.1. Análise das sequências de <i>msa-2b</i> .....	45
5.6.2. Análise das sequências de <i>msa-2c</i> .....	46
5.7. Análise filogenética.....	46
5.7.1. Análise Filogenética do gene <i>msa-2b</i> .....	46
5.7.2. Análise Filogenética do gene <i>msa-2c</i> .....	49
5.8. Análise de identidade entre sequências.....	51
5.8.1. Identidade entre sequências de nucleotídeos de <i>msa-2b</i> de <i>Babesia bovis</i> .....	51
5.8.2. Identidade entre sequências de nucleotídeos <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> .....	52
5.8.3. Análise da Entropia de Aminoácidos .....	53
5.8.4. Análise de haplótipos baseada nos genes <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> detectados no Pantanal sul matogrossense .....	54
5.8.5. Análise de haplótipos baseada nos genes <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> detectados no Brasil e no mundo .....	55
6. Discussão.....	59
7. Conclusão .....	66
8. Referências .....	67



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 12375/15 do trabalho de pesquisa intitulado "**Diversidade genética do *Anaplasma marginale* em bovinos amostrados no Pantanal Sul Matogrossense**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Rogério André, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de julho de 2015.

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.

Profª Drª Paola Castro Moraes  
Coordenadora – CEUA

## Ocorrência e diversidade genética de *Babesia bovis* em bovinos de corte amostrados no Pantanal Sul Matogrossense

### Resumo

*Babesia bovis* é um agente etiológico da babesiose bovina, enfermidade transmitida por carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*, que afeta a saúde do gado em regiões tropicais e subtropicais do mundo, causando perdas significativas na produção de carne e leite. O presente trabalho objetivou verificar, por meio de técnicas moleculares, a ocorrência e a diversidade genética de *B. bovis* com base nos genes que codificam antígenos de superfície de merozoíto (MSAs) em uma população de 400 bovinos de corte (*Bos indicus*) da raça Nelore amostrados em propriedades no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, centro-oeste brasileiro. Dezoito (4,5%) bovinos mostraram-se positivos em ensaios de nested PCR para *B. bovis* com base no gene *spherical body protein (sbp-2)*. Destes, 77,7% (14/18) e 66,6% (12/18) mostraram-se positivos para *B. bovis* em ensaios de cPCR baseados nos genes *msa-2b* e *msa-2c*, respectivamente. Análises filogenéticas baseadas no método de Máxima Verossimilhança utilizando 14 sequências de clones de *msa-2b* e 13 sequências de clones de *msa-2c* mostraram uma clara distribuição das sequências detectadas neste estudo em diferentes clados do filograma. Esses achados corroboraram com a análise de diversidade das mesmas sequências, a qual revelou a presença de 14 e 11 haplótipos dos genes *msa-2b* e *msa-2c*, respectivamente. Ainda, as análises de entropia das sequências de aminoácidos MSA-2B e MSA-2C revelaram a presença de 78 e 44 picos de alta entropia, com valores variando entre 0,25 a 1,53 e 0,27 a 1,09 para MSA-2B e MSA-2C, respectivamente. O presente estudo mostrou uma baixa ocorrência molecular de *B. bovis* em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro. Apesar disso, um alto grau de diversidade genética foi encontrado na população de *B. bovis* analisada, com a possível presença de diferentes genótipos coexistentes em um mesmo animal e/ou no mesmo rebanho estudado.

**Palavras-chave:** Babesiose bovina, *Babesia bovis*, diversidade genética, MSA, Pantanal.

## Occurrence and genetic diversity of *Babesia bovis* in beef cattle from Pantanal Sul Matogrossense

### Abstract

*Babesia bovis* is the etiological agent of bovine babesiosis, a disease transmitted by *Rhipicephalus microplus*, which affects cattle herds in tropical and subtropical regions of the world, causing significant economic losses due to decreasing meat and milk yield. This study used molecular techniques to determine the occurrence and genetic diversity of *B. bovis*, based on the genes encoding the merozoite surface antigens (MSAs), in a herd of 400 Nelore (*Bos indicus*) sampled from beef cattle farms in the Pantanal region, in Mato Grosso do Sul, Midwestern Brazil. The results of the nested PCR assays based on the spherical body protein (*sbp-2*) gene indicated that 18 (4.5%) calves were positive for *B. bovis*, of the 18, 77.7% (14/18) were positive for the *B. bovis msa-2b* fragment while 66.6% (12/18) were positive for the *msa-2c* fragment. The phylogenetic analysis based on the Maximum Likelihood method using 14 sequences from *msa-2b* clones and 13 sequences from *msa-2c* clones indicated that the sequences detected in this study are clearly distributed in different cladograms. These findings corroborated the diversity analysis of the same sequences, which revealed the presence of 14 and 11 haplotypes of the *msa-2b* and *msa-2c* genes, respectively. Furthermore, the entropy analyses of the MSA-2B and MSA-2C amino acid sequences revealed 78 and 44 high entropy peaks with values ranging from 0.25 to 1.53 and from 0.27 to 1.09 for MSA -2B and MSA-2C, respectively. Therefore, the results indicate a low molecular occurrence of *B. bovis* in beef cattle sampled in the Brazilian Pantanal. Despite this, a high degree of genetic diversity was found in the analyzed *B. bovis* population, with possibly different genotypes coexisting in the same animal and/or in the same studied herd.

**Keywords:** Bovine babesiosis, *Babesia bovis*, genetic diversity, MSA, Pantanal.

## 1. Introdução

A babesiose bovina, enfermidade transmitida por carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae), é uma hemoparasitose causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Brasil. Tal enfermidade afeta a saúde do gado em regiões tropicais e subtropicais do mundo, causando perdas significativas na produção de carne e leite. No Brasil, é considerada uma enfermidade endêmica, atingindo perdas econômicas anuais de cerca de 3,5 milhões de dólares na produção bovina, principalmente em áreas de instabilidade enzoótica (Trindade et al., 2010; Grisi, 2014). Além da queda de produção, os gastos com tratamentos dos animais afetados clinicamente e com controle do vetor aumentam os prejuízos causados por esta enfermidade, tornando-a um dos fatores limitantes para a melhoria da produtividade da bovinocultura nas áreas tropicais e subtropicais (Rodrigues et al., 2005; Taylor et al., 2010).

No território brasileiro, o Pantanal está localizado nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, ocupando uma área de 140.000 km<sup>2</sup>. A região do Pantanal é considerada um dos maiores sistemas de áreas alagáveis do globo terrestre, sendo reconhecido internacionalmente pela exuberância e riqueza de biodiversidade (Alvarenga, 1980, Junk et al., 2006). Algumas espécies de carrapatos presentes na região compartilham animais selvagens e domésticos como hospedeiros (Bechara et al., 2000; Ramos et al., 2016). A principal atividade econômica da região é a produção extensiva de gado de corte, com um rebanho estimado em quatro milhões de cabeças (Abreu et al., 2008).

Os merozoítos de *B. bovis* apresentam, em sua superfície, ao menos cinco glicoproteínas pertencentes à família de antígenos variáveis de superfície do merozoíto (VMSA), implicados na invasão do hemoparasita ao eritrócito. A família de antígenos variáveis de superfície de merozoítos de *B. bovis* inclui o gene *msa-1* e o locus *msa-2*. Enquanto *msa-1* é um gene de cópia única no genoma, *msa-2* compreende quatro genes dispostos em *tandem*, definidos como *msa-2a1*, *msa-2a2*, *msa-2b* e *msa-2c* (Florin- Christensen et al., 2002). Estes antígenos são altamente imunogênicos e contêm epítomos sensíveis à neutralização, e por esta razão têm sido considerados como candidatos ao desenvolvimento de vacinas contra *B. bovis*.

No entanto, a alta diversidade genética de tais antígenos de superfície entre os diferentes isolados de *B. bovis* (Hines et al., 1992) é apontada como principal dificuldade no desenvolvimento de metodologias de controle imunitário contra a infecção por *B. bovis* (Tattiyapong et al., 2016). Neste contexto, os genes *msa* podem representar marcadores genéticos para estudo da diversidade genética de *B. bovis* (Timms et al., 1990; Genis et al., 2009; Altangerel et al., 2012).

Estudos anteriores utilizando distintos isolados geográficos de *B. bovis*, bem como isolados de surtos e amostras vacinais, mostraram que o polimorfismo dos componentes antigênicos essenciais é a principal causa de falha vacinal (Bock et al., 1992; Berens et al., 2005). Embora diversos estudos de diversidade utilizando a família de genes *msa* venham sendo realizados ao redor do mundo (Genis et al., 2009; Lau et al., 2010; Altangerel et al., 2012; Simking et al., 2013; Sivakumar et al., 2013; Nagano et al., 2013; Tattiyapong et al., 2014; Molad et al., 2014; Matos et al., 2017) pouco se sabe sobre a variabilidade genética de isolados de *B. bovis* no Brasil. Até o momento, apenas três estudos avaliaram diversidade genética de *B. bovis* no Brasil. Enquanto um deles mostrou uma baixa diversidade genética entre isolados de *B. bovis* oriundos dos estados de Bahia, São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Rondônia, os demais estudos mostraram alta diversidade genética entre amostras oriundas dos estados da Bahia, São Paulo e Rio de Janeiro principalmente entre sequências dos genes *msa-2b* e *msa-2c* (Ramos et al., 2012; Nagano et al., 2013; Matos et al., 2017a,b).

Considerando-se a escassez de pesquisas que investiguem a diversidade genética de *B. bovis* no Brasil, aliado ao fato de que o país é um dos maiores exportadores de produtos de origem animal para o mundo, o presente estudo objetivou investigar a ocorrência e a diversidade genética de *B. bovis* em uma população de bovinos de corte amostrada no Pantanal brasileiro. Os resultados obtidos contribuirão para a aquisição de conhecimentos acerca da estrutura genética da população de *B. bovis*, bem como aos esforços na seleção de MSAs adequados ao desenvolvimento de vacinas e no entendimento dos mecanismos de escape à resposta imune por parte deste parasita.



## 7. Conclusões

O presente estudo mostrou uma ocorrência moderada de anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* na região amostrada, entretanto, a despeito da frequência de anticorpos se apresentar abaixo de 75%, a ausência de sinais clínicos relacionados à babesiose bovina leva a classificação da área como sendo de estabilidade endêmica.

A ocorrência molecular de *B. bovis* nos bovinos de corte amostrados foi baixa. Apesar disso, um alto grau de diversidade genética foi encontrado na população de *B. bovis* analisada, com a presença de diferentes genótipos coexistentes no rebanho estudado e no mesmo animal.

## 8. Referências

- Aboulaila M, Yokoyama N, Ygarashi I (2010) Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology** 169: 45- 50.
- Abreu UGP, Carvalho TB, Moraes AS (2008) Análise do preço do bezerro pago no Pantanal da Nhecolândia, no período de 2001 a 2008. **Corumbá: Embrapa Pantanal, Comunicado Técnico**. 70.
- Almeria S, Castella J, Ferrer D, Ortuño A, Estrada-Peña A Gutierrez JF (2001) Bovine piroplasmiasis in minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of pcr-based and light microscopy detection. **Veterinary Parasitology** 99: 249- 59.
- Altangerel K, Sivakumar T, Battsetseg B, Battur B, Ueno A, Igarashi I, Yokoyama N (2012) Phylogenetic relationships of Mongolian *Babesia bovis* isolates based on the merozoite surface antigen (MSA)-1, MSA-2b, and MSA- 2c genes. **Veterinary Parasitology** 184: 309–316.
- Alvarenga SM (1980) Levantamento preliminar de dados para o controle de enchentes da bacia do Alto Paraguai. In: **BRASIL. Ministério das Minas e Energia**. Projeto RADAMBRASIL, Goiânia. Brasília: Ministério das Minas e Energia.
- Antoniassi NAB, Corrêa AMR, Santos AS, Pavarini SP, Bandarra PM, Driemeier D (2009) Surto de babesiose cerebral em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Cienc. Rural** 39.
- Asada M, Goto Y, Yahata K, Yokoyama N, Kawai S, Inoue N, et al. (2012). Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. **Plos One** 7: 227.
- Barros SL, Madruga CR, Araújo FR, Menk CF, De Almeida MAO, Melo EPS, Kessler HR (2005) Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 100: 513-517.
- Barbieri JM, Blanco YAC, Bruhn FRP, Guimarães AM (2016) Seroprevalence of *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, and *Babesia bovis* in dairy cattle. **Ciência animal Brasileira** 17.
- Bechara GH, Szabó MP, Duarte JM, Matushima ER, Pereira MC, Rechav Y, Keirans JE, Fielden LJ (2000) Ticks associated with wild animals in the Nhecolândia Pantanal, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences** 916: 289-297.
- Berens SJ, Brayton KA, Molloy JB, Bock RE, Lew AE, Mcelwain TF (2005) Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contain a

unique hypervariable region composed of degenerate repeats. **Infection Immunology** 73: 7180–7189.

Berto ARS, Faustino AMAG, Melo AL, Alves ALC, Madruga BCR, Almeida BMAO, Ramos ACAM, Tenório ATG, Silva FF (2008) Frequência de anticorpos IgG anti - *Babesia bovis* e anti - *Babesia bigemina* em bovinos no Município do Paudalho, Zona da Mata do Estado de Pernambuco. **Medicina Veterinária** 2: 9-12.

Benson DA, Mizrachi IK, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DI (2002) GenBank. **Nucleic Acids Research** 30: 17- 20.

Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB (2003) Development and evaluation of a semi nested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal Clinical Microbiology** 41: 4172-4177.

Bilhassi TB, Oliveira HN, Ibelli AMG, Giglioti R, Regitano ICA, Oliveira-Sequeira TCG, Bressani FA, Malagó Júnior W, Resende FD, Oliveira MCS (2014) Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick borne disease** 5: 234-238.

Bock RE, de Vos AJ, Kingston TG, Shiels IA, Dalgliesh RJ (1992) Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. **Veterinary Parasitology** 43: 45–56.

Bock RE, de Vos AJ, Kingston TG, McLellan D (1997) Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* **Australian Veterinary Journal** 75: 337-340.

Bock RE, Kingston TG, de Vos AJ (1999) Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus* **Australian Veterinary Journal** 77: 461-464.

Bock RE, De Vos AJ (2001) Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. **Australian Veterinary Journal** 79: 832-839.

Bock RE, Jackson L, De Vos AJ, Jorgensen W (2004) Babesiosis of cattle. **Parasitology** 129: 247–269.

Böse R, Jacobson RH, Gale KR, Waltisbuhl DJ, Wright IG (1990) An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. **Parasitology Research** 76: 648-652.

Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, DE Vos AJ (1995) Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology** 57: 61–74.

Borgonio V, Mosqueda J, Genis AD, Falcon A, Alvarez JA, Camacho M (2008) MSA - 1 and MAS-2c gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1149: 121–145.

Bowman D. D. & Colaboradores. Georgis (2010) **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: p.783. Elsevier.

Brayton KA, et al. (2007) Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. **PLoS Pathogens** 3: 148.

Brito LG, et al. (2013) *Babesia bovis* infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. **Ticks and tick-borne diseases** 4: 78-82.

Buling A, Criado-Fornelio A, Acenzo G, Benitez D, Barbacarretero J C, Florin-Cristensen M (2007) A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *B. bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary Parasitology** 147: 16- 25.

Callow LL, Mellors LT, & Mcgregor W (1979) Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. **International Journal for Parasitology** 9: 333-338.

Callow LL (1984) Piroplasms. In: **Animal Health in Australia**, Protozoal and Rickettsial Diseases Canberra: Australian Bureau of Animal Health 5: 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 1–16.

Canales M, Enríquez A, Ramos E, Cabrera D, Dandie H, Soto A, Falcón V, Rodríguez M, de la Fuente J (1997) Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. **Vaccine** 15:414-22.

Cantu A, Ortega SA, Mosqueda J, Vazquez GZ, Henke SE, George JE (2007) Immunologic and molecular identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Free-Ranging White-Tailed Deer in Northern Mexico. **Journal of Wildlife Diseases** 43: 504–507.

Cantú-Martínez MA, Salinas-Meléndez JA, Zarate-Ramos JJ, Àvalos-Ramírez R, Martínez-Munoz A, Segura-Correa JC (2008) Prevalence of antibodies against *Babesia bigemina* and *B. bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) in farms of northeastern Mexico. **Journal of Animal and Veterinary Advances** 7:121-123.

Cavalcante GG (2007) Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bezerros da raça Nelore no Estado de São Paulo. **Tese** (doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology** 9: 1657-1660.

Costa VMM (2013) Estudo epidemiológico da Tristeza Parasitária Bovina no estado da Paraíba. **Tese** Patos: Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

Costa FB, Melo AS, Araújo FR, Ramos CAN, Carvalho-Neta AV, Guerra RMS NC (2015) Serological, parasitological and molecular assessment of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from state of Maranhão. **Revista Caatinga** 28:217-224.

D'Andrea LAZ, Sartor IF, Madruga CR, Freitas SBZ, Kroll LBS, Kronka N (2006) Condição imunológica de bovinos das raças Holandesa e Nelore frente a *Babesia bovis* e *B. bigemina* em duas regiões do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 26: 655-659.

Dalgliesh RJ (1993). Babesiosis. In **Immunology and Molecular Biology of Parasite Infections** 352–383.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9:772.

De vos AJ, Potgieter FT (1994). Bovine babesiosis. **Infectious Diseases of Livestock** 278–294.

De vos AJ (1979) Epidemiology and control of bovine babesiosis in South Africa. **J S Afr Vet Assoc** 50:357-62.

De Waal, DT (1996) Vaccination against Babesiosis. **Acta Parasitology** 20:487-516.

De Waal DT, Combrink MP (2006) Live vaccines against bovine babesiosis. **Veterinary Parasitology** 138: 88–96.

Dubremetz JF, Garcia-Réguet N, Conseil V, and Fourmaux MN (1998). Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. **International Journal of Parasitology** 28:1007–1013.

Ewing CA, Rumsey DH, Langberg AF, Sandler SG (1998) Immuno prophylaxis using intravenous Rh immune globulin should be standard practice when selected D-negative patients are transfused with D-positive Randon donor platelets, **Immune hematology** 14:133-137.

Fahrimal Y, Goff WL, Jasmer DP (1992) Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. **Journal of clinical microbiology** 30:1374-1379.

Foolly MM, Pereira MAVC, Emmott VP, Gilmar F, Madruga CR (2009) Ocorrência de *Babesia* sp. em bezerros mestiços, por meio de testes sorológicos, em campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 10:187–194.

Fonseca A, Braga A (1924) Noções sobre a tristeza parasitária dos bovinos. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura 216.

Florin-Christensen M, Suarez C, Hines SA, Palmer G H, Brown WC, Mcelwain TF (2002) The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. **Infection and Immunity** 70:3566–3575.

Florin-Christensen M, Suarez CE, Rodriguez AE, Flores DA, Schnittger L (2014) Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. **Parasitology** 28:1-30.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003) *ExpASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. **Nucleic Acids Research** 31:3784-3788.

Genis AD, Mosqueda JJ, Borgonio VM, Falcón A, Alvarez A, Camacho M, De Lourdes Muñoz M, Figueroa JV (2008) Phylogenetic analysis of Mexican *Babesia bovis* isolates using *msa* and *ssrRNA* gene sequences. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**. 1149:121–125.

Genis AD, Perez J, Mosqueda JJ, Alvarez A, Camacho M, Munoz ML (2009) Using MSA-2b as a molecular marker for genotyping Mexican isolates of *Babesia bovis*. **Infection, Genetics and Evolution** 9:1102–1107.

Giglioti, R. Estudo quantitativo da infecção por *Babesia bovis* em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos. 2013. **Tese** (Doutorado em genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal-SP.

Giglioti R, de Oliveira HN, Okino CH, de Sena Oliveira MC (2018) qPCR estimates of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels in beef cattle and *Rhipicephalus microplus* larvae. **Experimental and Applied Acarology** 75: 235-240.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andriotti R, Cañado PHD, León AAP, Pereira BJ, Viellela HS (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 23:150–156.

Gohil S, Herrmann S, Günther S, Cooke BM (2013) Bovine babesiosis in the 21st century: advances in biology and functional genomics. **International Journal for parasitology** 43:125-32.

Guerrero FD, Miller RJ, de León AAP (2012) Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? **International Journal for Parasitology** 42: 421- 427.

Guimarães AM, Lima JD, and Ribeiro MFB (2003). Ultrastructure of *Babesia equi* trophozoites isolated in Minas Gerais, Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira** 23: 101–104.

Guimarães AM, Carvalho AHO, Daher DO, Magalhães da Rocha CMB, Hirsch C (2011) Soroprevalência e fatores de risco para *Babesia Bovis* em rebanhos leiteiros na região sul de minas gerais. **Ciência e Agrotecnologia** 35: 826-832.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium** 41:95-98.

Hansen PJ (2004) Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science** 82: 349-360.

Hines SA, Palmer GH, Jasmer DP, McGuire TC, Mcelwain TF (1992) Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. **Molecular and Biochemical Parasitology** 55: 85–94.

Hodgson JL, Stiller D, Douglas PJ, Buening GM, Wagner GG, McGuire C (1992) *Babesia bigemina*: Quantification of infection in nymphal and adult *Boophilus microplus* using DNA probe. **Experimental Parasitology** 74:117-26.

Hunfeld K, Hildebrandt A, Gray J (2008) Babesiosis: Recent insights into an ancient disease, **International Journal for Parasitology** 38:1219–1237.

Jalovecka M, Hajdusek O, Sojka D, Kopacek P, Malandrin L (2018) The Complexity of Piroplasms Life Cycles, **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**.

Jasmer DP, Reduker DW, Hines SA, Perryman LE, McGuire TC (1992) Surface epitope localization and gene structure of a *Babesia bovis* 44-kilodalton variable merozoite surface antigen. **Molecular Biochemical Parasitology** 55:75-83.

Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK, Morton JM, Stear MJ (2012) Is endemic stability of tick-borne disease in cattle a useful concept? **Trends in Parasitology** 28: 3.

Johnston LAY, Leach G, Jones PN (1978) The duration of latent infection and functional immunity in Droughtmaster and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. **Australian Veterinary Journal** 54:14-18.

Junk WJ, Brown M, Campbell IC, Finlayson M, Gopal B, Ramberg L, Warner BG (2006) The comparative biodiversity of seven globally important wetlands: A synthesis. **Aquatic Sciences** 68:400- 414.

Juliano RS et al. (2007) Soroepidemiologia da babesiose em rebanho de bovinos da raça Curraleiro. **Ciência Rural** 37.

Kawai S, Igarashi I, Abgaandorjiin A, Ikadai H, Omata Y, Saito A, et al. (1999a). Tubular structures associated with *Babesia caballi* in equine erythrocytes in vitro. **Parasitology Research** 85:171–175.

Kawai S, Igarashi I, Abgaandorjiin A, Miyazawa K, Ikadai H, Nagasawa et al. (1999b). Ultrastructural characteristics of *Babesia caballi* in equine erythrocytes in vitro. **Parasitology Research** 85:794–799.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) "MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform". **Nucleic Acids Research** 30:3059–66.

Kakoma I, Mehlhorn MCS (1994) *Babesia* of domestic ruminants. **Parasitic Protozoa** 7:141-216.

Kessler RH, Madruga CR, Schenk MAM, Ribeiro OC (1983) Babesiose cerebral por *Babesia bovis* em bezerros no Estado do Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 18:931-935.

Kim C, Iseki H, Herbas MS, Yokoyama N, Suzuki H, Xuan X, Fujisaki K, Igarashi I (2007) Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 77:837-41.

Kuramae-Izioka EE (1997) A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**.19:683-689.

Kocan K M, DE LA Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA (2010) The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology** 167:95–107.

Krause PJ, Telford SR, Ryan R, Conrad PA, Wilson M, Thomford JW, Spielman A (1994) Diagnosis of Babesiosis: evaluation of a serologic test for the detection of *Babesia microti* antibody. **Journal Infect Disease** 169: 923-926.

Lau AO, Cereceres K, Palmer GH, Fretwell DL, Pedronia MJ, Mosqueda J, Mcelwain TF (2010) Genotypic diversity of merozoite surface antigen 1 of *Babesia bovis* within an endemic population. **Molecular and Biochemical Parasitology** 172:107–112.

Leigh JW, Bryant D (2015) PopART: full feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution** 6: 1110-1116.

Leroith T, Brayton KA, Molloy JB, Bock RE, Hines SA, Lew A, Mcel-Wain TF (2005) Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine break through isolates. **Infection and Immunity** 73:5388–5394.



Lemos AM, Teodoro RL, Oliveira GP et al. (1985) Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzerá in Brasil. 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. **Animal production** 41:187-191.

Lew AE, Dalrymple BP, Jeston PJ & Russel EB (1997) PCR methods for the discrimination of *Babesia bovis* isolates. **Veterinary Parasitology** 71:223-227.

Levine ND (1971) Taxonomy of the piroplasms. **Transactions of the American Microscopical Society** 90:2–33.

Levine ND (1988) Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. **Journal of Protozoology** 35: 518–528.

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism. **Bioinformatics** 25: 1451- 1452.

Löhr KF (1973) Susceptibility of non-splenectomized and splenectomized Sahiwal cattle to experimental *Babesia bigemina* infection. **Zentralbl Veterinärmedizin** 20:52-6.

Lobo CA, Rodriguez M, and Cursino-Santos JR (2012) *Babesia* and red cell invasion. **Current Opinion in Hematology** 19: 170–175.

Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos E G, Machado MRF, Valadão, IFF, Barci LG, Malheiros EB (1997) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology** 71: 17-26.

Madruga CR, Kessler RH, Jesus EF, Sete AJ (1986) Imunofluorescência indireta para diagnóstico sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*: produção de antígeno com cepas isoladas no Estado de Mato Grosso do Sul e avaliação preliminar do teste. Campo Grande: EMBRAPACNPGC.

Madruga CR, Aycardi E, Kessler RH, Schenk MAM, Figueiredo GR, Curvo JBE (1984) Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 19: 1163-1168.

Madruga, C.R. et al. (2000) Desenvolvimento de uma prova de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 20:167-170.

Mahoney DF, Ross DR (1972) Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal** 48: 292-8.

Mahoney DF, Wright IG, Mirre GB (1973) Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infections. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 67:197–203.

Mahoney DF (1974) The application of epizootiological principles in the control of babesiosis in cattle. **Bull Off Int Epizoot** 81:123-138.

Martins JR, Correa BL, Ceresér VH, Arteché CCP, Guglielmone A A (1994) Some aspects of the epidemiology of *Babesia bovis* in Santana do Livramento, southern Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology** 3:75-78.

Matos CA, Gonçalves LR, Alvarez DO, Freschi CR, Silva JBD, Val-Moraes SP, Mendes NS, André MR, Machado RZ (2017a) Longitudinal evaluation of humoral immune response and merozoite surface antigen diversity in calves naturally infected with *Babesia bovis*, in São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 479-49.

Matos, CA Diversidade genética de *Babesia bovis* em bezerros naturalmente infectados das regiões de São Paulo e Rio de Janeiro, Brasil (2017b) **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal-SP.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". **Proceedings of the Gateway Comp Enviromental Work** (GCE). 1- 8.

McHardy N (1979) Experimental therapy of theileriosis. **Journal of South African Veterinary Association** 50:321-2.

Montero E, Rodriguez M, Oksov Y, and Lobo CA (2009). *Babesia divergens* apical membrane antigen 1 and its interaction with the human red blood cell. **Infection Immune** 77, 4783–4793.

Mosqueda J, Olivera-Ramirez A, Aguilar-Tipacamu G, Canto GJ (2012) Current advances in detection and treatment of babesiosis. **Current Medicinal Chemistry** 19:1504–1518.

Molad T, Fleiderovitz L, Leibovich B, Wolkomirsky R, Erster O, Roth A, Mazuz M L, Markovics A, Shkap V (2014) Genetic polymorphism of *Babesia bovis* merozoite surfaceantigens-2 (MSA-2) isolates from bovine blood and *Rhipicephalus annulatus* ticks in Israel. **Veterinary Parasitology** 205:20–27.

Morando A, Gelinski JMLN (2010) Estudo preliminar do desenvolvimento embrionário in vitro de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Unoesc & Ciência – ACBS**, Joaçaba, 1:23-28.

Nagano D, Sivakumar T, De Macedo AC, Inpankaew T, Alhassan A, Igarashi I, Yokoyama N (2013) The Genetic Diversity of Merozoite Surface Antigen 1 (MSA-1) among *Babesia bovis* detected from Cattle Populations in Thailand, Brazil and Ghana. **The Journal of Veterinary Medical Science** 75:1463–1470.

O'Donoghue PJ, Friedhoff KT, Viscaino OG, Weyreter H (1985) The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using a semi-defined antigens in enzyme immunoassays. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam 18:1–12.

Oliveira GP, Alencar MM (1990) Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia** 42:127-135.

Oliveira GP, Alencar MM, Freitas AR (1989) Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. II Natural infestation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 24:1267-1271.

Oliveira GP, Alencar MM (1987) Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. I Infestação Artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 22:433- 438, 1987.

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. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária** 11:77-83.

Potgieter FT, and Els, HJ (1977). The fine structure of intra-erythrocytic stages of *Babesia bigemina*. Onderstepoort. **Journal Veterinary Research** 44:157–168.

Patarroyo JH, Vargas MI, Bicudo PL (1982) Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Veterinary Parasitology** 11:301-308.

Peregrine AS, Mamman M (1993) Pharmacology of diminazene: a review. **Acta Tropica** 54:185-203.

Quintão-Silva MG, Ribeiro MFB (2003) Infection rate of *Babesia* spp. Sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* from an area of enzootic stability in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98: 999-1002.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW (2000) **Veterinary Medicine**. In: A Text book of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.

Radostits OM, GAY CC, Hinchcliff KW, Constable PD (2008) Diseases associated with protozoa. *Veterinary Medicine: A Textbook of Diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. **Saunders Elsevier** 1483-1540.

Ramos CA, Araújo FR, Souza II, Bacanelli G, Luiz HL, Russi LS, Oliveira RH, Soares CO, Rosinha GM, Alves LC (2010) Real-time polymerase chain reaction based on *msa2c* gene for detection of *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology** 176:79-83.

Ramos CA, Araújo FR, Alves LC, DE Souza IIF, Guedes DS, Soares CO (2012) Genetic conservation of potentially immunogenic proteins among Brazilian isolates of *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology** 187:548–552.

Ramos VN, Piovezan U, Franco AH, Rodrigues VS, Nava S, Szabó MP (2016) Nelore cattle (*Bos indicus*) and ticks within the Brazilian Pantanal: ecological relationships. **Experimental and Applied Accarology** 68:227-40.

Riek RF (1962) Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (canestrini). **Australian Journal Agricultural Research** 13:532-552.

Rodrigues A, Rech RR, Barros RR, Fighera RA, Barros CSL (2005) Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. **Ciência Rural** 35:121–125.

Roberts JÁ (1968) Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (canestrini). I. Development of ticks on *Bos taurus*. **Journal Parasitology** 54:663-6.

Rudzinska MA (1976). Ultrastructure of intraerythrocytic *Babesia microti* with emphasis on the feeding mechanism. **Journal of Protozoology** 23:224–233.

Sahinduran S (2012) Protozoan Diseases in Farm Ruminants. A Bird's-Eye **View of Veterinary Medicine**. Ed. Intech. 473-500.

Salem GH, Liu X, Johnsrude JD, Dame JB, Reddy RG (1999) Development and evaluation of an extra chromosomal DNA-based PCR test for diagnosing bovine babesiosis. **Molecular and Cellular Probes** 13:107-113.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (2001) Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor**.

Sanger F, Niklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 74:5163-5169.

Saueressig TM (2006) Produção de proteína animal de qualidade com sustentabilidade: controle racional das parasitoses dos bovinos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 46p.

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. **Ciência Animal Brasileiro** 2:133–137

Santos GB, Gomes IMM, Silveira JAG, Pires LCS, Azevedo SS, Antonelli AC, Ribeiro MFB (2017) Horta, M. C. Tristeza Parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37:1-7.

Stevenson M (2005) An Introduction a Veterinary Epidemiology. Palmerston North, **EpiCentre** 60- 66.

Silva JB, Lopes CTA, Pinheiro CP, Lima DHS, Silva RSL, Fonseca AH, Araújo FR, Barbosa-Neto JD (2013) Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 33:847-850.

Silva MG, Henriques G, Sánchez C, Marques, Suarez CE, Oliva A (2009) First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Central and

Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. **Vet Parasitol** 166:66-72.

Silva AM, Alencar MM, Regitano LCA, Oliveira MCS, Barionijr W (2007) Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Genetic and Molecular Biology** 30:1150-1155.

Silva MG, Villarino NF, Knowles DP, Suarez C E (2018) Assessment of Draxxin<sup>®</sup> (tulathromycin) as an inhibitor of in vitro growth of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Theileria equi*. **International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance** 8: 265- 270.

Silveira JAG, de Oliveira CHS, Silvestre BT, Albernaz TT, Leite RC, Barbosa JD, Oliveira CMC, Ribeiro MFB (2016) Molecular assays reveal the presence of *Theileria* spp. and *Babesia* spp. in Asian water buffaloes (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) in the Amazon region of Brazil. **Ticks and Tick-Borne Disease** 7:1017-1023.

Simking P, Saengow S, Bangphoomi K, Sarataphan N, Wongnarkpet S, Inpankaew T, Jittapalapong S, Munkhjargal T, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I (2013) The molecular prevalence and MSA-2b gene based genetic diversity of *Babesia bovis* in dairy cattle in Thailand. **Veterinary Parasitology** 197:642–648.

Sivakumar T, Kazuhiro Okubo K, Igarashi I, DE Silva, WK, Kothalawala H, Silva SS P, Vimalakumar SC, Meewewa AS, Yokoyama N (2013) Genetic diversity of merozoite surface antigens in *Babesia bovis* detected from Sri Lankan cattle. **Infection Genetics and Evolution** 19:134-140.

Soares CO, Souza JC, Madruga CR, Madureira RC, Massard CL, Fonseca AH (2000) Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinaria Brasileira** 20:26-30.

Souza FAL, Braga JFV, Pires LV, de Carvalho CJS, Costa EA, Ribeiro MFB, Santos RL, Silva SMMS (2013) Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira** 33, 1057-1061.

Soldati D, Foth BJ, and Cowman AF (2004). Molecular and functional aspects of parasite invasion. **Trends Parasitol** 20: 567–574.

Shaw MK (1995). Mobilization of intrasporozoite Ca<sup>2+</sup> is essential for *Theileria parva* sporozoite invasion of bovine lymphocytes. **European Journal of Cell Biology** 68: 78–87.

Shaw MK (1996). Characterization of the parasite-host cell interactions involved in *Theileria parva* sporozoite invasion of bovine lymphocytes. **Parasitology** 113: 267–277

Simpson CF, Bild CE, and Stolkier HE (1963). Electron microscopy of canine and equine *Babesia*. **American Journal of Veterinary Research** 24: 408–414.

Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. **Societ of Systematic Biologists** 57: 758-771.

Stover BC, Muller KF (2010) Tree Graph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics** 11:1-9.

Suarez CE, Noh S (2011) Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology** 180:109-25.

Tattiyapong M, Sivakumar T, Ybanez RH, Perez ZO, Guswanto A, Igarashi I, Yokoyama N (2014) Diversity of *Babesia bovis* merozoite surface antigen genes in the Philippines. **Parasitology International**. 63:57–63.

Tattiyapong M, Sivakumar T, Takemae H, Simking P, Jittapalapong S, Igarashi I, Yokoyama N (2016) Genetic diversity and antigenicity variation of *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1 (MSA-1) in Thailand. **Infection end Genetics Evolution** 41:255-261.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2010) Parasitas de Bovinos. In: 3<sup>o</sup> ed. **Parasitologia Veterinária**, Guanabara Koogan p.42-127.

Timms P, Stewart NP, De Vos AJ (1990) Study of virulence and vector transmission of *Babesia bovis* by use of cloned parasite lines. **Infection and Immunity** 58:2171–2176.

Trindade HI, Silva GRA, Teixeira MCA, Sousa MG, Machado RZ, Freitas FLC, Almeida KS (2010) Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguaína State of Tocantins, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 19:169– 173.

Uilenberg G (2006) *Babesia* – A Historical overview. **Veterinary Parasitology** 138:3-10.

Wagner G, Cruz D, Holman P, Waghela S, Perrone J, Shompole S, Rurangirwa R (1992) Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz** 87:193-9.

Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J. (1995) Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology** 110 Suppl:S43-50.

Vidotto O, Andrade GM, Amaral CHS, Barbosa CS, Freire RL, Rocha MA, Vidotto MC (1997) Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* em rebanho leiteiros da região de Londrina, Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 49:655-659.

Zaugg JL (2009) Babesiosis. In: Smith. B.P. (Eds): **Large Animal Internal Medicine**. Mosby. Elsevier. St. Louis, p. 1157.

Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS (2003) *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. **Clinical Microbiology Reviews** 16:622–636.