

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Babesia bovis* EM BEZERROS
NATURALMENTE INFECTADOS DAS REGIÕES DE SÃO
PAULO E RIO DE JANEIRO, BRASIL**

Carlos António Matos

Médico Veterinário

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Babesia bovis* EM BEZERROS
NATURALMENTE INFECTADOS DAS REGIÕES DE SÃO
PAULO E RIO DE JANEIRO, BRASIL**

Carlos António Matos

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias– UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária; área de Medicina Veterinária Preventiva.

2017

M425d Matos, Carlos António
Diversidade genética de *Babesia bovis* em bezerros naturalmente infectados das regiões de São Paulo e Rio de Janeiro, Brasil / Carlos António Matos. -- Jaboticabal, 2017
xvi, 82 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Rosângela Zacarias Machado

Banca examinadora: Marta Maria Geraldês Teixeira, Cláudio Lisias Mafra de Siqueira, Marcos Rogério André, Jesus Aparecido Ferro

Bibliografia

1. Babesiose bovina. 2. Diversidade genética. 3. MSA. 4. Sorologia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.082:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Babesia bovis* EM BEZERROS NATURALMENTE INFECTADOS DAS REGIÕES DE SÃO PAULO E RIO DE JANEIRO, BRASIL

AUTOR: CARLOS ANTÔNIO MATOS

ORIENTADORA: ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSANGELA ZACARIAS MACHADO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. MARTA MARIA GERALDES TEIXEIRA
Departamento de Parasitologia / USP / São Paulo/SP

Prof. Dr. CLAUDIO LISIAS MAFRA DE SIQUEIRA
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular / Universidade Federal de Viçosa/MG

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

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO
Departamento de Tecnologia / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 19 de abril de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CARLOS ANTÓNIO MATOS – nascido na cidade de Quelimane, Província da Zambêzia, Moçambique, em 16 de setembro de 1962. Em 2000, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, Moçambique. Neste período, participou de estudos referentes à epidemiologia dos helmintos, tripanossomas, carrapatos e agentes transmitidos por carrapatos em animais domésticos. Concluiu o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Departamento de Veterinária de Doenças Tropicais, Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade de Pretoria, em 2008, com Dissertação intitulada “Species composition and geographic distribution of ticks infesting cattle, goats and dogs in Maputo Province, Mozambique”. Ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal-SP, em agosto de 2013, sob orientação da Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Dra. Rosangela Zacarias Machado, pela atenção, disponibilidade, ensinamentos, generosidade e paciência no dia a dia e, acima de tudo, por estimular e cultivar o espírito científico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter-me dado a vanguarda necessária e segura nos momentos difíceis da vida.

À Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, por ter-me aceito, recebido e apoiado com dedicação durante esses quatro anos de convívio na FCAV/UNESP.

À Dra. Luisa Meque, ex-diretora da Direção Nacional de Ciências Animais, Maputo-Moçambique por ter aceitado a minha participação no presente Doutorado.

Ao Prof. Dr. Marcos Rogério André, pelo apoio incondicional, disponibilidade, ensinamentos e paciência.

Dasiel Obregón Alvarez, pelo apoio, ensinamentos e paciência.

Luiz Ricardo Gonçalves, pelo apoio incondicional, disponibilidade, ensinamentos e paciência.

Aos proprietários e funcionários das fazendas PESAGRO-RIO, RJ e GERMÂNIA, SP, pelo apoio incondicional durante a colheita de amostras.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária (FCAV/UNESP): Arvelino Jacinto, Carla R. Freschi, Inalda Angelica Ramos, Jenevaldo Barbosa da Silva, Jyan Lucas Benevenuto, Márcia M. G. Jusi, Mayra A. P. Figueiredo, Natalia Serra Mendes, Otávio L. F. Júnior, Paulo H. Sampaio, Priscila Ikeda, Kayo José G. A. Castilho Neto, Keyla C. M. Sousa, Rafaela Beraldo, Renan Bressianini do Amaral, Simone de Jesus Fernandes pela amizade e ensinamentos.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da presente pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Auxílio-pesquisa (Processo 2012/21371-4) concedido para este projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Doutorado (2013-2017) concedida durante os quatro anos de curso.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/UNESP, pela atenção, disponibilidade e auxílio durante os quatro anos de estudo.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE FIGURAS | xi |
| LISTA DE TABELAS | xiii |
| RESUMO | xv |
| ABSTRACT | xvi |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Taxonomia da <i>Babesia</i> | 3 |
| 2.2 Ciclo biológico da <i>Babesia</i> | 3 |
| 2.3 Estabilidade endêmica | 5 |
| 2.4 Vetores da <i>Babesia</i> spp que infectam bovinos | 5 |
| 2.5 Distribuição e importância da babesiose bovina | 6 |
| 2.6 Imunopatologia da Babesiose | 8 |
| 2.7 Patogenia da babesiose bovina por <i>B. bovis</i> | 10 |
| 2.8 Diagnóstico | 11 |
| 2.9 Diversidade genética de <i>Babesia bovis</i> | 13 |
| 2.10 Controle da Babesiose bovina | 19 |
| 2.10.1 Controle do vetor | 19 |
| 2.10.2 Agentes quimioterapêuticos anti- <i>Babesia bovis</i> | 20 |
| 2.10.3 Vacinação | 20 |
| 3 OBJETIVOS | 22 |
| 3.1 Objetivo geral | 22 |
| 3.2 Objetivos específicos | 22 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 4.1 Área experimental | 23 |
| 4.2 Delineamento do estudo | 23 |
| 4.3 Colheita de amostras | 24 |
| 4.4 Diagnóstico Parasitológico | 25 |
| 4.4.1 Esfregaço sanguíneo | 25 |
| 4.5 Diagnóstico sorológico | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) | 25 |
| 4.5.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireta (IELISA) | 26 |
| 4.6 Extração do DNA..... | 27 |
| 4.7 Reação de Amplificação para o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (<i>GAPDH</i>)..... | 27 |
| 4.8 Diagnóstico Molecular | 28 |
| 4.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para caracterização genotípica de <i>Babesia bovis</i> | 28 |
| 4.9 Eletroforese de DNA em gel de Agarose..... | 29 |
| 4.10 Reação de sequenciamento..... | 30 |
| 4.10.1 Purificação dos amplicons | 30 |
| 4.10.2 Quantificação de DNA dos amplicons..... | 30 |
| 4.10.3 Sequenciamento | 30 |
| 4.10.4 Análise filogenética | 31 |
| 4.10.5 Análise de sequências..... | 32 |
| 5 RESULTADOS | 33 |
| 5.1 Detecção de <i>Babesia bovis</i> em esfregaços sanguíneos | 33 |
| 5.2 Frequência de anticorpos IgG anti- <i>Babesia bovis</i> | 33 |
| 5.3 Amostras de (cPCR) para <i>B. bovis</i> (MSAs)..... | 34 |
| 5.4 Ensaios de (cPCR) para amplificação de fragmentos dos genes <i>msa-1</i> , <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>B. bovis</i> | 35 |
| 5.5 Análise de sequências dos genes <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> detectadas em animais amostrados na Fazenda Pesagro-RJ..... | 39 |
| 5.6 Análise de sequências dos genes <i>msa-1</i> , <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> detectadas em animais amostrados na Fazenda Germânia-SP | 43 |
| 5.7 Análise filogenética de sequências dos genes <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> amplificadas em amostras de animais da Fazenda Pesagro, RJ..... | 48 |
| 5.8 Análise filogenética de sequências dos genes <i>msa-1</i> , <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> amplificadas em amostras de animais da Fazenda Germânia, SP | 52 |
| 6 DISCUSSÃO | 56 |
| 7 CONCLUSÕES | 62 |
| 8 REFERÊNCIAS | 63 |

APÊNDICE.....79
Apêndice 180

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1** – Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para o gene endógeno *GAPDH* obtido com os oligonucleotídeos iniciadores F/R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); Canaleta C+: controle positivo (KU522551); Canaleta 6: amostra de bezerra negativa; Canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21: amostra de bezerras positivas; Canaleta C-: branco (água ultrapura esterilizada, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). 35
- Figura 2** – Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para o gene *msa-1* de *B. bovis* obtido com os oligonucleotídeos iniciadores MSA-1 F₂/MSAR. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); Canaleta C+: controle positivo (KU522551); Canaletas 2, 3 e 6: amostra de bovinos negativos; Canaletas 1, 4, 5, 7, 8 e 9: amostra de bovinos positivos; Canaleta C-: branco (água esterilizada ultrapura, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). 37
- Figura 3** – Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para o gene *msa-2b* de *B. bovis* obtido com os oligonucleotídeos iniciadores MSA-2B F₂/MSAR. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); Canaleta C+: controle positivo (KU522552); Canaletas 5, 6, 10, 11, 12 e 14: amostra de bovinos negativos; Canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 e 13: amostra de bovinos positivos; Canaleta C-: branco (água ultrapura esterilizada, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). 37
- Figura 4** – Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para o gene *msa-2c* de *B. bovis* obtido com os oligonucleotídeos iniciadores MSA-2c F₂/MSAR. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); Canaleta C+: controle positivo (KU522553); Canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 9: amostra de bovinos negativos; Canaletas 6 e 8: amostra de bovinos positivos; Canaleta C-: branco (água ultrapura esterilizada, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). 38
- Figura 5** – Análise filogenética das sequências do gene *msa-2b* de *B. bovis*. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o modelo evolutivo GTR+G+I. Os números nos nós correspondem a valores de *bootstrap* superiores a 60% acessado com 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências do gene *msa-1* como grupo externo. 50

- Figura 6** – Análise filogenética das sequências do gene *msa-2c* de *B. bovis*. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o modelo evolutivo GTR+G+I. Os números nos nós correspondem a valores de *bootstrap* superiores a 60% acessado com 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências do gene *msa-2b* como grupo externo.....51
- Figura 7** – Análise filogenética das sequências do gene *msa-1* de *B. bovis*. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o modelo evolutivo GTR+G. Os números nos nós correspondem a valores de *bootstrap* superiores a 60% acessado com 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências do gene *msa-2b* como grupo externo.....53
- Figura 8** – Análise filogenética das sequências do gene *msa-2b* de *B. bovis*. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o modelo evolutivo GTR+G+I. Os números nos nós correspondem a valores de *bootstrap* superiores a 60% acessado com 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências do gene *msa-1* como grupo externo.....54
- Figura 9** – Análise filogenética das sequências do gene *msa-2c* de *B. bovis*. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o modelo evolutivo GTR+G+I. Os números nos nós correspondem a valores de *bootstrap* superiores a 60% acessado com 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências do gene *msa-2b* como grupo externo.....55

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos produtos amplificados referentes aos ensaios de cPCR para os genes de antígenos de superfície de merozoítos..... | 29 |
| Tabela 2 – Resultados percentuais positivos para <i>B. bovis</i> detectadas por esfregaços sanguíneos corados, testes sorológicos (ELISA e RIFI) e molecular (cPCR), em bezerras naturalmente infectadas na Fazenda Pesagro, Rio de Janeiro e Fazenda Germânia, São Paulo, Brasil. | 34 |
| Tabela 3 – Resultados das PCRs para os genes <i>msa-1</i> , <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>B. bovis</i> em amostras de DNA de sangue das bezerras da Fazenda Pesagro, (Serópédica-RJ). | 36 |
| Tabela 4 – Resultados das PCRs para os genes <i>msa-1</i> , <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>B. bovis</i> em amostras de DNA de sangue das bezerras da Fazenda Germânia, (Tiaçu-SP).. | 36 |
| Tabela 5 – Número de acessos no GenBank das sequências de fragmentos dos genes <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> detectadas em animais amostrados na Fazenda Pesagro, Serópédica, Rio de Janeiro. | 38 |
| Tabela 6 – Número de acessos no GenBank das sequências de fragmentos dos genes <i>msa-1</i> , <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> detectadas em animais amostrados na Fazenda Germânia, Tiaçu, São Paulo. | 39 |
| Tabela 7 – Sequências amplificadas do DNA do sangue de bezerras da Fazenda Pesagro e sequências previamente submetidas ao GenBank com as quais compartilharam identidade | 40 |
| Tabela 8 – Diversidade de nucleotídeos, identidade e similaridade de sequências de aminoácidos dos genes <i>msa-2b</i> e <i>msa-2c</i> de <i>Babesia bovis</i> detectadas em animais amostrados na Fazenda Pesagro, Serópédica-RJ..... | 41 |
| Tabela 9 – Identidade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-2b de <i>B. bovis</i> da Fazenda Pesagro, RJ | 42 |
| Tabela 10 – Similaridade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-2b de <i>B. bovis</i> da Fazenda Pesagro, RJ | 42 |
| Tabela 11 – Identidade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-2c de <i>B. bovis</i> da Fazenda Pesagro, RJ | 43 |
| Tabela 12 – Similaridade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-2c de <i>B. bovis</i> da Fazenda Pesagro, RJ | 43 |

- Tabela 13** – Sequências amplificadas do DNA de sangue de bezerras da Fazenda Germânia e sequências previamente submetidas ao GenBank com as quais compartilharam identidade 44
- Tabela 14** – Diversidade de nucleotídeos, identidade e similaridade de sequências de aminoácidos dos genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* detectadas em animais amostrados na Fazenda Germânia, Taiaçu, São Paulo..... 46
- Tabela 15** – Identidade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-1 de *B. bovis* das bezerras da Fazenda Germânia, SP 46
- Tabela 16** – Similaridade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-1 de *B. bovis* das bezerras da Fazenda Germânia, SP 46
- Tabela 17** – Identidade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-2b de *B. bovis* das bezerras da Fazenda Germânia, SP 47
- Tabela 18** – Similaridade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-2b de *B. bovis* das bezerras da Fazenda Germânia, SP 47
- Tabela 19** – Identidade de sequências de aminoácidos do gene MSA-2c de *B. bovis* das bezerras da Fazenda Germânia, SP 48
- Tabela 20** – Similaridade das sequências de aminoácidos da proteína MSA-2c de *B. bovis* das bezerras da Fazenda Germânia, SP 48

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Babesia bovis* EM BEZERROS NATURALMENTE INFECTADOS DAS REGIÕES DE SÃO PAULO E RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO – A babesiose é uma doença infecciosa economicamente importante que afeta o gado bovino em todo o mundo, endêmica e importante causa de morbidade e mortalidade em bovinos no Brasil. A doença é causada por *Babesia bigemina* e *B. bovis*, protozoários parasitas intraeritrocíticos do filo Apicomplexa, agentes de enorme importância econômica em regiões tropicais e subtropicais. Merozoítos de *B. bovis* possuem em sua superfície, pelo menos, cinco glico-proteínas, que pertencem à família de antígenos variáveis de superfície do merozoíto (VMSA). A família VMSA de *B. bovis* inclui os genes *msa-1*, *msa-2a1*, *msa-2a2*, *msa-2b* e *msa-2c*. Estes antígenos são altamente imunogênicos e contêm epítomos sensíveis à neutralização e, por conseguinte, têm sido considerados como antígenos candidatos para o desenvolvimento de vacinas de subunidades contra *B. bovis*. No entanto, estes antígenos de superfície são geneticamente diversificados entre diferentes isolados de *B. bovis*. O que resulta em diferenças antigênicas entre vários isolados de *B. bovis*. A fim de avaliar a resposta imune humoral contra *B. bovis* e a diversidade genética de antígenos de superfície de merozoítos de *B. bovis*, amostras de soro e DNA de sangue de 30 bezerras, sendo 15 da Fazenda Pesagro, Seropédica, Rio de Janeiro, e outras 15 da Fazenda Germânia, Taiacu, São Paulo, foram obtidas trimestralmente, desde o nascimento até aos 12 meses de idade. Os Anticorpos IgG para *B. bovis* foram detectados pelos testes de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoadsorção Enzimática Indireta (IELISA). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada com o objetivo de avaliar a diversidade genética de *B. bovis*, com base em genes que codificam antígenos de superfície de merozoítos (MSAs). Os resultados da sorologia demonstram que, a partir dos seis meses de idade, todas as bezerras foram soropositivas para *B. bovis*. Entre as 150 amostras de DNA testadas para a presença de três fragmentos de genes de *msa* de *B. bovis*, amplicons positivos foram obtidos em 14 amostras para *msa-1*, 24 para *msa-2b* e 34 para *msa-2c* de bezerras da Fazenda Pesagro e em 9 amostras para *msa-1*, 28 para *msa-2b* e 34 para *msa-2c* em amostras de bezerras da Fazenda Germânia. O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger para os fragmentos de genes *msa-2b* (n = 3), *msa-2c* (n = 5) de Seropédica e *msa-1* (n = 2), *msa-2b* (n = 5), *msa-2c* (n = 5) de Taiacu. A análise filogenética foi realizada pelo método de Máxima verossimilhança e modelos GTR + G, GTR + G + I e GTR + G + I para MSA-1, MSA-2b e MSA-2c, respectivamente. As sequências de MSAs dos genes *msa-2b* e *msa-2c* de Seropédica posicionaram-se em dois clados, enquanto que as sequências de MSAs dos genes *msa-1* e *msa-2b* de Taiacu posicionaram-se em dois clados, e sequências do gene *msa-2c* agruparam-se em um único clado. Os resultados da sorologia mostram que foi atingida a estabilidade endêmica em ambas as fazendas. Com base nas sequências do gene *msa-2b*, amplificadas no presente estudo, e a análise filogenética, pode-se afirmar que as amostras de *B. bovis* das fazendas Pesagro e Germânia dividem-se em dois grupos genotípicos, havendo um genótipo compartilhado por ambas as fazendas.

Palavras-chave: Babesiose bovina, diversidade genética, MSA, sorologia

GENETIC DIVERSITY OF *Babesia bovis* IN CALVES NATURALLY INFECTED OF THE SÃO PAULO AND RIO DE JANEIRO REGIONS, BRAZIL

ABSTRACT – Babesiosis, an economically important infectious disease that affects cattle worldwide, is endemic and important cause of morbidity and mortality of cattle in Brazil. The disease is caused by *Babesia bigemina* and *B. bovis*, apicomplexan intraerythrocytic protozoa parasites, which are agents of huge economic importance in tropical and subtropical regions. *B. bovis* merozoites present at least five (glyco-) proteins on their surfaces, which belong to a family of variable merozoite surface antigens (VMSA). The members of the VMSA family consist of merozoite surface antigen *msa-1*, *msa-2a1*, *msa-2a2*, *msa-2b*, and *msa-2c*. These antigens are highly immunogenic and contain neutralization-sensitive epitopes, and therefore have been considered as candidate antigens for developing subunit vaccines against *B. bovis*. However, these surface antigens are genetically diverse among different isolates of *B. bovis*, which results in antigenic differences among various *B. bovis* isolates. In order to evaluate the humoral immune response against *B. bovis* and genetic diversity of merozoite surface antigens of *B. bovis*, serum and DNA blood samples of 30 dairy calves, 15 from Seropedica, state of Rio de Janeiro, and the other 15 from a herd located in Taiaçu, state of São Paulo were obtained quarterly, since the birth up to 12 months of age. IgG antibodies to *B. bovis* were detected by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tests. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used aiming to assess the genetic diversity of *B. bovis*, based on genes that encode merozoite surface antigens (MSAs). The serology results demonstrate that up to six months of age all calves were seropositive to *B. bovis*. Among the 150 DNA blood samples tested for the presence of three *B. bovis*-*msa* gene fragments, positive amplicons were obtained in 14 samples for *msa-1*, 24 samples for *msa-2b* and 34 for *msa-2c* from calves of Pesagro herd, 9 samples for *msa-1*, 28 for *msa-2b* and 34 for *msa-2c* from calves of Germânia herd. Sequencing, by Sanger method, was performed for *msa-2b* (n=3), and *msa-2c* (n=5), genes fragments of Seropedica and *msa-1*(n=2), *msa-2b* (n=5), and *msa-2c* (n=5), genes fragments of Taiaçu. The phylogenetic analysis was performed by Maximum Likelihood method and models GTR+G, GTR+G+I and GTR+G+I for MSA-1, MSA-2b and MSA-2c, respectively. The Seropedica MSAs sequences namely *msa-2b* and *msa-2c* were positioned in two clades, and a Taiaçu MSAs sequence, that is *msa-1* and *msa-2b*, were positioned in two clades, while *msa-2c* sequences were all grouped in only one clade. Serology results show that endemic stability has been achieved in both farms. Based on the *msa-2b* gene sequences amplified in the present study, and the phylogenetic analysis, it can be stated that the *B. bovis* samples from the Pesagro and Germânia farms are classified into two genotypic groups, having one genotype shared by both farms.

Keywords: Bovine babesiosis, genetic diversity, MSA, serology

1 INTRODUÇÃO

As infecções parasitárias causadas por hemoprotozoários em bovinos são consideradas uma das principais causas de perdas econômicas na bovinocultura em todo o mundo (SIVAKUMAR et al., 2013). Entre elas, a babesiose bovina, causada por protozoários parasitas intraeritrocitários do filo Apicomplexa, família Babesiidae e amplamente distribuídos em todas as regiões tropicais e subtropicais onde vetores carrapatos da família Ixodidae ocorrem. Quatro espécies do gênero *Babesia* são capazes de infectar bovinos: *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* e *B. major*. As três primeiras espécies são incriminadas por causar manifestações severas da doença (BOCK et al., 2004; SIVAKUMAR et al., 2013). Em particular a infecção com *B. bovis*, além de ocasionar anemia hemolítica induz perturbações nervosas e respiratórias: As falhas do diagnóstico e tratamento precoce podem levar à morte de animais infectados (BOCK et al., 2004).

No Brasil, a babesiose bovina é considerada uma doença endêmica, e a soroprevalência da *B. bovis* varia entre 56,4-97,9%. As perdas anuais devido à babesiose bovina, em associação ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, estão estimadas em cerca de 3,5 milhões de dólares na bovinocultura, principalmente em áreas de instabilidade enzoótica (GRISI et al., 2014). Porém, mesmo em rebanhos onde a soroprevalência é inferior a 75%, a circulação de *B. bovis* não é um indicativo de ocorrência de doença clínica nos animais. Assim, para a compreensão adequada da situação epidemiológica da babesiose bovina, além do acompanhamento sorológico periódico dos rebanhos, é necessária a caracterização molecular de diferentes amostras de *B. bovis* circulantes no território nacional.

Os merozoítos de *B. bovis* possuem na superfície, pelo menos, cinco glicoproteínas, pertencentes à família do antígeno variável de superfície de merozoíto (VMSA). A família VMSA de *B. bovis* inclui os seguintes antígenos de superfície do merozoíto: MSA-1 e MSA-2. O locus do gene MSA-1 compreende uma única cópia (SUAREZ et al., 2000; LAU et al., 2010). Nos isolados de *B. bovis* do México Mo7 e do sul do Texas T2Bo, o locus MSA-2 tem quatro genes expressos: *msa-2a1*, *msa-2a2*, *msa-2b* e *msa-2c* (FLORIN-CHRISTENSEN et al., 2002; BERENS et al., 2005; WILKOWSKY et al., 2007), enquanto que nos isolados de *B. bovis* australianos o

lócus MSA-2 contém apenas dois genes: *msa-2a/b* e *msa-2c* (BERENS et al., 2005).

Apenas vacinas vivas atenuadas estão atualmente disponíveis para a prevenção da babesiose clínica causada por *B. bovis* (MAZUZ et al., 2012; NAGANO et al., 2013; SIVAKUMAR et al., 2013). Embora este método de prevenção tenha sido bem sucedido, entre os anos de 1985 e 1990 houve um aumento significativo do número de falhas vacinais, ou seja, surtos pós-vacinação. Tais insucessos das vacinações devem-se ao polimorfismo dos antígenos de superfície do parasita. A diversidade genética dos antígenos de superfície do merozoíto (MSAs) é considerada a principal causa da falta de proteção entre isolados de vacinas e de surtos, ocasionando o fracasso das vacinas.

Vários estudos sobre a diversidade genética de *Babesia bovis* têm sido realizados em diversas áreas geográficas do mundo, a saber: Na Austrália, México, Mongólia, Tailândia, Sri Lanka, Israel e Filipinas. Entretanto, no Brasil, pouco se sabe sobre a variabilidade genética de isolados de *B. bovis* com a exceção do estudo realizado na Bahia, com base no gene *msa-1*, permitindo concluir que a diversidade genética da *B. bovis* é alta.

Estudos sobre a diversidade genética de *B. bovis* são de extrema importância por proporcionarem conhecimentos sólidos sobre a estrutura da população do parasita, permitindo deste modo a seleção de isolados de *B. bovis* adequados para vacinas.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar, através de um estudo longitudinal, a diversidade genética da *B. bovis* em um grupo de bezerras naturalmente infectadas, desde o nascimento até aos 12 meses de idade, na Fazenda Pesagro-Rio, localizada no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, e na Fazenda Germânia, localizada no município de Taiaçu, Estado de São Paulo, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia da *Babesia*

O gênero *Babesia* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, ordem Eucoccidiorida, subordem Piroplasmorina e família Babesiidae (LEVINE, 1988; ALLSOPP et al., 1994). São parasitas intraeritrocitários e ocorrem mais de 100 espécies que infectam uma ampla variedade de animais domésticos, bem como animais selvagens e, ocasionalmente, o homem (BOCK et al., 2004; CANTU et al., 2007; HUNFELD; HILDEBRANDT; GRAY, 2008).

Quatro espécies são responsáveis por causar a babesiose bovina: *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* e *B. major* (ANGUS, 1996). *B. bigemina*, *B. bovis* e *B. divergens* são responsáveis por manifestações severas da doença (TAYLOR et al., 2010). *B. bigemina* e *B. bovis* são agentes de maior importância econômica para bovinos das regiões tropicais e subtropicais (JULIANO et al., 2007; SIVAKUMAR et al., 2013).

2.2 Ciclo biológico da *Babesia*

O ciclo de vida da *Babesia* é formado por três elementos: o vetor, o parasito e o hospedeiro, iniciando-se quando os bovinos, hospedeiros intermediários de *Babesia* spp., infectam-se pela inoculação de esporozoítos presentes na glândula salivar dos carrapatos vetores no ato do repasto sanguíneo (CHAUVIN et al., 2009). A interação esporozoíto - eritrócito é extremamente específica, já que *Babesia* spp. não invade outro tipo de célula, implicando que existem receptores no eritrócito que são reconhecidos por moléculas de superfície do parasito, presentes na membrana externa dos esporozoítos (YOKAYAMA et al., 2006). A penetração do esporozoíto no eritrócito dá-se com a fixação na hemácia, logo após a ligação, há uma reorientação desses esporozoítos sobre a superfície do eritrócito, de maneira que o complexo apical entra em contato com a membrana plasmática. O conteúdo das roptrias e dos micronemas é liberado sobre a membrana eritrocitária, induzindo à formação de um vacúolo e internalização do esporozoíto. No interior da hemácia

hospedeira, a membrana do vacúolo é destruída, e o esporozoíto fica em contato com o citoplasma, correspondendo a uma invasão ativa, mas sem que haja o rompimento do eritrócito (VILORIA; SALCEDO, 2004; CHAUVIN et al., 2009). Em seguida, os parasitas transformam-se em trofozoítos, quando então se multiplicam por divisão binária (merogonia), dando origem a dois merozoítos; estes rompem o eritrócito e penetram em outro íntegro para continuar a multiplicação (BOCK et al., 2004). Foi identificado também um tipo ovoide de merozoíto, chamado de precursor gamonte, o qual só se desenvolve após ser ingerido pelo carrapato (MACKENSTEDT et al., 1995).

O carrapato infecta-se quando ingere eritrócitos com *Babesia* spp, sendo que os parasitas degenerados serão destruídos. No entanto, alguns estágios específicos (“pré-gametócitos”) sobrevivem e sofrem alterações morfofisiológicas adaptativas, evoluindo para gametócitos, preparando-se, assim, para o início do ciclo sexuado (CHAUVIN et al., 2009). Esses gametócitos desenvolvem-se no intestino do carrapato, formando os microgametas (masculino) e macrogametas (femininos), que se fundem para formar os zigotos (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Estes penetram nas células do epitélio intestinal do carrapato e multiplicam-se por esporogonia, dando origem aos esporocinetos, maiores e em forma de arco, que são liberados na hemocele (MOSQUEDA et al., 2004). Os esporocinetos invadem a hemolinfa do vetor, onde se iniciam ciclos de fissão múltipla nos diversos órgãos. No caso das fêmeas de carrapatos, os esporocinetos atingem os ovários e, a partir destes, os ovos e as larvas (Transmissão transovariana).

Esporocinetos introduzidos nas glândulas salivares são transformados em estágios multinucleados (esporogônico) e estes, em seguida, quebram-se para formar esporozoítos (pequenos merozoitos haplóides) (MACKENSTEDT et al., 1995). Em todas as espécies, o desenvolvimento de esporozoítos normalmente só começa quando o carrapato infectado se fixa ao hospedeiro vertebrado. Em *B. bigemina*, algum desenvolvimento tem lugar durante a alimentação das larvas, mas a forma infecciosa dos esporozoítos leva cerca de nove dias para aparecer e, portanto, só ocorre na fase de ninfa e nos estágios adultos do carrapato (HOYTE, 1961; POTGIETER; ELS, 1977). A transmissão pode ocorrer durante todo o resto da fase de ninfa e por fêmeas e machos (CALLOW; HOYTE, 1961; RIEK, 1963;

DALGLIESH; STEWART; CALLOW, 1978) adultos. No caso de *B. bovis*, a formação de esporozoítos infecciosos geralmente ocorre dentro de 2 a 3 dias de fixação da carraça larval (SUAREZ; NOH, 2011).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infectado fixa no hospedeiro vertebrado. *B. bovis* é então transmitida exclusivamente por larvas de *R. (B.) microplus*. Este estágio perde a infectividade após ter realizado a transmissão para o hospedeiro, e, conseqüentemente, as ninfas e os adultos não são infectados por este protozoário (MAHONEY; MIRRE, 1979).

2.3 Estabilidade endêmica

Estabilidade endêmica é definida como o estado em que a relação entre o hospedeiro, o agente, o vetor e o ambiente é tal que a doença clínica ocorre raramente ou não ocorre (PERRY, 1996). A resistência passiva adquirida a partir do colostro dura cerca de 2 meses, e pode ser seguida pela imunidade inata de 3 a 9 meses de idade (MAHONEY; ROSS, 1972; MAHONEY, 1974). Portanto, bezerros expostos à babesiose durante os primeiros 6-9 meses raramente apresentam sinais clínicos e desenvolvem uma sólida imunidade de longa duração (DALGLIESH, 1993). Sob condições de instabilidade endêmica, alguns animais não serão infectados por um considerável período após o nascimento, podendo portanto, desenvolver grave doença fatal se forem expostos mais adiante na vida, dependendo de sua raça (CALLOW, 1984).

Segundo BOCK et al. (2004) estima-se que, se pelo menos 75% de bezerros forem expostos à infecção por *B. bovis* a partir de 6-9 meses de idade, a incidência da doença será baixa e um estado de estabilidade endêmica natural será estabelecido.

2.4 Vetores da *Babesia* spp que infectam bovinos

Três gêneros da família Ixodidae, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*, são vetores das *babesias* que infectam bovinos. Porém, os principais vetores são os carrapatos do subgênero *Rhipicephalus (Boophilus)* spp. (BOCK et al., 2004;

MAZUZ et al., 2012), os quais pertencem à ordem Acarina, Família Ixodidae, subfamília *Rhipicephalina*. Fazendo o uso da análise molecular, suportado por uma análise de carácter morfológico, Murrell, Campbell e Barker (2000) e Beati e Keirans (2001) chegaram à conclusão de que o gênero *Rhipicephalus* é parafilético em relação ao gênero *Boophilus*. Consequentemente, Murrell e Barker (2003) propuseram a nomenclatura *Rhipicephalus (Boophilus)* spp. para os carrapatos pertencentes a este grupo. Cinco espécies de *Rhipicephalus (Boophilus)* são conhecidas mundialmente, a saber: *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus (Boophilus) geigy*, *Rhipicephalus (Boophilus) kohlsi* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CAMICAS et al., 1998; HORAK et al., 2002). Os membros deste subgênero estão amplamente distribuídos nas regiões Afrotropical e Oriental, na Austrália e no Novo Mundo. Três destas espécies: *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *R. (B.) decoloratus* e *R. (B.) microplus* são economicamente importantes.

No Brasil, o único vetor de *B. bigemina* e *B. bovis* é o *R. (B.) microplus*, que encontra condições favoráveis ao seu desenvolvimento, incidindo em todo o território com intensidade de parasitismo variando em função das condições climáticas, do manejo de rebanhos e pastagens, e da raça dos bovinos explorados (GOMES, 1998). Este carrapato pode completar até cinco gerações por ano, dependendo das temperaturas médias anuais, que devem estar em torno de 27°C, com precipitações pluviométricas adequadas e umidade relativa de aproximadamente 70% (FURLONG; EVANS, 1991; BARROS et al., 2006). Nas regiões com períodos intensos de secas, existe limitação da sobrevivência do carrapato, ocorrendo geralmente paralisação na incubação, na postura e até mesmo fracasso desses estágios (BARROS et al., 2005).

2.5 Distribuição e importância da babesiose bovina

A distribuição geográfica da babesiose bovina é limitada pela presença do carrapato vetor, que necessita de fatores ambientais favoráveis para completar seu ciclo biológico. Condições climáticas tropicais e subtropicais favorecem o desenvolvimento do carrapato e conferem à babesiose bovina características de

estabilidade endêmica. Nos locais onde o clima limita o desenvolvimento do *R. (B.) microplus*, tornando, desse modo, a transmissão irregular, situações de instabilidade endêmica são criadas, ocorrendo surtos de babesiose (MAHONEY; ROSS, 1972; BARCI et al., 1994; TRINDADE et al., 2010; COSTA et al., 2015).

A situação epidemiológica da babesiose bovina causada por *Babesia bovis*, na maioria das regiões brasileiras, é de estabilidade enzoótica (SANTOS et al., 2001; FOOLLY et al., 2009), cuja soroprevalência varia entre 56,4-97,9%. Portanto, a situação epidemiológica da doença altera-se entre áreas instáveis e estáveis. Alguns estudos revelaram áreas de instabilidade em que a prevalência sorológica era inferior a 75% (BARROS et al., 2005; SOUZA et al., 2013), e regiões de estabilidade enzoótica com soroprevalência superior a 75% (FOOLLY et al., 2009; TRINDADE et al., 2010; COSTA et al., 2015). Mais de 1,2 bilhão de bovinos no mundo estão expostos à *Babesia* spp (MCCOSKER, 1981). Raças de bovinos indígenas das regiões endêmicas geralmente têm certo grau de resistência natural a *Babesia* spp, e as consequências da infecção não são tão graves como quando estão envolvidas raças exóticas (*Bos taurus*). Além disso, em áreas tropicais com uma população elevada do vetor, a exposição natural geralmente ocorre em idade precoce, e os bovinos são, portanto, imunes ao subsequente desafio como adultos (BOCK et al., 2004).

Os custos devido à babesiose são imputados não apenas à morbidade, mortalidade, abortamentos, diminuição da produção de leite, carne e da força de tração e de medidas de controle (tais como banhos carrapaticidas, compra de vacinas e quimioterapêuticos), mas também através de seu impacto sobre o comércio internacional de bovinos. McLeod e Kristjanson (1999) desenvolveram um modelo para avaliar o impacto global de carrapatos e doenças por elas transmitidas. Os autores calcularam que as perdas e o controle da babesiose e anaplasose custam à bovinocultura australiana US\$ 16.9 milhões por ano, acrescidos de US\$ 6.4 milhões por perdas anuais devido aos transtornos causados pelos carrapatos. O modelo permitiu estimar os custos das perdas e do controle da babesiose e anaplasose no Quênia, Zimbábue, Tanzânia, África do Sul, China, Índia, Indonésia e Filipinas, sendo 5,1; 5,4; 6,8; 21,6; 19,4; 57,2; 3,1 e 0,6 milhões de dólares anuais, respectivamente. Já no Brasil as perdas anuais devido à babesiose bovina em

associação ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estão estimadas em cerca de 3,5 milhões de dólares na produção bovina, principalmente em áreas de instabilidade enzoótica (GRISI et al., 2014).

2.6 Imunopatologia da babesiose

A resposta imunológica dos bovinos à infecção por *Babesia* spp. envolve tanto mecanismos inatos como adquiridos. A imunidade inata está relacionada a fatores como especificidade parasito-hospedeiro, características genéticas, idade e resposta imune celular do hospedeiro (BOCK et al., 2004; BROWN et al., 2006). Animais esplenectomizados desenvolvem maior parasitemia do que animais infectados pela primeira vez. Estas observações implicam que o baço desempenha um importante papel na resposta contra *Babesia* spp. (BOCK et al., 2004).

Os mecanismos imunes no hospedeiro vertebrado são direcionados contra os eritrócitos infectados com *Babesia* spp. ou contra os merozoítos livres. A degeneração dos parasitas parece ser causada mais pela resposta imune celular do que pela imune humoral (ZINTL et al., 2005). Durante a infecção aguda, a resposta imune inata parece ser essencial e requer a produção de interleucinas IL-12. Essas estimulam as células “natural killer” (NK) a produzirem grandes quantidades de interferon gama (INF- γ) (SHODA et al., 2000; GARCIA et al., 2004; GOFF et al., 2006), que induz a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (GOFF et al., 2006).

A evolução da infecção aguda depende do tempo e da produção de citocinas inflamatórias pela resposta do tipo Th1, bem como das quantidades produzidas.

Existe uma imunidade relacionada com a idade à infecção primária do bovino com *B. bovis* e *B. bigemina* (RIEK, 1963). Bezerros jovens exibem uma forte imunidade inata em comparação com bovinos adultos (TRUEMAN; BLIGHT, 1978; GOFF et al., 2001). Inicialmente, pensava-se que esta imunidade inata fosse devido à transferência passiva de anticorpos protetores no colostro de mães imunes (MAHONEY, 1967). No entanto, bezerros provenientes de mães não imunes também exibem resistência à exposição de *B. bovis* e *B. bigemina* (RIEK, 1963). Foi mostrado que a resposta imune inata de bezerros jovens à infecção com *B. bovis*

envolve a indução precoce da interleucina (IL) -12 e interferon (IFN) - γ e a presença induzível da expressão da óxido nítrico sintetase (iNOS) mRNA expressão no baço (GOFF et al., 2001).

A comparação entre a resposta imune dos bezerros e bovinos adultos contra *B. bovis* mostrou que a resposta imune inata somente é protetora se o INF- γ e IL-12 forem produzidos antes da produção de IL-10. Quando IL-10, IL-12 e INF- γ são produzidos ao mesmo tempo, a resposta do tipo Th1 e a produção de NO pelo baço são retardadas ou diminuídas, o que permite a manifestação da doença (GOFF et al., 2001).

Durante a fase crônica (resposta adaptativa), a lise de eritrócitos infectados é também mediada pelo NO produzido por macrófagos esplênicos ativados por INF- γ e TNF α . Esse mecanismo, em seguida, é regulado por citocinas tipo Th1 e é inibido por IL-4 e IL-10 (CHAUVIN et al., 2009). A resposta imune humoral não permite a remoção do parasita, mas vários mecanismos ajudam a controlar a parasitemia (BROWN, 2001), tais como: a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) mediada por IgG1, a opsonização mediada por IgG2, a neutralização de aderência dos merozoítos livres em eritrócitos e da citoaderência de eritrócitos infectados às células endoteliais (BROWN et al., 2006) e a ativação do complemento mediado por IgG1 e IgG2 (CHAUVIN et al., 2009). Ainda durante essa fase, a persistência dos baixos níveis de parasita requer ativação da resposta imune adaptativa com ativação dos linfócitos Th0 ou Th1 para produção de anticorpos IgG, especialmente o opsonizante IgG2 e mecanismos de lise de eritrócitos infectados, mediado por macrófagos e NO (BROWN, 2001). Diferentemente do que acontece com os agentes da anaplasnose bovina, não existe Imunidade cruzada entre *B. bovis* e *B. bigemina*, ou seja, a infecção por uma dessas espécies não protege o animal contra a outra (SMITH et al., 2000). Os níveis de anticorpos aumentam durante a fase aguda da infecção e declinam durante a fase crônica. Estudos sobre a cinética da produção de anticorpos contra *B. bovis* evidenciam que a IgG é detectada no 7º dia pós-infecção, alcançando títulos mais altos no 12º dia e permanecendo assim por sete semanas (O'DONOGHUE et al., 1985). Ross e Lohr (1968) encontraram anticorpos colostrais em bovinos com mais de um mês de idade, e os mesmos persistiram por um período de 17 semanas após o nascimento. Em condições

naturais a campo, foram detectados anticorpos anti-*B. bovis* num período médio de 45,5 dias após o desafio pelo carrapato (TODOROVIC et al., 1976). Num estudo realizado no Mato Grosso do Sul, observou-se decréscimo nos níveis de anticorpos colostrais entre 28 e 56 dias de idade contra *B. bigemina*, e entre 56 e 84 dias para *B. bovis*. A produção ativa de anticorpos contra *B. bigemina* foi observada aos 84, e aos 112 dias contra *B. bovis* (MADRUGA et al., 1984).

2.7 Patogenia da babesiose bovina por *B. bovis*

A babesiose bovina constitui um dos principais fatores limitantes para o melhoramento da produtividade da bovinocultura em áreas tropicais e subtropicais do mundo (RODRIGUES et al., 2005; TAYLOR et al., 2010). A dinâmica da infecção por *Babesia* spp. é dependente de vários fatores, tais como população de carrapatos infestantes; capacidade de transmissão do carrapato; e suscetibilidade dos bovinos, que pode variar com a raça, idade, estado fisiológico e imunitário (BOCK et al., 2004; BROWN et al., 2006).

A doença clínica é relacionada a ciclos repetidos de invasão e multiplicação das babesias em eritrócitos do hospedeiro, seguidos de lise eritrocitária e invasão de novos eritrócitos (RODRIGUES et al., 2005). Numa etapa inicial da invasão de eritrócitos, a babesia utiliza proteínas de superfície dos merozoítos (MSA) para se ligar eficazmente ao eritrócito-alvo. Os merozoítos possuem, pelo menos, cinco glicoproteínas em sua superfície, sendo que estas moléculas de superfície pertencem a uma família de antígenos variáveis de superfície do merozoíto (VMSA) (HINES et al., 1992; FLORIN-CHRISTENSEN et al., 2002).

Estes antígenos de superfície do merozoíto (MSA`s) de *B. bovis* desempenham um papel importante na invasão de glóbulos vermelhos pelos parasitas (YOKOYAMA et al., 2006). Sendo expressos em esporozoítos e merozoítos (SUAREZ et al., 2000; MOSQUEDA et al., 2002).

O processo de invasão de eritrócitos por parasitas do gênero *Babesia* é semelhante ao que ocorre com aqueles do gênero *Plasmodium* (BANNISTER; MITCHELL, 2003). Durante o ciclo de divisão assexuada no hospedeiro mamífero, merozoítos extracelulares invadem os eritrócitos do hospedeiro e assexuadamente,

multiplicam-se nos eritrócitos invadidos. Após a divisão do trofozoíto, os merozoítos são liberados do eritrócito por ruptura das células hospedeiras, e invadem novo eritrócito novamente (YOKOYAMA et al., 2002, 2003; KUMAR et al., 2004). O estágio eritrocitário de *Babesia* resulta em sinais clínicos graves, tais como: febre alta, anemia, hematúria e hemoglobínúria nos hospedeiros infectados (HOMER et al., 2000).

Membros do filo Apicomplexa utilizam várias moléculas (ligantes) em seu processo de invasão (PREISER et al., 2000). Merozoítos extracelulares ligam-se reversivelmente aos eritrócitos do hospedeiro, reorientam as organelas apicais para próximo da interface de ligação e, em seguida, penetram na membrana do eritrócito através de várias interações moleculares dos ligantes existentes em suas membranas com os receptores-alvo de superfície da célula hospedeira (DUBREMETZ et al., 1998; SOLDATI et al., 2001). Durante a invasão algumas das moléculas de superfície de revestimento dos merozoítos podem funcionar como fatores de reconhecimento dos eritrócitos do hospedeiro intermediário, enquanto produtos das roptrias e micronema podem ser segregados, a partir das organelas de merozoítos para o ponto de invaginação da membrana, a fim de fazer junções apertadas para o acolhimento de eritrócito e, em seguida, realizar sua penetração e internalização posterior no eritrócito (SAM-YELLOWE, 1996; PREISER et al., 2000).

2.8 Diagnóstico

No diagnóstico da babesiose, deve-se levar em conta os dados epidemiológicos, sinais clínicos e lesões observadas em necropsia (KOCAN et al., 2010), sendo que os exames laboratoriais são fundamentais para a confirmação da enfermidade.

O exame direto, por meio de esfregaços sanguíneos colhidos de sangue periférico de animais na fase aguda com parasitemia elevada, corados com corantes do tipo Romanowsky e modificações deste (Giemsa, Leishman, Wrigth e Panótico), consiste em uma ferramenta importante para a confirmação do diagnóstico clínico (BOCK et al., 2004; KOCAN et al., 2010). Trata-se de um dos principais métodos de diagnóstico empregados, pois além da praticidade apresenta menor custo (BÖSE et

al., 1995). Entretanto, a baixa sensibilidade dessa técnica é um fator limitante para a aplicação da mesma em estudos epidemiológicos, em decorrência da incapacidade de se detectar animais cronicamente infectados, convertidos ao estado de portador (BÖSE et al., 1995; COSTA JUNIOR et al., 2006).

As técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos específicos têm sido frequentemente empregadas em estudos epidemiológicos da babesiose, e com base no *status* imunológico dos animais é possível definir a situação epidemiológica das diferentes regiões de ocorrência dessas enfermidades (MAHONEY; WRIGHT; MIRRE, 1973; BARROS et al., 2005). Essas técnicas são ainda capazes de verificar a presença e a intensidade de anticorpos específicos no soro de animais e servem, indiretamente, como indicador da presença do agente (MAHONEY; WRIGHT; MIRRE, 1973). Muitos testes sorológicos foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos anti-*Babesia* spp. Porém as técnicas mais rotineiramente empregadas são: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireta (ELISA-I) (BÖSE et al., 1995).

A RIFI é uma técnica sorológica amplamente empregada, tem baixo custo, porém, além de ser mais laboriosa, tem a desvantagem da subjetividade do diagnóstico, do número limitante de amostras, por ser extenuante ao leitor e nem sempre se mostra muito específica (BÖSE et al., 1995).

O ELISA-Teste indireto, nas últimas décadas, tem substituído as demais técnicas sorológicas para o diagnóstico de *Babesia* spp. (MACHADO et al., 1997; SOARES et al., 2000; MADRUGA et al., 2001; TRINDADE et al., 2010; COSTA et al., 2015). No entanto, a sensibilidade e a especificidade dos exames são grandemente influenciadas pela qualidade do antígeno utilizado. A técnica do ELISA-Teste tem as vantagens de ser objetiva, possibilitar a avaliação de um grande número de amostras, em curto intervalo de tempo, e de utilizar leitura mecanizada e rápida (SOARES, 2001). Apesar de apresentarem elevadas sensibilidade e especificidade, uma das principais limitações dos métodos sorológicos é que eles apenas indicam a exposição ao agente infeccioso, não informando sobre o curso da infecção (WAGNER et al., 1992).

Os avanços obtidos no campo da biologia molecular tornaram possível o desenvolvimento de novas metodologias para diagnóstico de parasitas baseadas na

detecção de DNA, proporcionando o diagnóstico direto de diversos agentes etiológicos de enfermidades de importância sanitária e econômica para humanos e animais (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003; LEW; JORGENSEN, 2005). Atualmente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido bastante utilizada na investigação desses parasitas, uma vez que apresenta sensibilidade cerca de 100 vezes maior que a técnica de esfregaço sanguíneo, detectando cerca de 10 pg de DNA do parasita em amostras de sangue (BÖSE et al., 1995), e podendo ter essa sensibilidade aumentada ainda mais pela utilização da técnica de *nested* PCR (nPCR) (COSTA JUNIOR et al., 2006).

A aplicação das técnicas baseadas na PCR no diagnóstico da babesiose tem como principal vantagem a possibilidade de discriminar animais soronegativos infectados, como, por exemplo, animais em fases iniciais da infecção (COSSÍO-BAYÚGAR et al., 1997) e distinguir animais soropositivos infectados de animais vacinados (GALE et al., 1996). Essas técnicas permitem, ainda, a confirmação da presença e a discriminação dos parasitos quando em níveis muito baixos no sangue de animais portadores sadios, sendo fundamental para a elaboração de programas de controle da doença (ALMERIA et al., 2001).

As altas especificidade e sensibilidade analítica da PCR já foram verificadas por vários autores (SMEENK et al., 2000; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005; PEREIRA, 2006; COSTA et al., 2015), o que tornou esta técnica uma ferramenta valiosa para realizar estudos epidemiológicos em uma determinada região, permitindo traçar medidas de controle eficazes, principalmente em casos de infecções latentes nos bovinos (FIGUEROA et al., 1992). Essa sensibilidade estimada por PCR e nPCR em bovinos de São Carlos, Estado de São Paulo, para *B. bovis*, estimou a parasitemia correspondente para PCR em 0,000017% e 0,00000017% para nPCR (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005).

2.9 Diversidade genética de *Babesia bovis*

Acredita-se que a diversidade genética seja uma estratégia de sobrevivência de protozoários parasitas (DEITSCH et al., 2009). A variação antigênica, decorrente dessa diversidade genética, resulta em diferentes perfis imunes em animais

hospedeiros (BORGONIO et al., 2008; GENIS et al., 2009).

Estudos anteriores indicaram a presença de diferentes subpopulações de *B. bovis* com características biológicas distintas (TIMMS et al., 1990). Em particular, foram observadas diferenças genéticas e antigênicas entre os antígenos de superfície de merozoítos (MSAs), que são conhecidos como proteínas-âncoras (glicosilfosfatidilinositol-GPI).

A família de antígenos variáveis de superfície de merozoíto de *B. bovis*, inclui o gene MSA-1 e o locus MSA-2. Enquanto o MSA-1 é um gene de cópia única no genoma do isolado T2Bo de *B. bovis*, 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 (HINES et al., 1992) e, por conseguinte, têm sido considerados como antígenos candidatos para o desenvolvimento de vacinas de subunidade para *B. bovis*.

No entanto, os referidos antígenos de superfície são geneticamente diversificados entre isolados de *B. bovis*, e as variações genéticas têm sido associadas a diferenças antigênicas entre diferentes isolados de *B. bovis*. Quando comparados isolados de surtos obtidos a partir de bovinos previamente imunizados com amostras vacinais, revelou-se que os antígenos *msa-1* e *msa-2* de isolados de surtos eram altamente divergentes dos isolados vacinais (BERENS et al., 2005; LEROITH et al., 2005; MOLAD et al., 2014). Portanto, MSAs podem ser valiosos marcadores genéticos, uma vez que diversidade genética de MSAs pode refletir diferenças nas respostas imunes de animais hospedeiros (SIMKING et al., 2013). Dentre os MSAs, *msa-2b* foi considerado ser relativamente um bom marcador que pode separar os isolados de *B. bovis* em diferentes genótipos (GENIS et al., 2009; ALTANGEREL et al., 2012).

Diversos estudos foram realizados utilizando os antígenos variáveis de superfície de merozoítos (MSAs) de *B. bovis* como marcadores genéticos para mostrar a ocorrência da diversidade genética da *B. bovis* em várias regiões geográficas do mundo, tais como na Austrália (BERENS et al., 2005; LEROITH et al., 2005), México (BORGONIO et al., 2008; GENIS et al., 2008, 2009; LAU et al., 2010), Brasil e Gana (NAGANO et al., 2013), Tailândia (SIMKING et al., 2013), Sri

Lanka (SIVAKUMAR et al., 2013), Israel (MOLAD et al., 2014) e Filipinas (TATTIYAPONG et al., 2014), concluindo que as amostras de *B. bovis* nesses países são geneticamente diversificados, de acordo com as sequências de genes de MSAs.

LEROITH et al. (2005) compararam a identidade de sequências de aminoácidos de duas amostras de vacina de *B. bovis* de origem Australiana (vacina T e vacina K) com 14 amostras de surtos de animais vacinados contra *B. bovis* (oito animais vacinados com a vacina T e seis animais vacinados com a vacina K), com base no gene *msa-1*. Ao comparar as sequências de aminoácidos de amostra de vacina T com as sequências de aminoácidos das oito amostras do surto de animais vacinados com a vacina T, foi observada uma baixa identidade (19,8 a 46,7%). Também baixa identidade de sequências de aminoácidos foi observada ao comparar sequências da vacina K com sequências de aminoácidos de animais de surto vacinados com a vacina K, (18,7 a 99%). A variação antigénica causada pela diferença das sequências resultou numa falta de reactividade cruzada imunológica entre amostras de surto.

Ainda, GENIS et al. (2009) utilizaram *msa-2b* como marcador genético para determinar a variação de sequências entre isolados de *B. bovis* provenientes de 16 diferentes localidades no México. A análise comparativa dos nucleotídeos e sequências de aminoácidos revelaram graus distintos de variabilidade e de identidade entre os genes que codificam as proteínas MSA-2b. Os resultados revelaram a identificação de três genótipos distintos e sugeriram que a ocorrência de *indels* dentro da região variável de sequências de *msa-2b* podem ser úteis marcadores para a identificação de um genótipo específico presente em populações de *B. bovis* isoladas de bovinos no México.

Já, LAU et al. (2010) analisaram a diversidade genética e a mutação temporal do gene *msa-1*, membro da família de antígeno de superfície variável de merozoito (VMSA, em animais infectados com *B. bovis*). Vinte e oito genótipos distintos de *msa-1* foram identificados no rebanho. Dois terços dos animais testados modificaram o genótipo dominante de *msa-1* durante um período de seis meses.

Na Mongólia, ALTANGEREL et al. (2012) realizaram um estudo sobre a diversidade genética de *B. bovis* utilizando sequências amplificadas dos genes *msa-*

1, *msa-2b*, e *msa-2c*. As sequências de cada um dos três genes foram homólogas entre os isolados da Mongólia, e posicionados em um único clado filogenético. Em particular, um ramo separado da árvore filogenética do gene *msa-2b* foi formado somente pelos isolados da Mongólia.

Entretanto, SIMKING et al. (2013), estudando a diversidade genética de *B. bovis* na Tailândia com base no gene *msa-2b*, mostraram que as sequências tailandesas estavam dispersas em 8 clados do filograma. A similaridade entre as sequências de aminoácidos deduzidos de MSA-2B obtidos no estudo foi de 68,3-100%. A pesquisa constatou a presença de *B. bovis* em bovinos de todas as localidades investigadas e que as populações do parasita na Tailândia são geneticamente diversificadas.

Interesantemente, NAGANO et al. (2013) estudaram a diversidade genética de *B. bovis* em bovinos do Estado da Bahia, Brasil, Gana e Tailândia com base no gene *msa-1*. As sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* da Tailândia foram relativamente conservadas e posicionaram-se em um único clado do filograma, enquanto que sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* de origem brasileira mostraram alta diversidade genética e se posicionaram em três clados diferentes. Em contraste, as sequências de nucleotídeos obtidas de amostras de DNA do sangue de bovino do Gana se posicionaram em dois diferentes clados, um dos quais continha uma única sequência de Gana. A similaridade entre as sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* da Tailândia, Brasil e Gana foi de 99,0-100%, 57,5-99,4% e 60,3-100%, respectivamente, enquanto que a similaridade entre as sequências de aminoácidos deduzidos foi de 98,4-100%, 59,4-99,7% e 58,7-100%, respectivamente. Estes resultados sugerem que a diversidade genética de *B. bovis* com base em sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* foi alta no Brasil e Gana quando comparados com aqueles da Tailândia. Os resultados também destacam a importância de realizar estudos sobre a diversidade genética de *B. bovis* antes de projetar estratégias de controle imunológico em cada um dos países pesquisados.

Ainda na Tailândia, SIMKING et al. (2013) estudaram a diversidade genética de *B. bovis* em bovinos com base no gene *msa-2b*. Os resultados mostraram que as sequências de nucleotídeos do gene *msa-2b* amplificadas do DNA de sangue de bovinos positivos a *B. bovis* se posicionaram em diversos clados. Três destes clados

eram formados apenas por sequências da Tailândia. A similaridade entre as sequências de aminoácidos do gene MSA-2b estimada variou de 68,3 a 100%. Os pesquisadores constataram que as sequências do gene *msa-2b* amplificadas do DNA de sangue de bovinos positivo a *B. bovis* eram geneticamente diversificadas.

Em um estudo realizado por SIVAKUMAR et al. (2013) em Sri Lanka os pesquisadores estudaram quarenta e quatro amostras de sangue de bovinos de diferentes regiões geográficas do Sri Lanka foram positivas a *B. bovis*, pela cPCR utilizando as sequências dos seguintes genes de MSAs (*msa-1*, *msa-2c*, *msa-2a1*, *msa-2a2*, e *msa-2b*), *ama-1*, e 12D3 genes de *B. bovis*. As sequências do gene *ama-1* e 12D3 foram altamente conservadas, enquanto que as sequências de nucleotídeos dos genes MSAs foram geneticamente diversificadas. O estudo também mostrou que as sequências dos genes de MSA's amplificadas de amostras de DNA positivo a *B. bovis* divergiam geneticamente das sequências de nucleotídeos dos genes MSAs obtidos da vacina de *Babesia bovis* amostra K.

Ainda, MOLAD et al. (2014) demonstraram a diversidade genética entre proteínas de superfície MSA-2a1, MSA-2b e MSA-2c de *Babesia bovis* de amostras positivas a *Babesia bovis* obtidos do DNA do sangue de bovino e do carrapato *Rhipicephalus (B) annulatus*. As mínimas similaridades observadas entre as sequências de aminoácidos deduzidas dos genes MSA-2a1, MSA-2b e MSA-2c foram de 55, 63, e 71%, respectivamente. O estudo permitiu concluir que as proteínas MSA-2 de *B. bovis* isoladas de Israel eram geneticamente diversificadas. Nas análises filogenéticas, as sequências de aminoácidos MSA-2 obtidas dos três genes de amostras de Israel examinadas, agruparam-se em conjunto com sequências derivadas de outros países, comprovando que as sequências do gene *msa-2* de *B. bovis* de Israel partilham os mesmos caracteres genéticos.

Mais recentemente, TATTIYAPONG et al. (2014) pesquisaram a diversidade genética de *B. bovis* em bovinos das Filipinas, com base nos genes que codificam antígenos de superfície de merozoítos (MSAs). Para esse fim foram analisadas quarenta e um amostras de DNA de sangue de bovinos positivas a *B. bovis* para amplificar sequências de genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c*. Na análise filogenética, as sequências de nucleotídeos dos genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* obtidas de amostras de DNA do sangue positivo a *B. bovis* posicionaram-se em clados

diferentes. Nos respectivos filogramas todas as sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* e a maioria das sequências de nucleotídeos do gene *msa-2b* posicionaram-se em clados formados apenas por sequências das Filipinas. Enquanto que todas as sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* das Filipinas mostraram similaridade com as sequências *msa-1* australianos; as sequências de *msa-2b* mostraram similaridade tanto com *msa-2b* Australiano assim como aquelas mexicanas. Em contraste, as sequências de nucleotídeos do gene *msa-2c* posicionaram-se em todos clados do filograma, apesar de um clado ter sido formado exclusivamente por sequências do gene *msa-2c* das filipinas. Similaridade entre as sequências de aminoácidos deduzidas dos genes MSA-1, MSA-2b, e MSA-2c provenientes das Filipinas foram 62,2-100, 73,1-100 e 67,3-100%, respectivamente. Os achados demonstram que a população de *B. bovis* das Filipinas é geneticamente diversificada.

2.10 Controle da babesiose bovina

Depois de mais de um século desde o primeiro relato da Babesiose, em 1888, por Victor Babes (BABÉS, 1888), as opções para o tratamento da doença permanecem limitadas. A falta de compreensão do complexo mecanismo de imunidade na infecção por *Babesia* spp. contribui para o lento desenvolvimento de novas terapias. A raça e a idade, a distribuição do carrapato e o conceito de estabilidade enzoótica são fatores-chave que requerem consideração para o sucesso do controle da babesiose bovina em todo o mundo. Atualmente, o controle e a prevenção da doença clínica dependem de uma combinação de terapias, incluindo o uso de medicamentos anti-*Babesia* e/ou vacinas (GOHIL et al., 2013).

2.10.1 Controle do vetor

Várias tentativas têm sido feitas para desenvolver uma vacina eficaz contra carrapatos. A vacinação de bovinos com antígenos internos de carrapatos demonstrou capacidade de reduzir o número total, o peso e a capacidade reprodutiva de carrapatos ingurgitados (KEMP et al., 1989). O desenvolvimento

destes antígenos resultou na liberação de duas vacinas recombinantes, quase simultaneamente, na década de 1990, na Austrália (TickGARD) e em Cuba (Gavac™), direcionadas contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, relativo a glicoproteína Bm86 do intestino médio (WILLADSEN et al., 1995; CANALES et al., 1997). A eficácia de ambas as vacinas comercialmente disponíveis foi substancialmente variável e, hoje, unicamente Gavac™ continua a ser produzida para os agricultores, principalmente nas Américas (GUERRERO et al., 2012). Desde a liberação destas vacinas, o desenvolvimento da segunda geração de vacinas contra carrapatos tem sido lento; no entanto, alguns laboratórios vêm concentrando seus esforços para identificar novos antígenos (GUERRERO et al., 2012). Grande parte da perda econômica em áreas endêmicas para carrapato é devida ao efeito dos carrapatos por si; mas a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas contra carrapatos terão um impacto sobre o controle da Babesiose e outras doenças transmitidas por eles. Idealmente, a pesquisa contra vacinas de carrapato deve ser realizada em paralelo com o desenvolvimento de vacinas da fase assexuada do parasita no sangue, de modo que, a longo prazo, uma abordagem pragmática para controlar tanto o vetor como a doença possa ser adotada.

2.10.2 Agentes quimioterapêuticos anti-*Babesia bovis*

O sucesso do tratamento da *B. bovis* depende do diagnóstico precoce da doença, seguido da administração imediata de medicamentos quimioterápicos. Atualmente, os antiprotozoários aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb são as únicas drogas disponíveis para a Babesiose bovina, sendo o dipropionato de imidocarb o principal babesícida nas duas últimas décadas (MOSQUEDA et al., 2012). Administrado pela via subcutânea (s.c.) 1,2-3 mg/kg, o dipropionato de imidocarb é o babesícida de eleição para o tratamento da Babesiose bovina; dose alta do mesmo confere proteção de curto prazo à doença clínica causada por *B. bovis* (4 semanas de proteção), *B. bigemina* (8 semanas de proteção) e *B. divergens* (3 a 6 semanas de proteção) (DE WAAL; COMBRINK, 2006; MOSQUEDA et al., 2012). Porém, a preocupação com os resíduos de medicamentos em carnes e produtos lácteos, devido ao tratamento prolongado,

levou à retirada de seu uso em muitos países europeus (ZINTL et al., 2003; DE WAAL; COMBRINK, 2006; MOSQUEDA et al., 2012). É evidente que o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, altamente específicos contra *Babesia* spp, combinado com um perfil de baixa toxicidade contra o hospedeiro, é altamente desejável. Agentes quimioterápicos novos, atualmente em desenvolvimento, foram recentemente revistos (MOSQUEDA et al., 2012).

2.10.3 Vacinação

Levando em conta que a quimioprofilaxia é geralmente de curta duração, e a administração repetida de drogas terapêuticas é demorada e dispendiosa, associado à possibilidade de utilização indevida ou prolongada destes agentes quimioprofiláticos limitados, poderão conduzir ao aparecimento de linhagens de parasitas Imidocarb-resistentes (RODRIGUEZ; TREES, 1996). Portanto, o desenvolvimento de vacinas contra a babesiose bovina deverá ser considerado pesquisa de alta prioridade. Isto, no entanto, tem sido difícil, devido à complexidade e à falta de conhecimento sobre a biologia das babesias. No entanto, desde 1964, uma vacina viva atenuada de *B. bovis* tem sido produzida na Austrália através de passagem múltipla rápida (20-30 passagens) de isolados virulentos de *B. bovis* em bezerros esplenectomizados, o que resulta em drástica redução da virulência do parasita (CALLOW et al., 1979; BOCK et al., 1992; PIPANO, 1995). Embora estas vacinas vivas atenuadas sejam altamente eficazes e têm sido essenciais para o controle da Babesiose bovina em alguns países, a base genética do mecanismo pelo qual estes parasitas se tornam atenuados-virulentos não foi ainda completamente elucidada. Elas também têm um número de limitações, incluindo a curta vida de prateleira, a exigência de uma cadeia de frio, uma eventual contaminação com outros agentes parasitas do sangue, bactérias ou vírus (TIMMS et al., 1990; WRIGHT et al., 1992; HOPE et al., 2005) e a ocorrência de surtos da doença com isolados heterogêneos que são geneticamente distintos do isolado da vacina (BOCK et al., 1992). Além disso, essas vacinas são caras de produzir, e animais vivos, livres de agentes patogênicos específicos, devem ser mantidos para a produção de vacina, se a vacina for produzida a partir de vitelos esplenectomizados

ou em sistemas *in vitro*. Outra preocupação é que, se um isolado de vacina, atenuado, permanece transmissível por carrapatos (como é o caso do isolado Dixie de *B. bovis* da atual vacina Australiana), isto representa uma potencial ameaça, caso a vacina seja usada em situações em que o vetor (carrapato) esteja presente, mas a *B. bovis*, ausente (GOHIL et al., 2013).

O único trabalho que aborda a imunização contra a *Babesia* spp no Brasil foi realizado por MACHADO et al. (1999), os quais imunizaram oito bovinos com antígenos purificados de roptrias de *B. bigemina*. Os resultados mostraram prevenção da parasitemia em sete dos oito animais imunizados, ou seja, 87,5% de proteção em novilhas gestantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar, através de um estudo longitudinal a cada três meses, desde o nascimento até a um ano de idade a frequência de anticorpos IgG anti-*Babesia bovis* e a diversidade genética de *B. bovis* em bezerras naturalmente infectadas pertencentes aos rebanhos bovinos do município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, e município de Taiaçu, Estado de São Paulo, Brasil.

3.2 Objetivos específicos

Realizar a detecção direta de formas evolutivas de *Babesia bovis* em esfregaços sanguíneos e indiretamente pela PCR.

Realizar a detecção de anticorpos IgG anti-*B. bovis* em soros das bezerras, sob estudo.

Avaliar a diversidade genética de *B. bovis* por meio da amplificação de genes de antígenos de superfície de merozoíto (*msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c*).

Comparar filogeneticamente as sequências dos genes, *mas-1*, *mas-2b* e *mas-2c* amplificadas de amostras positivas a *B. bovis* identificadas nas duas regiões deste estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área experimental

No presente estudo, foram utilizados animais de duas propriedades localizadas em áreas endêmicas para *Babesia bovis*. As duas propriedades selecionadas possuíam características voltadas para a produção de leite.

A Fazenda Germânia localiza-se na cidade de Taiaçu, Estado de São Paulo (latitude 21° 15' sul, longitude 48° 29' oeste e altitude de 735 metros), enquanto a Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio) localiza-se na cidade de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro (latitude 22° 48' sul, longitude oeste 43° 41' e altitude de 33 m).

4.2 Delineamento do estudo

Foi efetuado, em ambas as fazendas, um estudo longitudinal. Na Pesagro-Rio, quinze bezerros foram avaliados no período de maio de 2012 a maio de 2013, sendo a região é caracterizada por duas estações distintas: Estação seca (abril a setembro), com média de temperatura de 23°C e precipitação de 170 mm; e chuvosa (outubro a março), com média de temperatura de 26°C e precipitação de 1.320 mm.

Já na Fazenda Germânia, os animais foram avaliados no período compreendido entre junho de 2013 e junho de 2014, sendo a região também caracterizada por duas estações: período seco (abril a setembro), com média da temperatura de 20,9°C e precipitação de 180 mm; e período chuvoso (outubro a março), cuja temperatura média é de 24,4°C e precipitação é de 1.122 mm.

Os animais utilizados no estudo foram selecionados ao acaso, totalizando 30 bezerras nas duas fazendas, os quais foram avaliados trimestralmente, desde o nascimento até aos 12 meses de idade. A primeira colheita de sangue foi realizada logo após a ingestão do colostro materno, porém não mais que uma hora após o nascimento. Assim, foram selecionadas um total de 30 bezerras (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), com mais ou menos a mesma idade, sendo 15 pertencentes à fazenda Pesagro-Rio, e 15 pertencentes à Fazenda Germânia.

O manejo dos animais foi semelhante nas duas propriedades, sendo que, em ambas, as bezerras receberam colostro logo após o nascimento e, sempre que possível, recebiam o colostro da própria mãe; porém, em algumas ocasiões, recorria-se a um banco de colostro existente nas propriedades. Após o nascimento, os animais foram alojados em baias individuais, tendo acesso a uma área com pastagem a partir do 15º dia de vida até os dois meses de idade. Nesse período, os animais recebiam 4,0 litros de leite divididos em duas tomadas diárias. Dos dois aos seis meses, as bezerras eram mantidas, durante o dia, em uma área de pastagem e recolhidas à noite para baias coletivas. Entre os sete e os 12 meses de idade, as bezerras foram transferidas para uma área de pastagem contínua, onde permaneceram durante o dia e a noite.

Na Pesagro-Rio, o sistema de controle do carrapato *R. (B.) microplus* adotado para os animais adultos consistia no fornecimento de sal mineral contendo DIFLY S3® (Diflubenzuron, Champion, Brasil), diariamente, no cocho. O controle de helmintos foi realizado trimestralmente com aplicação de IVOMECC® (Ivermectin, 1 mg/kg, Merial, Brasil) e levamisole (10mg/kg, Ripercol®, Fort Dodge, Brazil). Não se utilizou aos animais medicação específica para hemoparasitas.

Na fazenda Germânia as bezerras também receberam, IVOMECC para o controle de hemintos e carrapatos. Os animais dessa propriedade manifestavam sinais clínicos para tristeza parasitaria, sendo diagnosticado anaplasmosose por Silva et al. (2015). Os animais eram tratados com terramicina (oxitetraciclina, 20 mg/kg Ourofino, Brazil) e Imizol® (Dipropionato de imidocarb 2,1mg/kg Bayer, Brazil).

4.3 Colheita de amostras

Foram colhidas de cada bezerra duas amostras de sangue diretamente da veia jugular ou da veia coccígea. O soro sanguíneo obtido dos tubos sem anticoagulante foi utilizado para realização da sorologia pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoadsorção Enzimático Indireto (iELISA) já o sangue total, colhido em tubo com anticoagulante EDTA (Ácido etilenodiamino Tetra-Acético) foi utilizado para a confecção de esfregaço sanguíneo e extração de DNA para posterior realização da Reação em Cadeia da Polimerase

(PCR).

4.4 Diagnóstico Parasitológico

4.4.1 Esfregaço sanguíneo

Esfregaços sanguíneos de gota fina foram preparados usando sangue colhido da veia periférica (orelha ou cauda), secos à temperatura ambiente, fixados com metanol por 5 minutos, e corados com Giemsa a 10%. Os esfregaços corados foram analisados quanto a presença de formas evolutivas de *B. bovis*, nos eritrócitos, utilizando um microscópio de luz (Olympus 3x4, Tóquio, Japão) amplificação de 100X.

4.5 Diagnóstico sorológico

4.5.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

O antígeno de *B. bovis* usado para confecção de lâminas de RIFI foi obtido a partir de bezerros experimentalmente infectados com a amostra de *B. bovis* [Números de acesso no Genbank *msa-1*: KU522551, *msa- 2b*: KU522552 e *msa-2c*: KU52255], obtida de bovino naturalmente infectado no Rio Grande do Sul, Brasil (MACHADO et al., 1997), e mantida criopreservada em nitrogênio líquido a -196°C. As amostras de soro de bovinos foram diluídas a 1:80 em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (130 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 5,6mM Na₂HPO₄; 1,0 mM KH₂PO₄; 0,8 mM NaH₂PO₄). Foram depositados 10 µL do soro diluído em cada poço das lâminas contendo antígenos de *B. bovis*. Soros controles positivo e negativo para *B. bovis* foram aplicados em cada lâmina. As lâminas foram incubadas a 37°C, por 30 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2, secas, e em cada poço foi adicionado 10 µL de conjugado (Número do catálogo F7887, anti-IgG de bovino, marcado pelo isoticianato de fluoresceína), na diluição 1:300, conforme orientação do fabricante (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) em PBS, contendo azul de

Evans a 0,01%. As lâminas foram incubadas por mais 30 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Procedeu-se novamente a três lavagens consecutivas, por cinco minutos, e secagem. As lâminas foram montadas entre lâmina e lamínula, com glicerina tamponada (9:1 de glicerina/ tampão carbonato-bicarbonato 0,5 M pH 9,6) e, em seguida, observadas ao microscópio equipado com luz ultravioleta (Olympus, BX60, Toquio, Japão), em aumento de 40x. A positividade da reação implicou na observação de fluorescência dos piroplasmas, comparativamente a amostras de soro controles positivo e negativo (MACHADO et al., 1997).

4.5.2 Ensaio de Imunoadsorção Enzimático Indireto (iELISA)

Para a determinação dos níveis de anticorpos da classe IgG anti-*B. bovis* das bezerras, amostras de soro sanguíneo foram submetidas ao ELISA-indireto, segundo protocolo descrito por Machado et al. (1997). A padronização do ELISA-teste indireto foi estabelecida por titulação em blocos, sendo a concentração ótima do antígeno da *B. bovis* de 10 µg/mL.

Foram adicionados, a cada cavidade das microplacas de ELISA (Maxisorp®; Nunc, Thermo Scientific, Brasil), 100 µL de antígeno total de *B. bovis* diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6. Para a sensibilização, as placas foram seladas e incubadas por 12 horas, a 4°C, em câmara úmida. Em seguida as microplacas foram lavadas três vezes com tampão PBS-Tween 20, para a remoção do excesso de antígeno, e, então, bloqueadas com 200 µL de tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6) Tween 20, acrescidos de 6% de soro normal de coelho, e incubadas a 37°C, por 90 minutos. Após três lavagens com tampão PBS-Tween 20, foram adicionados a cada cavidade da placa de ELISA 100µL de cada soro bovino diluídos em PBS-Tween 20, com 5% de soro normal de coelho. As placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida, por 90 minutos, e, em seguida, lavadas com PBS-Tween 20 por três vezes. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de conjugado IgG de coelho anti-IgG de bovino, marcados com fosfatase alcalina (Número de catálogo A0705, Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), diluídos a 1:30.000 em PBS-Tween 20, e acrescidos de 5% de soro normal de coelho, em cada cavidade da placa, a qual foi incubada por 90 minutos, a 37°C. Realizaram-se

três lavagens com PBS-Tween 20 e, finalmente, adicionou-se o substrato da enzima fosfatase alcalina p-nitrofenil fosfato (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), pH 9,8. As placas foram então seladas e incubadas por 45 minutos, à temperatura ambiente. Finalmente, foi determinada a absorbância em espectrofotômetro de microplacas (MRX TC Plus, Dynex Technology, Estados Unidos), filtro de 405 nm. O ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes o valor médio das densidades ópticas dos soros de referência negativos (MACHADO et al., 1997).

4.6 Extração do DNA

O DNA foi extraído das amostras de sangue das bezerras utilizando o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Madison, Estados Unidos). A concentração do DNA e a relação 260/280 de cada amostra foram determinadas utilizando o espectrofotômetro tipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos). Após a extração e a dosagem da concentração, o DNA foi armazenado a -20°C para posterior realização da Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR)

4.7 Reação de Amplificação para o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*)

Para verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA, foi realizada uma reação de PCR para o gene endógeno GAPDH, seguindo o protocolo estabelecido por Birkenheuer, Levy e Breitschwerdt (2003). Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F (5'-CTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'- CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'), que flanqueiam uma região de aproximadamente 500 pb do gene supracitado. A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume final de 25 µL, com uma mistura contendo 5 µL do DNA-amostra, 0,2 µM de cada deoxinucleotídeo, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), tampão da

PCR e água ultrapura esterilizada q.s.p. A sequência térmica e de tempo de amplificação foi de: desnaturação inicial a 95°C, por 5 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C, por 15 segundos, anelamento a 50°C, por 30 segundos, extensão a 72°C, por 30 segundos; e extensão final a 72°C, por 5 minutos (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003).

4.8 Diagnóstico Molecular

4.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para caracterização genotípica de *Babesia bovis*

A fim de se analisar a diversidade genética de *B. bovis*, as amostras de DNA foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR), objetivando a amplificação de sequências completas dos genes *msa-2b* e *msa-2c* e um fragmento do gene *msa-1*. Em todos os ensaios de cPCR, um único oligonucleotídeo iniciador reverso foi utilizado para amplificar fragmentos dos três genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* (TATTIYAPONG et al., 2014). A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho dos produtos (bp) estão apresentados na Tabela 1.

A amplificação por PCR dos genes-alvo foi efetuada tal como descrito anteriormente por Tattiyapong et al. (2014), com pequenas modificações. Resumidamente, a reação de amplificação foi realizada utilizando um volume total de 25 µL, contendo 5 µL do DNA-amostra e uma mistura de reação de 20 µL, que consistia em 10X de tampão de PCR, 1,5 mM MgCl₂, 0,8 mM da mistura dos desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos), e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25 µL (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

A sequência térmica e o tempo de amplificação consistiram em desnaturação inicial de 94°C, por 5 minutos, seguidos de 45 ciclos de desnaturação a 94°C, por 30 segundos, anelamento a 56°C por 1 minuto para MSA-1 e MSA-2b e 58,1 por 1 minuto para MSA-2c, extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de um ciclo de

extensão final a 72°C, durante 5 minutos. Amostra de sangue de bovino positivo para *Babesia bovis* isolado do Rio Grande do Sul [números de acesso do Genbank *msa-1*: Ku522551, *msa-2b*: KU522552 e *msa-2c*: KU522553] e água ultrapura esterilizada (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos produtos amplificados referentes aos ensaios de cPCR para os genes de antígenos de superfície de merozoítos.

| Gene-alvo | Nome | Sequência | Tamanho do Produto (bp) |
|---------------|----------|--------------------------------------|-------------------------|
| <i>msa-1</i> | MSA-1 F | 5'-ATGGCTACGTTTGCTCTTTTCATTTTCAGC-3' | 823-910 |
| | | 5'-AGTACTTACCTTTTAAATGACAGCCG-3' | |
| <i>msa-2b</i> | MSA-2b F | 5'-TCTGTGTCTGCTTCTGAGGAATC-3' | 780-843 |
| <i>msa-2c</i> | MSA-2c F | 5'-CATAATAACCGTTGCATTCTGCTCCATCC-3' | 792-798 |
| | MSA- R | 5'-GCAGAGAGAACGAAGTAGCAGAGAGT-3' | |

Fonte: Tattiyapong et al. (2014).

4.9 Eletroforese de DNA em gel de Agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/50mA, durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos). Os resultados foram visibilizados e analisados em um transiluminador de luz ultravioleta ChemiDoc^{MP} BIO RAD (Imaging System, Estados Unidos), acoplado a um programa computacional de análise de imagens (ChemiDoc MP Imaging System, Bio Rad® Estados Unidos).

4.10 Reação de sequenciamento

4.10.1 Purificação dos amplicómeros

Todos os produtos da PCR que mostraram bandas de alta intensidade e de tamanho esperado foram purificados utilizando o Kit Sílica Bead DNA Gel Extraction (Fermentas, São Paulo-SP, Brasil), segundo as recomendações do fabricante.

4.10.2 Quantificação de DNA dos amplicómeros

A quantificação do material purificado foi realizada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific, Dubuque, Illinois, Estados Unidos), por meio de leitura da absorvância de cada amostra.

4.10.3 Sequenciamento

O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado por meio de técnica automatizada baseada no método de terminação da cadeia, por dideoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados na reação de PCR. O protocolo da reação de sequenciamento foi realizado com algumas modificações à partir daquele descrito pelo fabricante do Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Utilizaram-se 3,5 µL do Tampão 2,5x (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5 mM MgCl₂), 0,5 µL de Big Dye e 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5 µL de água ultrapura e 1,5 µL de DNA, sendo esta quantidade estimada pela verificação de intensidade das bandas em gel de Agarose a 2,0%. As amplificações foram realizadas inicialmente em termociclador (MJ Research-Inc) a 96°C, por 2 minutos, e 35 ciclos de desnaturação a 96°C, por 45 segundos, anelamento por 30 segundos (temperatura de anelamento variou de acordo com o protocolo de PCR para cada gene) e extensão a 60°C, por 4 minutos, e mantidas a 4°C, por tempo indeterminado.

O processo de lavagem das amostras foi realizado, adicionando-se 80 µL

Isopropanol a 75% em cada amostra. A placa foi selada com alumínio e, após incubação por 15 minutos em local escuro, à temperatura ambiente, foi centrifugada a 4.000 g, por 30 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado, e 200 µL de Etanol a 70% foram adicionados, e a placa novamente centrifugada, por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado, e a mesma quantidade de Etanol a 70% foi acrescida, repetindo o passo anterior. A placa foi centrifugada invertida (aceleração e desaceleração 1) e, em seguida, colocada na bomba de vácuo por 5 minutos, para completa secagem das amostras. O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Estados Unidos). As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO – FCAV/UNESP).

4.10.4 Análise filogenética

A qualidade dos eletroferogramas obtida por meio do sequenciamento dos produtos amplificados foi analisada por meio do programa Phred Phrap (EWING et al., 1998), sendo aprovadas apenas as seqüências de nucleotídeos com qualidade Phred ≥ 20 . Adicionalmente, as seqüências-consenso foram obtidas pela análise das seqüências *forward* e *reverse*, utilizando o programa Phred Phrap. Posteriormente, as seqüências obtidas a partir do ensaio de cPCR dos genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* foram alinhadas individualmente com seqüências disponíveis no GenBank, utilizando Clustal/W (31) via Bioedit v. 7.0.5.3 (32). Após o alinhamento, todas as seqüências foram cortadas no mesmo comprimento (com base no tamanho da menor seqüência) e ajustadas manualmente em Bioedit v. 7.0.5.3 (32). A análise filogenética foi feita com base em Máxima Verossimilhança (MV), sendo inferida com RAxML-HPC Black Box 7.6.3 (33) por meio de CIPRES Science Gateway (34). O critério de informação Akaike disponível em Mega 5.05 foi aplicado para identificar o modelo mais adequado de substituição de nucleotídeos. O *bootstrap* foi acessado com 1000 replicatas e as árvores foram editadas no Mega 5.05.

4.10.5 Análise de sequências

A diversidade genética das sequências de *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c*, determinadas no presente estudo foi analisada com base no software DnaSP v5 (LIBRADO; ROZAS, 2009). A identidade das sequências de nucleótidos obtida no presente estudo foi obtida confrontando-as com sequências previamente depositadas no GenBank por meio do BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As sequências de nucleotídeos de *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* foram convertidos em sequências de aminoácidos por meio do programa bioinformático “ExPaSy – Translate tool” (<http://web.expasy.org/translate/>), sendo a porcentagem de identidade e similaridade entre sequências calculada usando a aplicativo EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle).

5 RESULTADOS

5.1 Detecção de *Babesia bovis* em esfregaços sanguíneos

Um total de 150 esfregaços sanguíneos de bovinos foram confeccionados, sendo 75 da Fazenda Pesagro, (Serópedica-RJ) e igual número da Fazenda Germânia, (Taiapu-SP), de 15 bezerras por fazenda, sendo o sangue colhido trimestralmente durante um ano. Foram examinados 30 campos por esfregaço sanguíneo, porém não foram encontradas formas evolutivas de *B. bovis*, em todos os esfregaços analisados, pela microscopia de luz (Tabela 2).

5.2 Frequência de anticorpos IgG anti-*Babesia bovis*

Na 1ª colheita 86,6 % de amostras de soro das bezerras da Fazenda Pesagro (Serópedica- RJ) e 80% das oriundas da Fazenda Germânia, (Taiapu-SP) foram soropositivas à pesquisa de anticorpos IgG anti-*B. bovis* pelos dois testes sorológicos (ELISA e RIFI). Na 2ª colheita, 93,3% de amostras de soro das bezerras das Fazendas Pesagro e Germânia mostraram-se soropositivas pelo ELIA, no entanto pela RIFI, 93,3% e 86,6% de amostras de soro das bezerras da fazenda Germânia e Taiapu, mostraram-se soropositivas, respectivamente. Aos 6 meses de idade, ou seja, na 3ª colheita, todos os animais (100%, 15/15) da Fazenda Pesagro, RJ foram soropositivos a ambos os testes, já na Fazenda Germânia, SP, 93% dos animais foram soropositivos pela RIFI e 100% pelo ELISA. A partir da 4ª colheita, todos os animais foram soropositivos à pesquisa de anticorpos anti-*B. bovis*, em ambas as fazendas, tanto pelo teste ELISA, quanto pela RIFI, situação que se manteve até aos 12 meses de idade (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados percentuais positivos para *B. bovis* detectadas por esfregaços sanguíneos corados, testes sorológicos (ELISA e RIFI) e molecular (cPCR), em bezerras naturalmente infectadas na Fazenda Pesagro, Rio de Janeiro e Fazenda Germânia, São Paulo, Brasil.

| Idade Dias | Porcentagem (%) | | | | | | | |
|---------------|------------------------|----|-------|------|------|------|------|------|
| | Esfregaço Sanguíneo | | ELISA | | RIFI | | cPCR | |
| | RJ | SP | RJ | SP | RJ | SP | RJ | SP |
| 1 | 0 | 0 | 86,6 | 80 | 86,6 | 80 | 0 | 0 |
| 90 | 0 | 0 | 93,3 | 93,3 | 93,3 | 86,6 | 53,3 | 40 |
| 180 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 93 | 66,6 | 73,3 |
| 270 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 80 | 86,7 |
| 360 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 80 | 86,7 |

Número total em cada amostragem foi de 15 animais por fazenda

5.3 Amostras de (cPCR) para *B. bovis* (MSAs)

DNA de sangue das bezerras provenientes de cada colheita, sendo 75 da Fazenda Pesagro e igual número da Fazenda Germânia, mostraram-se positivas ao gene endógeno *GAPDH* (Figura 1). Estas amostras foram avaliadas quanto à presença de DNA de *Babesia bovis*, utilizando-se três genes- alvo: *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c*, do agente, pela cPCR.

As quinze amostras colhidas em cada uma das fazendas, no primeiro dia da colheita, mostraram-se negativas quanto à presença de DNA de *B. bovis*; entretanto na 2ª colheita, ou seja, aos três meses de idade das bezerras, foram encontradas 53,3, (8/15) e 40%, (6/15) de positividade; aos 6 meses de vida 66,6% (10/15) e 73,3 (11/15) foram positivas à *B. bovis* pela cPCR, nas Fazendas Pesagro e Germânia, respectivamente. Um maior número de animais positivos correspondeu a quarta e quinta colheitas, ou seja, aos 270 e 365 dias de vida das bezerras, sendo 80% (12/15) e 86,7 (13/15), nas Fazendas Pesagro e Germânia, respectivamente (Tabela 2).

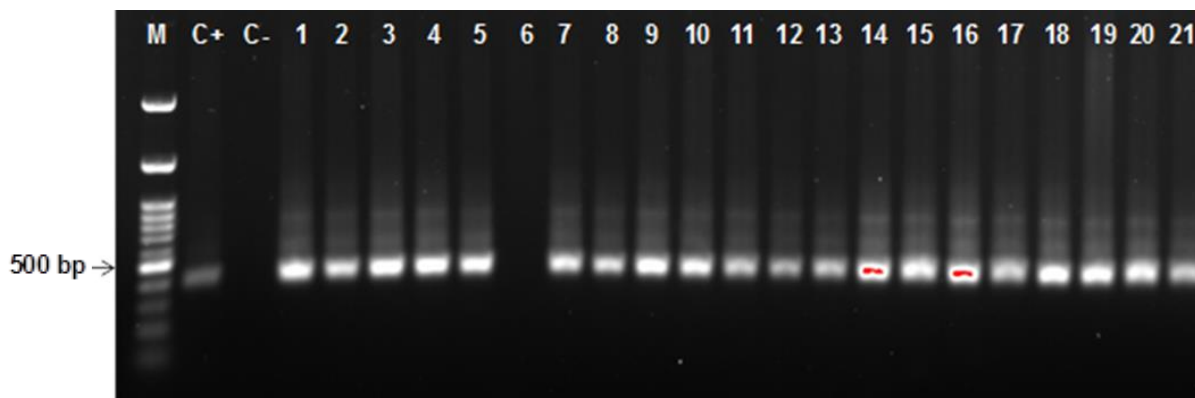


Figura 1. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para o gene endógeno *GAPDH* obtido com os oligonucleotídeos iniciadores F/R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); Canaleta C+: controle positivo (KU522551); Canaleta 6: amostra de bezerra negativa; Canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21: amostra de bezerras positivas; Canaleta C-: branco (água ultrapura esterilizada, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

5.4 Ensaios de (cPCR) para amplificação de fragmentos dos genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* de *B. bovis*

Das 150 amostras de DNA de sangue testadas para presença de fragmentos de três diferentes genes, que codificam proteínas de superfície de *B. bovis*, bandas visíveis foram obtidas em 14 amostras para *msa-1*, 24 para *msa-2b* e 34 para *msa-2c* nos animais da Fazenda Pesagro, (Serópedica-RJ) (Tabela 3) e em 9 amostras para *msa-1*, 28 para *msa-2b* e 34 para *msa-2c* nos animais da Fazenda Germânia, (Taiacu-SP) (Tabela 4) e (Figuras 2, 3 e 4). Os tamanhos dos amplicons dos genes *msa-1*, *msa-2b*, *msa-2c* foram de 809-831, 759-827 e 739-770 pb, respectivamente.

Tabela 3. Resultados das PCRs para os genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* de *B. bovis* em amostras de DNA de sangue das bezerras da Fazenda Pesagro, (Serópedica-RJ).

| Número do Animal | <i>msa-1</i> | | | | | <i>msa-2b</i> | | | | | <i>msa-2c</i> | | | | |
|------------------|--------------------|----|-----------|----|----|---------------|----|-----------|----|----|---------------|----|-----------|----|----|
| | Número de colheita | | | | | | | | | | | | | | |
| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 |
| 36 | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - |
| 37 | - | + | + | - | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | + |
| 38 | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + |
| 40 | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + | + |
| 42 | - | - | + | + | + | - | - | + | + | - | - | + | - | + | + |
| 45 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | + |
| 47 | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + |
| 48 | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | + | - | - | + |
| 54 | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + |
| 55 | - | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - | + | + |
| 59 | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | + |
| 66 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 69 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 70 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 72 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Total | | | 14 | | | | | 24 | | | | | 34 | | |

C1= 1ª colheita; C2= 2ª colheita; C3= 3ª colheita; C4= 4ª colheita; C5= 5ª colheita.

Tabela 4. Resultados das PCRs para os genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* de *B. bovis* em amostras de DNA de sangue das bezerras da Fazenda Germânia, (Taiacu-SP).

| Número do animal | <i>msa-1</i> | | | | | <i>msa-2b</i> | | | | | <i>msa-2c</i> | | | | |
|------------------|--------------------|----|----------|----|----|---------------|----|-----------|----|----|---------------|----|-----------|----|----|
| | Número de colheita | | | | | | | | | | | | | | |
| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 |
| 3937 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3939 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 3940 | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + |
| 3942 | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | + | - |
| 3943 | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | - | + | + | + | + |
| 3944 | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + |
| 3946 | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | + |
| 3947 | - | - | + | + | - | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| 3948 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + |
| 3949 | - | - | + | - | - | - | + | - | + | + | - | + | - | - | + |
| 3950 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - | + |
| 3951 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + |
| 3952 | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + | - | + | + | + | + |
| 3954 | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 3956 | - | - | + | - | + | - | - | + | + | - | - | - | + | + | - |
| Total | | | 9 | | | | | 28 | | | | | 34 | | |

C1= 1ª colheita; C2= 2ª colheita; C3= 3ª colheita; C4= 4ª colheita; C5= 5ª colheita.

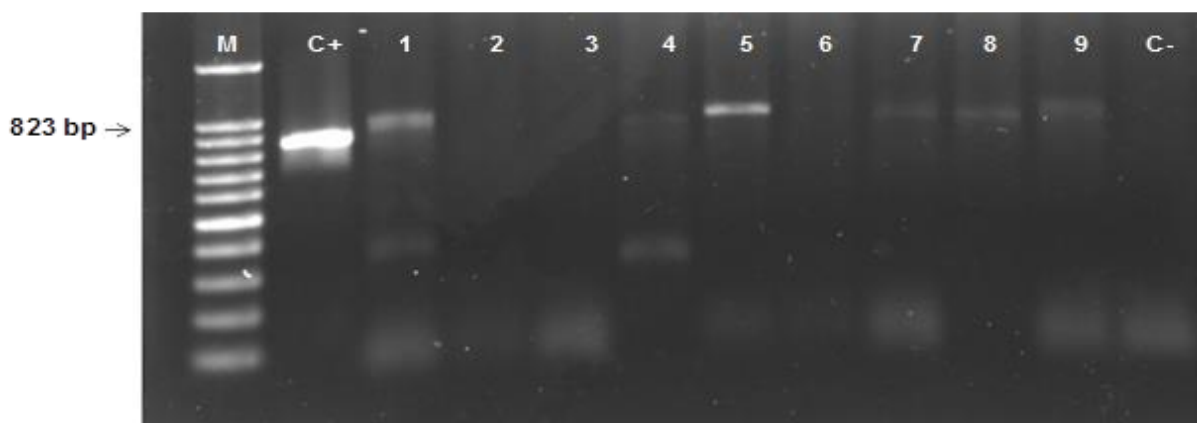


Figura 2. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para o gene *msa-1* de *B. bovis* obtido com os oligonucleotídeos iniciadores MSA-1 F₂/ MSAR. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); Canaleta C+: controle positivo (KU522551); Canaletas 2, 3 e 6: amostra de bovinos negativos; Canaletas 1, 4, 5, 7, 8 e 9: amostra de bovinos positivos; Canaleta C-: branco (água esterilizada ultrapura, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

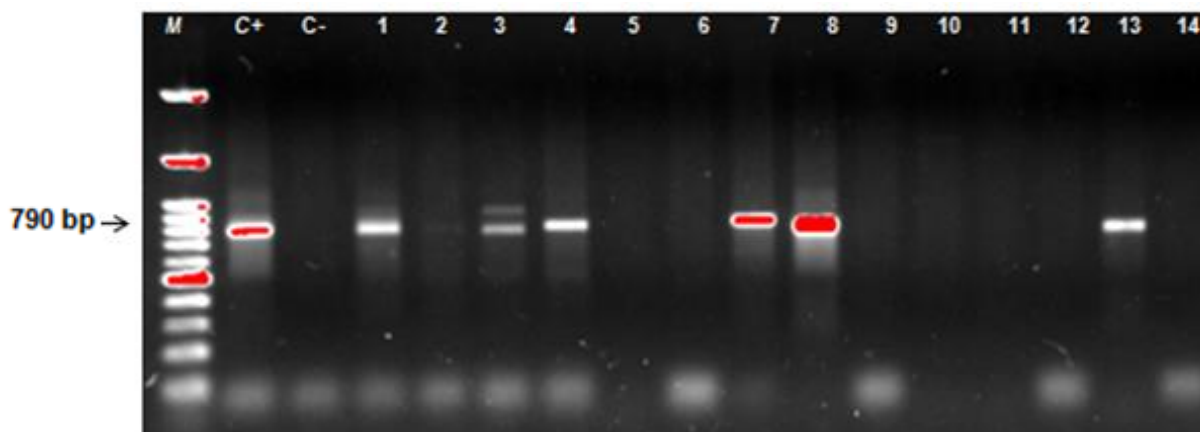


Figura 3. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para o gene *msa-2b* de *B. bovis* obtido com os oligonucleotídeos iniciadores MSA-2B F₂/ MSAR. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); Canaleta C+: controle positivo (KU522552); Canaletas 5, 6, 10, 11, 12 e 14: amostra de bovinos negativos; Canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 e 13: amostra de bovinos positivos; Canaleta C-: branco (água ultrapura esterilizada, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

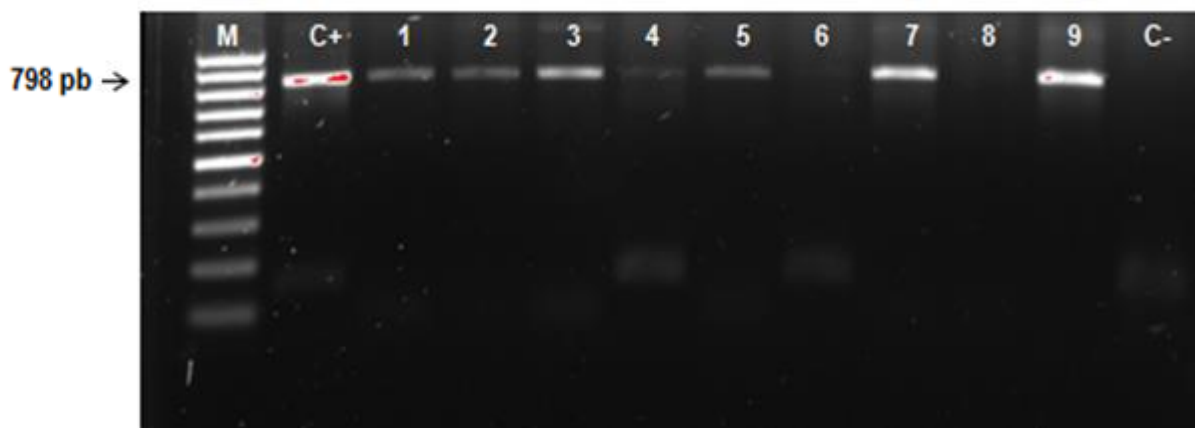


Figura 4. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para o gene *msa-2c* de *B. bovis* obtido com os oligonucleotídeos iniciadores MSA-2c F₂/ MSAR. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); Canaleta C+: controle positivo (KU522553); Canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 9: amostra de bovinos negativos; Canaletas 6 e 8: amostra de bovinos positivos; Canaleta C-: branco (água ultrapura esterilizada, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

Dentre as amostras positivas, foram sequenciadas e depositadas no GenBank 20 sequências de nucleotídeos, sendo oito da Fazenda Pesagro, RJ (três do gene *msa-2b* e cinco sequências do gene *msa-2c*) (Tabela 5) e 12 da Fazenda Germânia, SP (duas do gene *msa-1*, cinco de *msa-2b* e cinco de *msa-2c*) (Tabela 6).

Tabela 5. Número de acessos no GenBank das sequências de fragmentos dos genes *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* detectadas em animais amostrados na Fazenda Pesagro, Seropédica, Rio de Janeiro.

| Animal | Identificação | Período de colheita | Número de acesso no GenBank | |
|--------------|---------------|---------------------|-----------------------------|---------------|
| | | | <i>msa-2b</i> | <i>msa-2c</i> |
| Bovinos | 37 | 5 ^a | | KX160804 |
| | 39 | 4 ^a | | KX463635 |
| | 42 | 3 ^a | KX160815 | KX463634 |
| | 45 | 5 ^a | | KX463632 |
| | 47 | 3 ^a | | KX463633 |
| | 47 | 4 ^a | KX160814 | |
| | 48 | 5 ^a | KX160813 | |
| Total | | | 3 | 5 |

Tabela 6. Número de acessos no GenBank das sequências de fragmentos dos genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* detectadas em animais amostrados na Fazenda Germânia, Taiaçu, São Paulo.

| Animal | Identificação | Período de colheita | Número de acesso no GenBank | | |
|---------|---------------|---------------------|-----------------------------|---------------|---------------|
| | | | <i>msa-1</i> | <i>msa-2b</i> | <i>mas-2c</i> |
| Bovinos | 43 | 2 ^a | | KU522560 | |
| | 43 | 5 ^a | | | KU522563 |
| | 44 | 2 ^a | KX420677 | | |
| | 46 | 3 ^a | | | KU522565 |
| | 47 | 2 ^a | | KU522556 | |
| | 48 | 5 ^a | | | KX420672 |
| | 50 | 3 ^a | | | KX420673 |
| | 52 | 2 ^a | | KX420675 | |
| | 52 | 5 ^a | | | KU522567 |
| | 54 | 3 ^a | KX420676 | | |
| | 57 | 2 ^a | | KU522558 | |
| | 57 | 5 ^a | | KU522562 | |
| | Total | | | 2 | 5 |

5.5 Análise de sequências dos genes *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* detectadas em animais amostrados na Fazenda Pesagro-RJ

A análise pelo BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) revelou que as sequências de nucleotídeos [KX160813] e [KX160814] de um fragmento do gene *msa-2b* da Fazenda Pesagro, (Seropédica-RJ) compartilharam 100 a 98% de identidade com as mesmas sequências do referido gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank (Tabela 7). A terceira sequência de nucleotídeos do gene *msa-2b* [KX160815] da mesma fazenda compartilhou 99 a 100% de identidade com oito sequência de nucleotídeos do mesmo gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank, incluindo quatro sequências de nucleotídeos da fazenda Germânia, (Taiaçu-SP) [KU522558, KU522560, KU522562 e KX420675], amplificadas no presente estudo (Tabela 7).

A sequência de nucleotídeos [KX160804] de um fragmento do gene *msa-2c* (Seropédica-RJ) compartilhou 99 a 98% de identidade com quatro sequências do referido gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank (Tabela 7).

Tabela 7. Sequências amplificadas do DNA do sangue de bezerras da Fazenda Pesagro e sequências previamente submetidas ao GenBank com as quais compartilharam identidade.

| Sequências | % de identidade | Nº de acesso no GenBank | % de cobertura | País de origem da sequência |
|----------------------|-----------------|--|----------------|---|
| MSA-2b | | | | |
| KX160813 KX160814 | 100 - 98 | AB787630 AB745708 FJ422805 FJ422803 | 100 - 97 | Sir Lanka Sir Lanka Argentina Argentina |
| KX160815 | 100 - 99 | KJ144350 LC004313 LC004311 AB787628 KU522558 KU522560 KU522562 KX420675 | 100 | Israel Vietnã Vietnã Sir Lanka SP-Brasil SP-Brasil SP-Brasil SP-Brasil |
| MSA-2c | | | | |
| KX160804 | 99 - 98 | KJ144255 FJ422796 FJ422794 KC515390 | 100 | Israel Argentina Argentina Turquia |
| KX463632 KX463634 | 99 - 98 | KX420672 KJ144256 AK441598 AB787597 AB612259 | 100 | SP-Brasil Israel USA Sir Lanka Mongolia |
| KX463633 | 94 - 93 | LC004369 KJ144256 LC004362 LC004358 HM352731 HM352732 HM352734 HM352735 | 100 | Vietnã Israel Vietnã Vietnã MS-Brasil BA-Brasil SP-Brasil RS-Brasil |
| KX463635 | 97 | LC004347 LC004346 AB819802 AB819801 | 100 | Vietnã Vietnã Filipinas Filipinas |

Duas sequências de nucleotídeos da Seropédica, RJ [KX463632 e KX463634] de um fragmento do gene *msa-2c* compartilharam 99 a 98% de identidade com quatro sequências de nucleotídeos do mesmo gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank (Tabela 7). A quarta sequência de nucleotídeos [KX463633] do mesmo gene e do mesmo local compartilhou 94 a 93% de identidade com oito sequências de nucleotídeos do referido gene de *B. bovis*, previamente submetidas ao GenBank, incluindo quatro sequências de nucleotídeos descritas em trabalhos realizados no Brasil, dos seguintes estados: São Paulo [HM352734], Mato Grosso do Sul [HM352731], Rio Grande do Sul [HM352735] e Bahia [HM352732] (Tabela 7). Finalmente a quinta sequência de nucleotídeos [KX463635] de um fragmento do gene *msa-2c* de amostras de Seropédica, RJ compartilhou 97% de identidade com quatro sequências do referido gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank (Tabela 7).

A diversidade de nucleotídeos por local (Pi), calculada pelo programa DnaSP v5, foi alta para as sequências do *msa-2b* (0,14394) e baixa para *msa-2c* (0,06008). A porcentagem de identidade de sequência de aminoácidos, calculada pelo programa Emboss Needle, foi mais baixa para as sequências do gene *msa-2b* (61,7-94,2%) do que para as sequências *msa-2c* (84,3-99,1%). A porcentagem de similaridade também foi baixa para as sequências de aminoácidos do gene *msa-2b* (72,6-96,5%) e alta para as sequências *msa-2c* (89,2-99,5%) (Tabela 8).

Tabela 8. Diversidade de nucleotídeos, identidade e similaridade de sequências de aminoácidos dos genes *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* detectadas em animais amostrados na Fazenda Pesagro, Seropédica-RJ.

| Gene | Número de sequências | PI ± DP | Identidade (%) | Similaridade (%) |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------|------------------|
| MSA-2b | 3 | 0,14394 ± SD 0,06093 | 61,7-94,2 | 72,6-96,5 |
| MSA-2c | 5 | 0,06008 ± SD 0,01240 | 84,3-99,1 | 89,2-99,5 |

Pi = diversidade de nucleotídeos por local; DP = desvio-padrão.

Duas sequências de nucleotídeos [KX160813 e KX160814] do gene *msa-2b* amplificadas do DNA de sangue de bezerras da Fazenda Pesagro, (Seropédica-RJ)

mostraram alta identidade e similaridade de sequência de aminoácidos entre si, 94,2% e 96,5%, respectivamente (Tabelas 9 e 10). A terceira sequência de nucleotídeos [KX160815] do mesmo gene e do mesmo local mostrou baixa identidade (61,7-64,0) e baixa similaridade (72,6-74,2) de sequências de aminoácidos com as duas sequências anteriores (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9. Identidade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-2b de *B. bovis* da Fazenda Pesagro, RJ.

| Sequências | 1 | 2 | 3 |
|-------------------|----------|----------|----------|
| KX160813 1 | 100% | 94,2% | 61,7% |
| KX160814 2 | 94,2% | 100% | 64,0% |
| KX160815 3 | 61,7% | 64,0% | 100% |

Tabela 10. Similaridade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-2b de *B. bovis* da Fazenda Pesagro, RJ.

| Sequências | 1 | 2 | 3 |
|-------------------|----------|----------|----------|
| KX160813 1 | 100% | 96,5% | 72,6% |
| KX160814 2 | 96,5% | 100% | 74,2% |
| KX160815 3 | 72,6% | 74,2% | 100% |

Dentre as cinco sequências de nucleotídeos do gene *msa-2c* amplificadas de amostras de DNA do sangue de bezerras positivas a *B. bovis* da fazenda Pesagro, (Seropédica-RJ) apenas uma sequência (KX463633) mostrou baixa identidade (94%) com sequências previamente submetidas ao GenBank e 93% de identidade com sequências anteriormente amplificadas por Ramos et al. (2012), a mesma sequência apresentou baixa identidade (84,3-90,7) e similaridade (89,2-95,4) de sequências de aminoácidos com outras sequências de nucleotídeos do mesmo gene e da mesma fazenda (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Identidade de seqüências de aminoácidos da proteína MSA-2c de *B. bovis* da Fazenda Pesagro, RJ.

| Seqüências | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| KX160804 1 | 100% | 89,7% | 84,3% | 89,7% | 89,2% |
| KX463632 2 | 89,7% | 100% | 89,9% | 99,1% | 90,8% |
| KX463633 3 | 84,3% | 89,9% | 100% | 90,7% | 86,2% |
| KX463634 4 | 89,7% | 99,1% | 90,7% | 100% | 90,8% |
| KX463635 5 | 89,2% | 90,8% | 86,2% | 90,8% | 100% |

Tabela 12. Similaridade de seqüências de aminoácidos da proteína MSA-2c de *B. bovis* da Fazenda Pesagro, RJ.

| Seqüências | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| KX160804 1 | 100% | 94,2% | 89,2% | 93,7% | 92,4% |
| KX463632 2 | 94,2% | 100% | 94,9% | 99,5 | 96,8 |
| KX463633 3 | 89,2% | 94,9% | 100% | 95,4 | 92,6% |
| KX463634 4 | 93,7% | 99,5% | 95,4% | 100% | 96,3% |
| KX463635 5 | 92,4% | 96,8% | 92,6% | 96,3 | 100% |

5.6 Análise de seqüências dos genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* detectadas em animais amostrados na Fazenda Germânia-SP

A análise pelo BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) revelou que a seqüência de nucleotídeos [KX420676] de um fragmento do gene *msa-1* da Fazenda Germânia, (Taiacu-SP) compartilhou 89% de identidade com quatro seqüência do referido gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank, enquanto a outra seqüência de nucleotídeos [KX420677] do mesmo gene e da mesma fazenda compartilhou 99% de identidade de seqüência de nucleotídeos com duas seqüência do mesmo gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank (Tabela 13).

Tabela 13. Sequências amplificadas do DNA de sangue de bezerras da Fazenda Germânia e sequências previamente submetidas ao GenBank com as quais compartilharam identidade.

| Sequências do Presente Estudo | % de Identidade | Número de acesso no Genbank | % de cobertura da Sequência | País de origem da Sequência |
|--|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| MSA-1 | | | | |
| KX420676 | 89 | LC099016 | 83 | Tailândia |
| | | LC099015 | | Tailândia |
| | | LC099014 | | Tailândia |
| | | LC099013 | | Tailândia |
| | | LC004306 | | Tailândia |
| KX420677 | 99 | LC099082 | 100 | Tailândia |
| | | LC099083 | | Tailândia |
| MSA-2b | | | | |
| KX420675 KU522558 KU522560 KU522562 | 100 - 97 | KJ144350 | 100 - 99 | Israel |
| | | LC004311 | | Vietnã |
| | | LC004313 | | Vietnã |
| | | AB787620 | | Sir Lanka |
| | | AB787628 | | Sir Lanka |
| KU522556 | 99 | KX160815 | 100 - 99 | RJ-Brasil |
| | | AB745715 | | Tailândia |
| | | AK441805 | | USA |
| | | AY052538 | | México |
| | | FJ422802 | | México |
| MSA-2c | | | | |
| KU522563 | 98 - 97 | AB787587 | 100 | Sir Lanka |
| | | AB787585 | | Sir Lanka |
| | | KJ144257 | | Israel |
| | | KJ144257 | | Israel |
| KU522565 KU522567 KX420672 KX420673 | 99 | AB819804 | 100 - 97 | Filipinas |
| | | AK442374 | | USA |
| | | KJ144256 | | Israel |
| | | EF640956 | | México |
| | | AB787582 | | Sir Lanka |
| | | HM352731 | | MS-Brasil |
| | | HM352732 | | BA-Brasil |
| | | HM352734 | | SP-Brasil |
| HM352735 | RS-Brasil | | | |

Quatro sequências de nucleotídeos [KU522558, KU522560, KU522562 e KX420675] de um fragmento do gene *msa-2b* da Fazenda Germânia, (Taiapu-SP) compartilharam 97 a 100% de identidade com seis sequência de nucleotídeos do referido gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank, incluindo uma sequência de nucleotídeos [KX160815] da fazenda Pesagro, (Serópedica-RJ), amplificada no presente estudo (Tabela 9). A quinta sequência de nucleotídeos [KU522556] de um fragmento do gene *msa-2b* da Fazenda Germânia, (Taiapu-SP) compartilhou 99% de identidade com quatro sequências do referido gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank (Tabela 13).

A sequência de Nucleotídeos [KU522563] de um fragmento do gene *msa-2c* da Fazenda Germânia, (Taiapu-SP) compartilhou 98 a 97% de identidade com quatro sequências do mesmo gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank (Tabela 13). Quatro sequências de nucleotídeos [KU522565, KU522567, KX420672 e KX420673] do mesmo gene e da mesma fazenda compartilhou 100 a 97% de identidade com seis sequência do referido gene de *B. bovis* previamente submetidas ao GenBank, incluindo quatro sequências de nucleotídeos descritas em trabalhos realizados no Brasil, previamente depositadas no GenBank, dos seguintes Estados: São Paulo [HM352734], Mato Grosso do Sul [HM352731], Rio Grande do Sul [HM352735] e Bahia [HM352732] (Tabela 13).

A diversidade de nucleotídeos por local (Pi), calculada pelo programa DnaSP v5, foi alta para as sequências dos genes *msa-1* (0,39503) e *msa-2b* (0,10887) e baixa para *msa-2c* (0,01918). A porcentagem de identidade de sequências de aminoácidos, calculada pelo programa Emboss Needle, foi mais baixa para as sequências dos genes *msa-1* (43,6%) e *msa-2b* (53,3-100%) do que para as sequências do gene *msa-2c* (81-98,2). A porcentagem de similaridade também foi baixa para as sequências do gene *msa-1* (58,8%) e *msa-2b* (65-98,7) e alta para as sequências *msa-2c* (83,9-96,6%) (Tabela 14).

Tabela 14. Diversidade de nucleotídeos, identidade e similaridade de sequências de aminoácidos dos genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* detectadas em animais amostrados na Fazenda Germânia, Taiaçu, São Paulo.

| Gene | Número de sequências | PI ± DP | Identidade (%) | Similaridade |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------|--------------|
| <i>msa-1</i> | 2 | 0,39503 ± SD 0,19752 | 43,6% | 58,8% |
| <i>msa-2b</i> | 5 | 0,10887 ± SD 0,05774 | 53,3-100% | 65,0-100% |
| <i>msa-2c</i> | 5 | 0,01918 ± SD 0,00372 | 81,0-98,2% | 83,9-98,6% |

Pi = diversidade de nucleotídeos por local; DP = desvio-padrão.

Duas sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* amplificadas de amostras de DNA de sangue positivo a *B. bovis* de bezerras da fazenda Germânia (Taiaçu-SP) apresentaram uma baixa identidade (43,6%) e similaridade (58,8%) de sequência de aminoácidos entre si (Tabelas 15 e 16).

Tabela 15. Identidade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-1 de *B. bovis* das bezerras da Fazenda Germânia, SP.

| Sequência | 1 | 2 |
|-----------|-------|-------|
| KX420676 | 100% | 43,6% |
| KX420677 | 43,6% | 100% |

Tabela 16. Similaridade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-1 de *B. bovis* das bezerras da Fazenda Germânia, SP.

| Sequência | 1 | 2 |
|-----------|-------|-------|
| KX420676 | 100% | 58,8% |
| KX420677 | 58,8% | 100% |

Dentre as cinco sequências de nucleotídeos do gene *msa-2b* amplificadas do DNA de sangue positivo a *B. bovis* de bezerras da fazenda Germânia, (Taiaçu-SP) quatro [KU522558, KU522560, KU522562 e KX420675] mostraram alta identidade e

similaridade de sequências de aminoácidos (97,8-99,7%) e (97,8-99,1%), respectivamente. A quinta sequência de nucleotídeos [KU522556] mostrou baixa identidade (53,3-54,1) e similaridade (65,0-65,8) de sequências de aminoácidos com as quatro sequências anteriores (Tabelas 17 e 18).

Tabela 17. Identidade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-2b de *B. bovis* das bezerras da Fazenda Germânia, SP.

| Sequências | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| KX420675 1 | 100% | 53,3% | 99,1% | 97,8% | 99,1% |
| KU522556 2 | 53,3% | 100% | 54,1% | 54,1% | 54,1% |
| KU522558 3 | 99,1% | 54,1% | 100% | 98,1% | 100% |
| KU522560 4 | 97,8% | 54,1% | 98,1% | 100% | 98,7% |
| KU522562 5 | 99,1% | 54,1% | 100% | 98,7% | 100% |

Tabela 18. Similaridade de sequências de aminoácidos da proteína MSA-2b de *B. bovis* das bezerras da Fazenda Germânia, SP.

| Sequências | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| KX420675 1 | 100% | 65,0% | 99,1% | 97,8% | 99,1% |
| KU522556 2 | 65,0% | 100% | 65,8% | 66,1% | 65,8% |
| KU522558 3 | 99,1% | 65,8% | 100% | 98,1% | 100% |
| KU522560 4 | 97,8% | 66,1% | 98,7% | 100% | 98,7% |
| KU522562 5 | 99,1% | 65,8% | 100% | 98,7% | 100% |

Em geral, as sequências de nucleotídeos do gene *msa-2c* amplificadas de amostras do DNA de sangue de bezerras da fazenda Germânia, (Taiaçú-SP) mostraram alta identidade e similaridade entre si. Porém a sequência de nucleotídeos [KU522563] apresentou relativamente uma baixa identidade (81,0-83,5) e similaridade (83,9-85,5) de sequências de aminoácidos em relação as outras

sequências do mesmo gene e do mesmo local (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19. Identidade de sequências de aminoácidos do gene MSA-2c de *B. bovis* das bezerras da fazenda Germânia, SP.

| Sequências | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| KU522563 1 | 100% | 82,3% | 83,5% | 82,4% | 81,0% |
| KX420672 2 | 82,3% | 100% | 96,8% | 98,2% | 96,8% |
| KX420673 3 | 83,5% | 96,8% | 100% | 95,9% | 95,4% |
| KU522567 4 | 82,4% | 98,2% | 95,9% | 100% | 95,0% |
| KU522565 5 | 81,0% | 96,8% | 95,4% | 95,0% | 100% |

Tabela 20. Similaridade das sequências de aminoácidos da proteína MSA-2c de *B. bovis* das bezerras da fazenda Germânia, SP.

| Sequências | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| KU522563 1 | 100% | 85,1% | 85,1% | 84,8% | 83,9% |
| KX420672 2 | 85,1% | 100% | 98,6% | 98,6% | 97,7% |
| KX420673 3 | 85,1% | 98,6% | 100% | 97,3% | 97,2% |
| KU522567 4 | 84,8% | 98,6% | 97,3% | 100% | 96,4% |
| KU522565 5 | 83,9% | 100% | 96,4% | 96,4% | 100% |

5.7 Análise filogenética de sequências dos genes *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* amplificadas em amostras de animais da Fazenda Pesagro, RJ

As sequências determinadas no presente estudo, em conjunto com aquelas disponíveis no GenBank, foram utilizadas para a construção de duas árvores filogenéticas, separadamente. A árvore filogenética, com base no método de máxima verossimilhança e modelo evolutivo GTR+G+I de sequências de nucleotídeos do gene *msa-2b* de *B. bovis* detectadas em bovinos da Fazenda

Pesagro, (Seropédica-RJ) dividiu as sequências em seis clados, como mostrado na Figura 5. As sequências de nucleotídeos de Seropédica, RJ posicionaram-se em dois clados (clados 1 e 6). O clado 1 foi formado por duas sequências de Seropédica, RJ [KX160813 e KX160814] e sequências de Sri Lanka, Tailândia, Vietnã, Filipinas e Argentina. No clado 3, posicionaram-se quatro sequências, duas dos Estados Unidos da América, uma do Brasil (Taiapu, SP) e a outra da Tailândia.

O sexto clado foi formado por uma sequência do Sri Lanka, Israel e Vietnã, respectivamente, incluindo cinco sequências Brasileiras, uma de Seropédica, RJ [KX160815] e quatro sequências de nucleotídeos de Taiapu, SP [KX420675, KU522562, KU522560, KU522558].

A análise filogenética com base no método de máxima verossimilhança e modelo evolutivo GTR+G+I de sequências de nucleotídeos do gene *msa-2c* de *B. bovis* detectadas em bovinos da Fazenda Pesagro, (Seropédica-RJ) dividiu as sequências em quatro clados, como mostrado na Figura 6. Sequências de isolados de *B. bovis* do Brasil posicionaram-se em dois clados (clados 3 e 4). No clado 3, posicionou-se apenas uma sequência de Seropédica, RJ [KX463633] e no clado 4 posicionaram-se quatro sequências de Seropédica, RJ [KX463632, KX463634, KX160804 e KX463635] e cinco sequências de Taiapu, SP [KU522563, KU522565, KU522567, KX420672 e KX420673], determinadas neste estudo, e outras três sequências de três estados do Brasil, São Paulo [HM352734], Mato Grosso do Sul [HM352731] e Rio Grande do Sul [HM352735], previamente depositadas no GenBank.

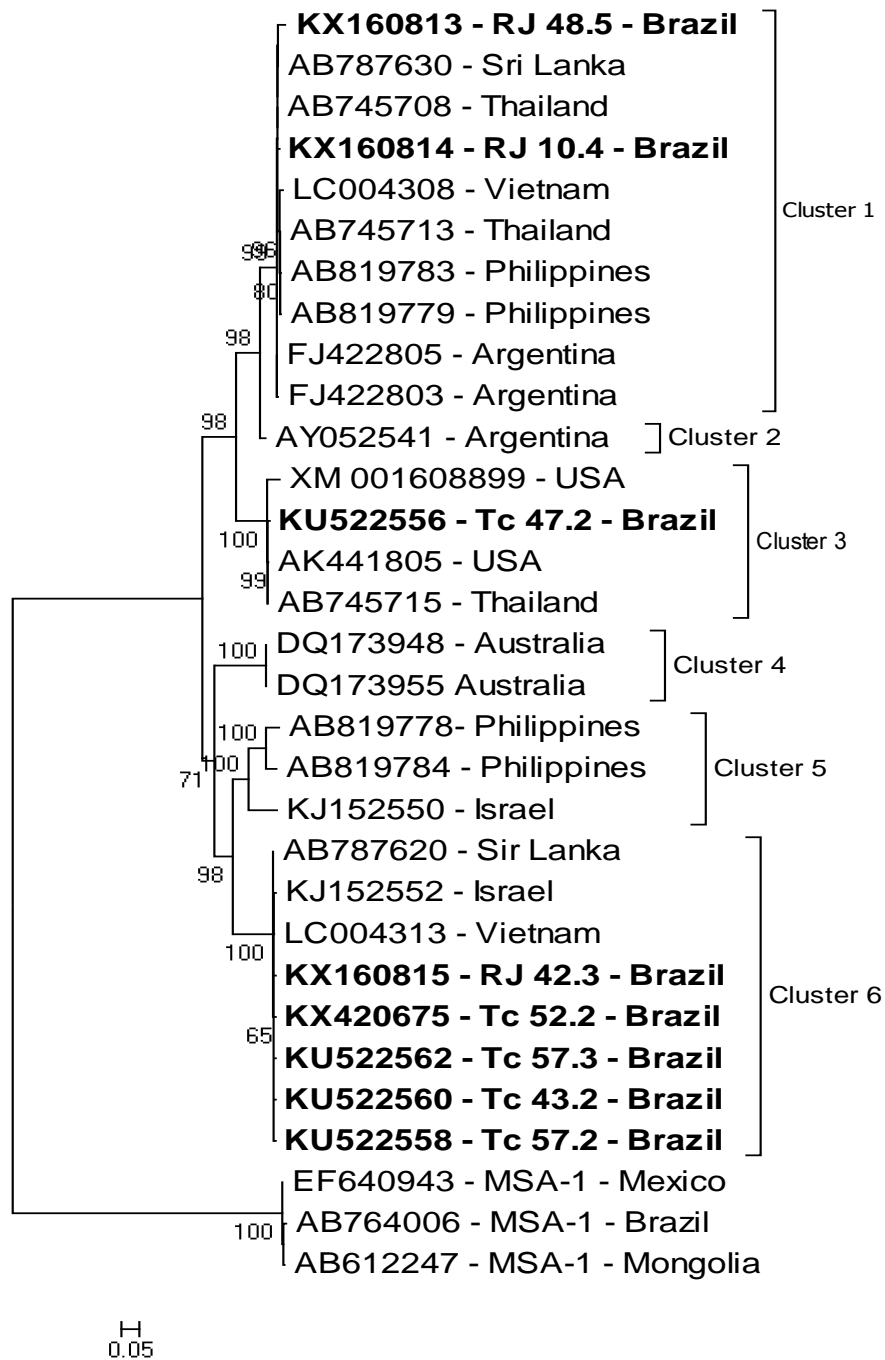


Figura 5. Análise filogenética das sequências do gene *msa-2b* de *B. bovis*. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o modelo evolutivo GTR+G+I. Os números nos nós correspondem a valores de *bootstrap* superiores a 60% acessado com 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências do gene *msa-1* como grupo externo.

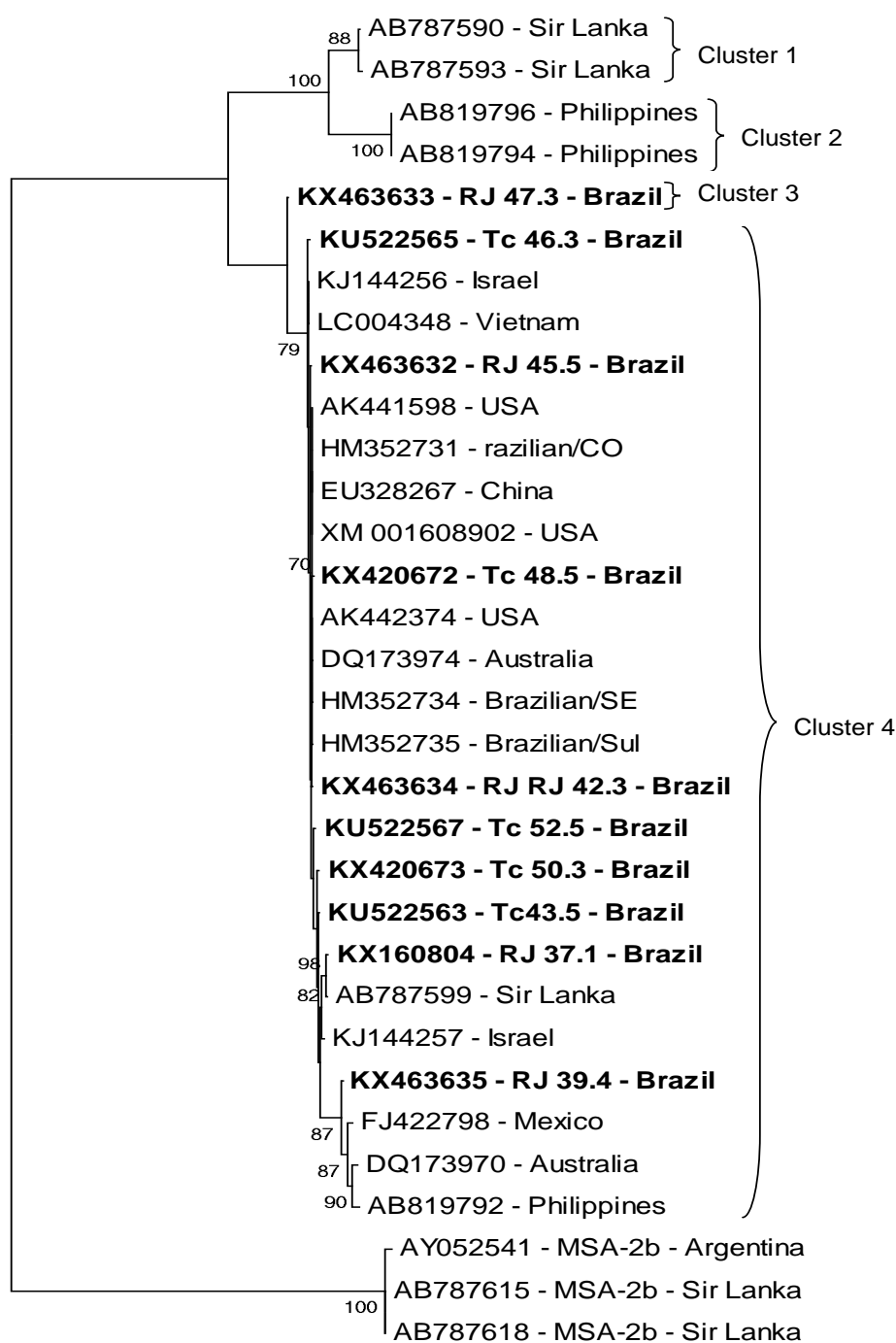


Figura 6. Análise filogenética das sequências do gene *msa-2c* de *B. bovis*. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o modelo evolutivo GTR+G+I. Os números nos nós correspondem a valores de *bootstrap* superiores a 60% acessado com 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências do gene *msa-2b* como grupo externo.

5.8 Análise filogenética de sequências dos genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* amplificadas em amostras de animais da Fazenda Germânia, SP

A árvore filogenética, com base no método de máxima verossimilhança e modelo evolutivo GTR+G+I de sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* de *B. bovis*, detectadas em bovinos da fazenda Germânia, (Taiapu-SP) em conjunto com aquelas disponíveis no GenBank, dividiu as sequências em dez clados, como mostrado na Figura 7. O clado 1 foi formado por sequências de *B. bovis* de bovinos previamente amostradas no Estado da Bahia, Tailândia, Mongólia, México, Estados Unidos da América e Gana. As sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* da Fazenda Germânia, (Taiapu-SP) posicionaram-se em dois clados diferentes (clados 5 e 10). O clado 5 foi formado por quatro sequências de nucleotídeos, uma de Taiapu, SP [KX420677], duas da Tailândia e uma da Austrália. Finalmente, o clado 10 foi formado por três sequências de nucleotídeos, uma sequência de nucleotídeos amplificada no presente estudo [KX420676], uma do Vietnã e outra da Tailândia.

A árvore filogenética, com base no método de máxima verossimilhança e modelo evolutivo GTR+G+I, as sequências do gene *msa-2b* agruparam-se em sete clados (Figura 8), e as sequências de *msa-2b* amplificadas no presente estudo, posicionaram-se em dois desses clados (clados 1 e 7). O clado 1 foi formado por dez sequências de nucleotídeos de *msa-2b* de *B. bovis*, sendo quatro sequências de nucleotídeos de Taiapu, SP [KU522562, KU522560, KX420675 e KU522558], uma de Israel, duas do Vietnã e três sequências de Sri Lanka. O sétimo clado foi formado por três sequências de nucleotídeos do México, uma de Taiapu, SP [KU522556], duas dos Estados unidos da América e uma da Tailândia. A análise filogenética, com base no método de máxima verossimilhança e modelo evolutivo GTR+G+I e com baseada nas sequências do gene *msa-2c*, mostrou quatro clados (Figura 9). Sequências de *B. bovis* do presente estudo posicionaram-se em um único clado (clado 4). No clado 4, posicionaram-se cinco das sequências da fazenda Germânia, (Taiapu-SP) [KU522563, KU522565, Ku522567, KX420672 e KX420673], determinadas neste estudo, e outras três sequências do Brasil, dos seguintes estados: São Paulo [HM352734], Mato Grosso do Sul [HM352731] e Rio Grande do Sul [HM352735], mostradas anteriormente (RAMOS et al., 2012).

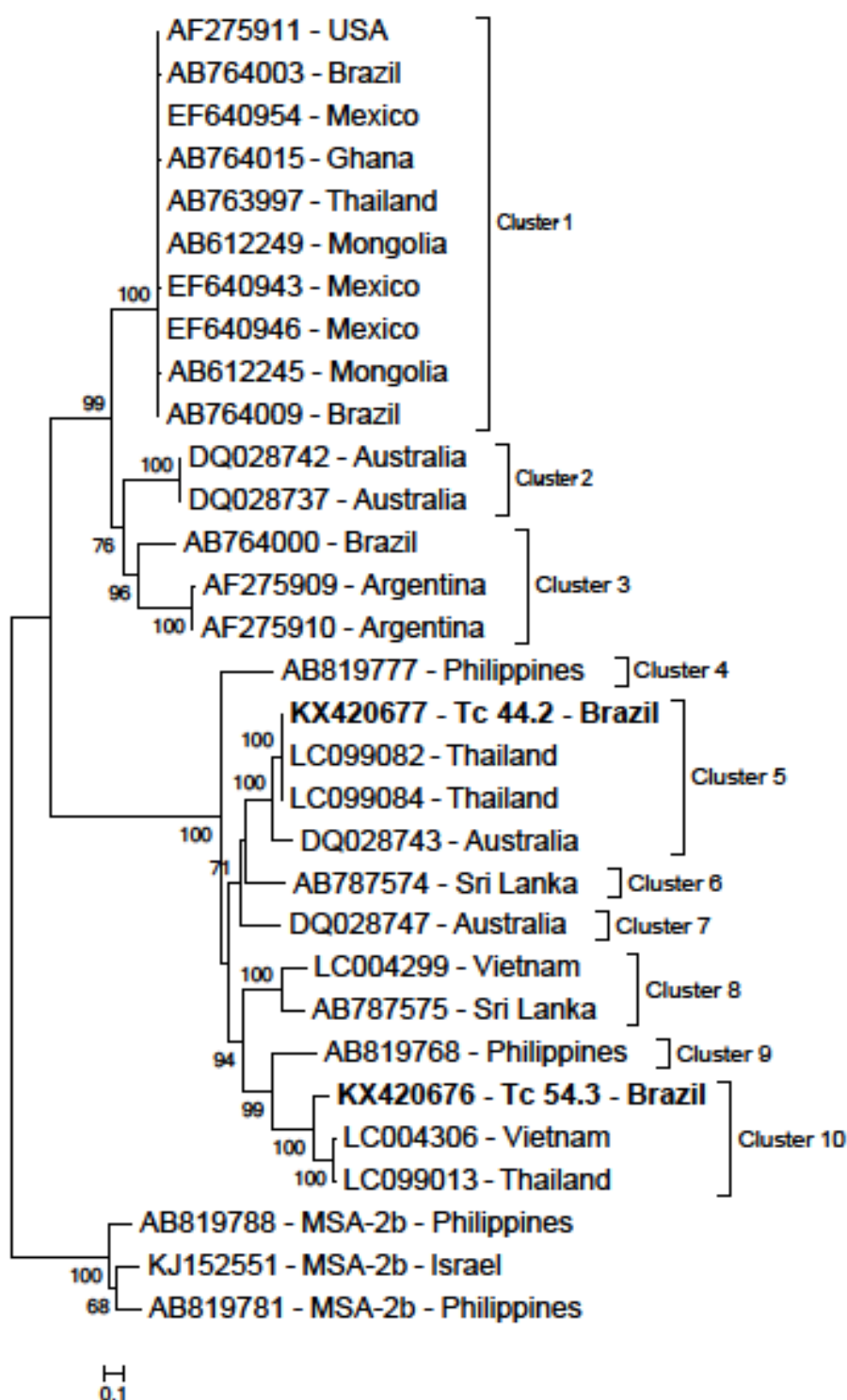


Figura 7. Análise filogenética das sequências do gene *msa-1* de *B. bovis*. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o modelo evolutivo GTR+G. Os números nos nós correspondem a valores de *bootstrap* superiores a 60% acessado com 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências do gene *msa-2b* como grupo externo.

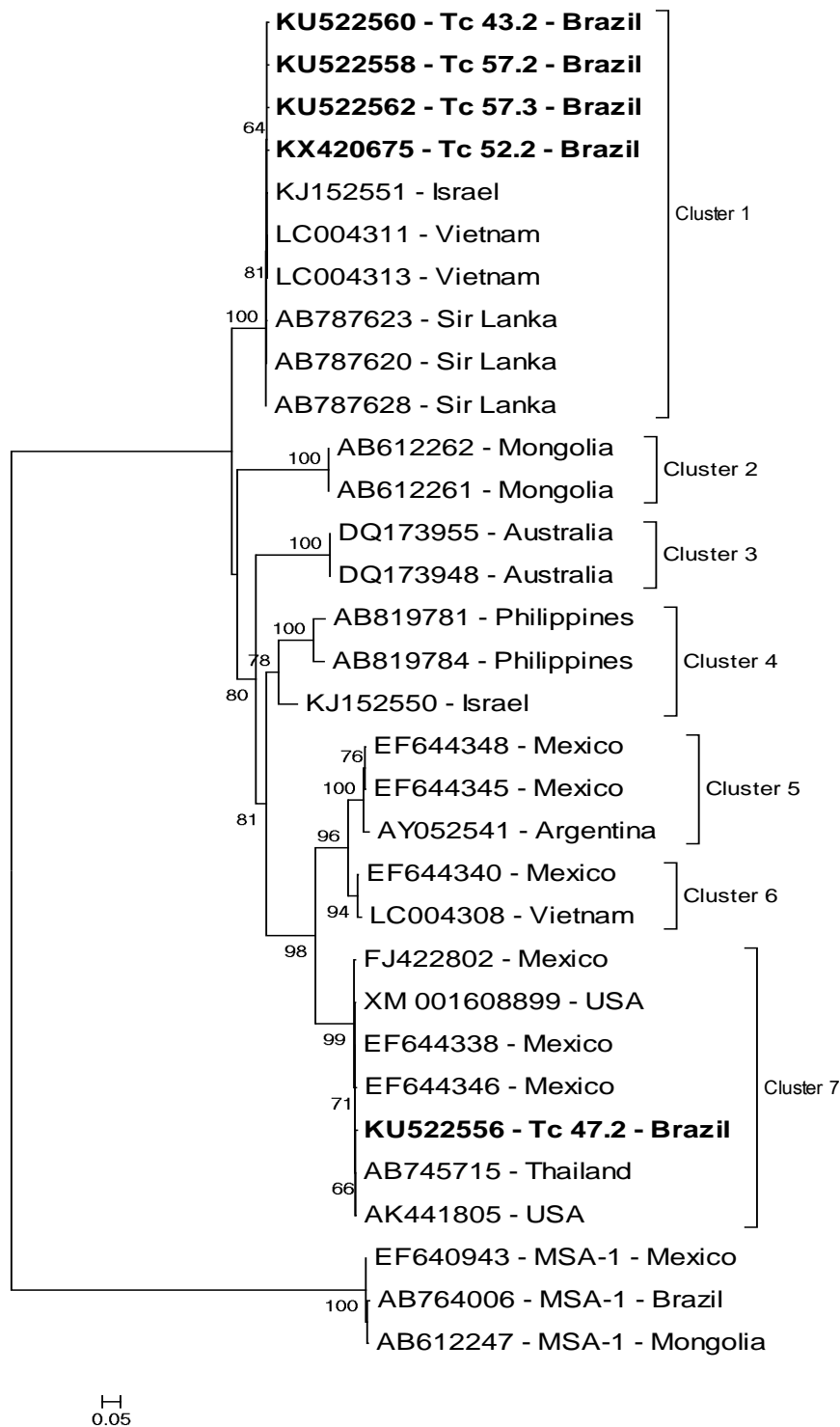


Figura 8. Análise filogenética das sequências do gene *msa-2b* de *B. bovis*. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o modelo evolutivo GTR+G+I. Os números nos nós correspondem a valores de *bootstrap* superiores a 60% acessado com 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências do gene *msa-1* como grupo externo.

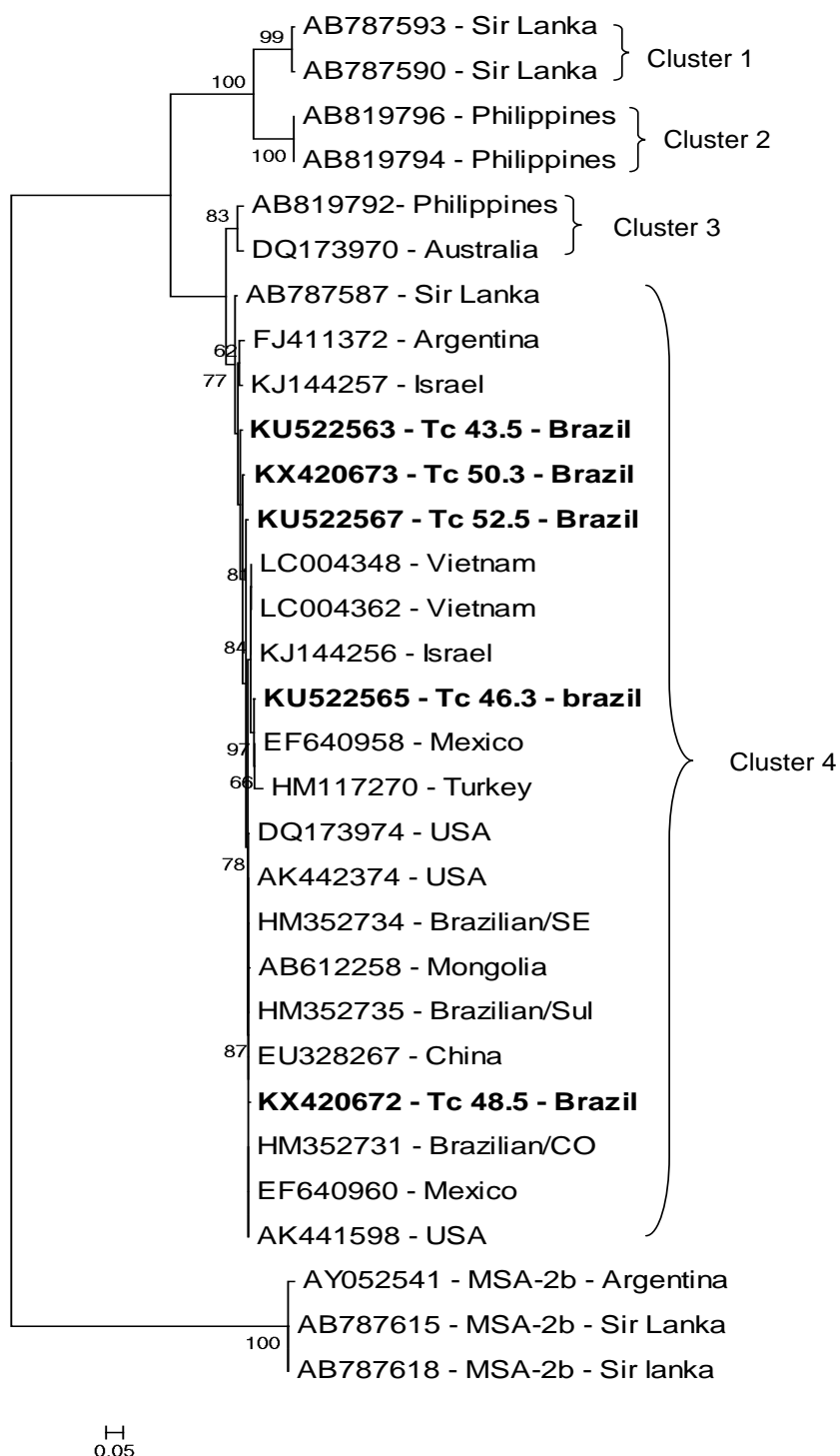


Figura 9. Análise filogenética das sequências do gene *msa-2c* de *B. bovis*. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. A árvore filogenética foi inferida pelo método de máxima verossimilhança utilizando-se o modelo evolutivo GTR+G+I. Os números nos nós correspondem a valores de *bootstrap* superiores a 60% acessado com 1.000 repetições. Foram utilizadas sequências do gene *msa-2b* como grupo externo.

6 DISCUSSÃO

O gênero *Babesia* é composto por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa que se multiplicam nos eritrócitos do hospedeiro intermediário, Membros do filo Apicomplexa utilizam várias moléculas (ligantes) em seu processo de invasão (YOHOYAMA et al., 2006). Merozoítos extracelulares ligam-se reversivelmente aos eritrócitos do hospedeiro, reorientam as organelas apicais para próximo da interface de ligação e, em seguida, penetram na membrana do eritrócito através de várias interações moleculares dos ligantes existentes em suas membranas com os receptores-alvo de superfície da célula hospedeira

Durante a invasão algumas das moléculas de superfície de revestimento dos merozoítos podem funcionar como fatores de reconhecimento dos eritrócitos do hospedeiro intermediário, como por exemplo, as glico-proteínas de superfícies do merozoíto, que pertencem a família de antígenos variáveis de superfície de merozoítos (VMSA), são propostos desempenhar papéis fundamentais no processo de ligação inicial dos merozoítos e esporozoítos durante o fase de invasão de eritrócito, enquanto produtos de roptrias e micronemas podem ser excretadas das organelas de merozoitos até ao ponto de Invaginação da membrana para fazer junções ao eritrocito hospedeiro e, em seguida, realizar a sua penetração e subsequente internalização dentro do eritrocito, enquanto o conteúdo dos corpos esféricos estão envolvidos na dissolução de membranas (YOHOYAMA et al., 2006).

No presente estudo, formas evolutivas características de *B. bovis* não foram detectadas em esfregaços sanguíneos dos animais amostrados em todo período experimental. O fato de não se ter observado piroplasma nos esfregaços sanguíneos pode sugerir que o grau de parasitemia era baixo nos animais. Bezerros com menos de 9 meses de idade possuem resistência inata à doença e, portanto, os níveis de parasitemia e anemia são reduzidos em comparação com bovinos adultos (BROWN et al., 2006). Por outro lado, embora a microscopia tenha sido empregada para a detecção de *Babesia* sp e outros hemoparasitas, sua baixa sensibilidade é fator limitante para o uso da técnica em estudos epidemiológicos de hemoparasitas, quando em níveis baixos no sangue, como no caso de animais jovens (ALMERIA et al., 2001). Assim sendo, foram utilizados testes sorológicos por serem ferramentas

indispensáveis para realizar o diagnóstico indireto de *Babesia* sp.

Nos testes sorológicos RIFI e ELISA não mostram diferenças na sensibilidade na detecção de anticorpos contra *B. bovis*, de tal modo que na primeira colheita foram detectados 86,6% de soropositividade tanto pelo ELISA como pela RIFI da fazenda Pesagro, RJ e 80% de soropositividade pelo ELISA da fazenda Germânia. Tal semelhança de resultados deve-se ao fato de ter se usado antígeno total semipurificado no ELISA, e eritrócitos parasitados na RIFI. A presença de anticorpos contra *B. bovis* deve-se ao fato das bezerras terem tomado colostro, e as amostras de sangue foram colhidas após ingestão do mesmo.

Os resultados da sorologia demonstram que aos seis meses de idade, idade em que os riscos de transmissão da *B. bovis* são elevados devido a diminuição dos níveis de anticorpos colostrais, todas bezerras de ambas as fazendas possuíam anticorpos contra *B. bovis* e portanto já haviam tido contato com a *B. bovis* e, desenvolvido imunidade ativa contra este hemoprotozoário. Isto seria indicativo de que as bezerras receberam anticorpos suficientes, ou que os anticorpos elicitados contra a *B. bovis* garantiram proteção cruzada contra isolados virulentos de campo. Além disso, durante o experimento, as bezerras não apresentaram sinais clínicos de babesiose bovina. O sistema de criação de bezerras utilizado em ambas as fazendas permitiu o contato precoce com carrapatos infectados com *B. bovis*, estimulando o desenvolvimento da imunidade ativa destes contra o parasita. Bezerros jovens (menos de seis meses de idade) são relativamente resistentes ao desenvolvimento da forma aguda da doença, o que é tipicamente observado em adultos suscetíveis após infecção inicial com *B. bovis* (TRUEMAN; BLIGHT, 1978; GOFF, 2001).

No entanto, atualmente, aceita-se que os anticorpos do colostro não são a principal fonte de proteção para bezerros contra a babesiose bovina e que mecanismos da imunidade inata também estão envolvidos (BOCK et al., 2004).

A exposição de animais jovens a quantidades consideráveis de carrapatos infectados com *B. bovis* durante os primeiros nove meses de vida, garante a proteção natural para o resto da vida, resultando em baixo risco de doença clínica (MAHONEY; ROSS, 1972; MAHONEY, 1974). Tendo em conta que a taxa de exposição a *B. Bovis*, nos animais das fazendas Pesagro e Germânia, superior a

80%, caracterizando assim como sendo áreas de estabilidade enzoótica para *B. bovis*. Se mais de 75% de bezerros até aos nove meses de idade são expostos a *B. bovis*, num dado rebanho, a babesiose é considerada enzooticamente estável (MAHONEY; ROSS, 1972; TRINDADE et al., 2010; COSTA et al., 2015).

A detecção de *B. bovis* pela cPCR em bezerras de ambas as fazendas, confirma que estas tiveram contato com o agente; por outro lado, os resultados mostram que o número de animais infectados foi aumentando gradualmente à medida que a idade evoluía. Entre os 9 e 12 meses de idade maior número de bezerras infectadas com *B. bovis* foi demonstrado, período no qual a imunidade inata vai perdendo sua capacidade protetora, ou seja, a capacidade de eliminar *B. bovis* e, portanto, maior número de animais jovens poderão apresentar níveis de parasitemia detectáveis (DALGLIESH, 1993; BOCK et al., 2004).

Os resultados da cPCR de ambas as fazendas indicam que mais de 75% das bezerras tiveram contato com o agente até aos 9 meses de idade, indicando que a estabilidade enzootica foi estabelecida, corroborando, portanto, com os resultados da sorologia.

No presente estudo, a diversidade genética dos genes MSAs na população de *B. bovis* de bovinos de dois rebanhos das fazendas Pesagro, RJ e Germânia, SP, sudeste do Brasil, foi analisada. Embora um número considerável de fragmentos de genes MSAs foram obtidos, apenas alguns fragmentos foram submetidos ao sequenciamento, uma vez que a maioria deles produziu bandas de fraca intensidade. Isto provavelmente deve-se ao fato da população estudada ter sido composta por animais jovens, com idade compreendida entre 0 e 12 meses. Sabe-se que bezerros com menos de 9 meses de idade possuem resistência inata à doença. E, portanto, os níveis de parasitemia são baixos, resultando em bandas de fraca intensidade na PCR.

Foram analisadas 20 sequências, sendo oito da Fazenda Pesagro e 12 da Fazenda Germânia. Apenas duas sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* foram obtidas no presente estudo. Poucos fragmentos do gene *msa-1* foram amplificados, provavelmente devido ao polimorfismo entre os nucleotídeos nas regiões peptídicas de sinal do gene *msa-1*, em diferentes isolados de *B. bovis* (LEROITH et al., 2005). Além disso, o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores escolhidos pode ter sido

menos eficiente do que aqueles voltados para os genes *msa-2b* e *msa-2c*. Portanto, sequências do gene *msa-1* de *B. bovis* de diferentes isolados não podem ser amplificadas por um único par de oligonucleotídeos iniciadores (NAGANO et al., 2013).

As duas sequências de nucleotídeos do gene *msa-1* amplificadas de amostras de DNA de sangue positivo a *B. bovis* de bezerras de Taiapu, SP compartilham alta identidade de sequências de nucleotídeos com diferentes sequências de nucleotídeos de amostras de *B. bovis* da Tailândia e mostraram uma baixa identidade (43,6%) e similaridade (58,8%) de sequência de aminoácidos entre si. Também foi observada baixa identidade e similaridade de aminoácidos quando comparadas com sequências anteriormente amplificadas por Nagano et al. (2013), o que demonstra alta diversidade genética do gene *msa-1*, pelo menos nos locais do Brasil onde estudos foram realizados.

Os valores de identidade e similaridade de aminoácidos obtidos no presente estudo estão em concordância com os obtidos por Nagano et al. (2013), haja visto que os mesmos autores concluíram que a diversidade genética de *B. bovis* em relação ao gene *msa-1* era alta.

Quatro sequências [KU522558, KU522560, KU522562 e KX420675] do gene *msa-2b* amplificadas do DNA de sangue de bezerras positivas a *B. bovis* de Taiapu, SP mostraram alta identidade (97-98,2%) e similaridade (97-98,2%) de sequências de aminoácidos entre si. Também mostraram alta identidade no "blast" e alta identidade e similaridade de sequências de aminoácidos com a sequência [KX160815] do gene *msa-2b* amplificada do DNA de sangue da bezerra positiva a *B. bovis* de Serópedica, RJ mostrando que estas sequências são genotipicamente idênticas.

As sequências de nucleotídeos do gene *msa-2c*, determinadas neste estudo, mostraram relativamente uma alta identidade e similaridade de sequências de aminoácidos, apenas uma sequência (KX463633) amplificada do DNA extraído do sangue de um bovino positivo a *B. bovis* da fazenda Pesagro, RJ apresentou uma baixa identidade e similaridade de sequências de aminoácidos em relação as outras nove sequências analisadas.

Nas análises filogenéticas, as sequências de Taiapu, dos genes *msa-1* e *msa-*

2b, posicionaram-se em diferentes clados, e as sequências do gene *msa-2c* agruparam-se em apenas um único clado. Enquanto que as sequências dos genes *msa-2b* e *msa-2c* da Seropédica posicionaram-se em vários clados. Aqui, sequências de genes *msa-1* posicionaram-se em dois clados diferentes (clados 5 e 10) e em clados diferentes em que se posicionaram as outras sequências do gene *MSA-1* de origem brasileira, anteriormente relatadas por Nagano et al. (2013). Estes resultados demonstram que as sequências do gene *msa-1* e *msa-2b* de *B. bovis* isoladas do DNA do sangue de bovinos de Taiapu e Seropédica são geneticamente diversificadas. A diversidade genética de *msa-1* e *msa-2b*, observada no filograma, é confirmada pelo alto valor da diversidade de nucleotídeos por local (Pi) e baixos valores de identidade e de similaridade de sequências de aminoácidos estimados.

As dez sequências de nucleotídeos do gene *msa-2c*, determinadas neste estudo, agruparam-se em dois clados (clados 3 e 4). Uma sequência amplificada do DNA extraído do sangue de um bovino positivo a *B. bovis* da Seropédica, RJ (KX463633) posicionou-se no clado 3, e as restantes nove sequências posicionaram-se no clado 4, sendo cinco de SP e quatro do RJ, as quais agruparam-se com sequências derivadas de vários outros países (TATTIYAPONG et al., 2014), incluindo três de outras regiões do Brasil (RAMOS et al., 2012). Isso indica que as sequências do gene *msa-2c* de *B. bovis* compartilham características genéticas universais. As sequências de nucleotídeos do gene *msa-2c* do Rio de Janeiro posicionaram-se em dois clados, mostrando que ocorre diversidade genética. A diversidade genética observada no filograma é confirmada pelo alinhamento das sequências (Apêndice 1), pelo valor relativamente alto de diversidade de nucleotídeos comparando com o valor obtido em SP e suportado pelo baixo valor de identidade e similaridade de aminoácidos estimado, em particular com a sequência KX463633. Contrariamente, as sequências de nucleotídeos do gene *msa-2c* amplificadas do DNA de sangue de bovinos positivos a *B. bovis* de São Paulo posicionaram-se no mesmo clado com outras sequências brasileiras anteriormente reportado por Ramos et al. (2012), demonstrando que não há diversidade genética ou que ela é baixa. Essa baixa diversidade genética é suportada pelo baixo valor de diversidade de nucleotídeos (Tabela 8) e pelo alto valor de identidade e similaridade de aminoácido estimado.

Um estudo recente sobre o gene *msa-2c* relata que isolados de *B. bovis* brasileiros são geneticamente conservados (RAMOS et al., 2012). Embora o *msa-2c* tenha sido descrito como sendo um gene relativamente conservado entre os genes MSAs de *B. bovis* (BERENS et al., 2005; LEROITH et al., 2005), nos achados da Austrália (BERENS et al., 2005), Sri Lanka (SIVAKUMAR et al., 2013), Filipinas (TATTIYAPONG et al., 2014) e Israel (MOLAD et al., 2014) demonstraram que também ocorre diversidade genética entre as sequências do gene *msa-2c*.

A alta diversidade genética de sequências de genes de MSAs pode ser um fator limitante para o uso desses antígenos como vacinas recombinantes. Ainda, Berens et al. (2005) e LeRoith et al. (2005) demonstraram que as variações genéticas de sequências de genes de MSAs podem estar ligadas à falta de proteção por parte dos isolados vacinais. Em contraste, Suarez et al. (2000) mostraram que os anticorpos criados contra recombinante *msa-1* de isolado de *B. bovis* R1A da Argentina, inibiram eficazmente a invasão do merozoíto no eritrócito, sendo o isolado Mo7 do México, apesar da baixa similaridade compartilhada entre as sequências de aminoácidos de *msa-1* destes isolados. Portanto, estudos adicionais, utilizando ensaios de “immunoblot” e testes de neutralização, são essenciais para explorar a possibilidade de utilizar estes antígenos como vacinas (YOKOYAMA et al., 2015).

A presença de diversidade genética entre os genes MSAs pode resultar em diferenças antigênicas entre as populações de *B. bovis*. Portanto, estudos sobre a diversidade genética do agente no Brasil são necessários, para se incluir a seleção de antígenos vacinais ou componentes de subunidades de vacinas.

7 CONCLUSÕES

O sistema de manejo adotado para as bezerras nas fazendas Pesagro, RJ e Germânia, SP permitiu a obtenção de anticorpos colostrais e a exposição destas a carrapatos infectados com *B. bovis* antes da queda dos níveis de anticorpos colostrais (imunidade passiva), favorecendo deste modo o desenvolvimento da imunidade ativa contra o piroplasma.

Os resultados da sorologia mostraram que foi atingida a estabilidade endêmica em ambas as fazendas.

As sequências dos genes *msa-1* e *msa-2b*, detectadas em amostras de DNA positivas a *B. bovis* de bezerras da fazenda Germânia, (Taiáçu-SP), foram geneticamente diversificadas, mas as sequências do gene *msa-2c* foram relativamente conservadas; enquanto que as sequências dos genes *msa-2b* e *msa-2c*, amplificadas em amostras de DNA positivas a *B. bovis* de bezerras da fazenda Pesagro, (Seropédica-RJ), foram geneticamente diversificadas.

Com base nas sequências do gene *msa-2b*, amplificadas no presente estudo, e a análise filogenética, pode-se afirmar que as amostras de *B. bovis* das fazendas Pesagro e Germânia se dividem em dois grupos genotípicos, havendo no entanto um genótipo compartilhado por ambas as fazendas.

Apesar das sequências de nucleotídeos dos genes MSAs de *B. bovis* amplificadas neste estudo serem geneticamente diversificadas os resultados da sorologia mostram que todas as bezerras desenvolveram imunidade ativa indicando que há proteção aos genótipos de *Babesia bovis* identificados nos locais em que o estudo foi realizado.

O presente estudo demonstra que a *B. bovis* é geneticamente diversificada nos locais em que o estudo foi realizado. A presença de diversidade genética entre os genes MSA pode resultar em diferenças antigênicas entre populações de parasitas.

8 REFERÊNCIAS

ALLSOPP, M. T.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D. T.; ALLSOPP, B. A. Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, Cambridge, v. 108, n. 2, p. 147–152, 1994.

ALMERIA, S.; CASTELLA, J.; FERRER, D.; ORTUNO, A.; ESTRADA-PENA, A.; GUTIERREZ, J. F. Bovine piroplasm in Minorca (Balearic Island, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 249–259, 2001.

ALTANGEREL, K.; SIVAKUMAR, T.; BATTSETSEG, B.; BATTUR, B.; UENO, A.; IGARASHI, I.; YOKOYAMA, N. Phylogenetic relationships of Mongolian *Babesia bovis* isolates based on the merozoite surface antigen (MSA)-1, MSA-2b, and MSA-2c genes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 184, n. 2–4, p. 309–316, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.09.021>>.

ANGUS, B. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 12, p. 1341–1355, 1996.

BABÉS, V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne du boeuf. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences**, v. 107, p. 692–694, 1888.

BANNISTER, L., MITCHELL, G. The ins, outs, and roundabouts of malaria. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 209–213, 2003.

BARCI, I. A. G.; OLIVEIRA, M. R.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, D. A.; ARAÚJO FILHO, R. S. Epidemiologia da Babesiose bovina no Estado de São Paulo: estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do município de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba. **Revista Brasileira de Parasitologia**, Jaboticabal, v. 3, n. 2, p. 79–82, 1994.

BARROS, C. S. L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I. S.; LEMOS R. A. A. Babesiose cerebral. In: _____. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo: Coleção Vallée, 2006. p. 87–95.

BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MENK, C. F.; ALMEIDA, A. O.; MELO, E. P. S.; KESSLER, R. H. 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**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 6, p. 513–517, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000600003>>.

BEATI, L.; KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, Kan, v. 87, n. 1, p. 32–48, 2001. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0032:AOTSRA2.0.CO;2](https://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0032:AOTSRA2.0.CO;2)>.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4172–4177, 2003.

BERENS, S. J.; BRAYTON, K. A.; MOLLOY, J. B.; BOCK, R. E.; LEW, A. E.; MCELWAIN, T. F. Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 11, p. 7180–7189, 2005. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128%2FIAI.73.11.7180-7189.2005>>.

BOCK, R. E.; DE VOS, A. J.; KINGSTON, T. G.; SHIELS, I. A.; DALGLIESH, R. J. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 43, n. 1–2, p. 45–56, 1992.

BOCK, R. E.; JACKSON, L.; DE VOS, A. J.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, Cambridge, v. 129, Suppl., p. 247–269, 2004.

BORGONIO, V.; MOSQUEDA, J.; GENIS, A. D.; FALCON, A.; ALVAREZ, J. A.; CAMACHO, M. MSA -1 and MAS-2c gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Malden, v. 1149 p. 121–145, 2008.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; DE VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 57, n. 1–3, p. 61–74, 1995.

BROWN, W. C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis* a protozoan parasite that causes persistent infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 101, n. 3–4, p. 233–248, 2001.

BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P.; GOFF, W. L. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 138, n. 1–2; p. 75–87, 2006. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.041>>.

CALLOW, L. L.; MELLORS, L. T.; MCGREGOR, W. Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 333–338, 1979.

CALLOW, L. L.; HOYTE, H. M. D. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* SP. and the cattle tick. **Australian Veterinary Journal**, West Sussex, v. 37, n. 10, p. 381–390, 1961. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.1961.tb03790.x>>.

CALLOW, L. L. Piroplasms. In: **Animal Health in Australia**, Protozoal and Rickettsial Diseases, v. 5. Canberra: Australian Bureau of Animal Health, 1984. p. 121–160.

CAMICAS, J. L.; HERVY, J. P.; ADAM, F.; MOREL, P. C. **The ticks of the world (*Acarida, Ixodida*)**. Nomenclature, described stages, hosts, distribution. Paris: Orstom Editions. 1998.

CANALES, M.; ENRÍQUEZ, A.; RAMOS, E.; CABRERA, D.; DANDIE, H.; SOTO, A.; FALCÓN, V.; RODRÍGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. **Vaccine**, London, v. 15, n. 4, p. 414–422, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00192-2)>.

CANTU, A.; ORTEGA-S, A.; MOSQUEDA, J.; VAZQUEZ, G. Z.; HENKE, S. E.; GEORGE, J. E. Immunologic and molecular identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Free-Ranging White-Tailed Deer in Northern Mexico. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 43, n. 3, p. 504–507, 2007. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-43.3.504>>.

CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, London, v. 40, n. 2, p. 1–18, 2009.

COSSÍO-BAYÚGAR, R.; RODRIQUEZ, S. D.; GARCÍA-ORTIZ, M. A.; GARCÍA-TAPIA, D.; ABOYTES-TORRES, R. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, México. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 32, n. 3–4, p. 165–70, 1997.

COSTA, F. B.; MELO, S. A.; ARAUJO, F. R.; RAMOS, C. A. N.; NETA, A. V. C.; GUERRA, R. M. S. N. C. Serological, parasitological and molecular assessment of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from state of Maranhão. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 2, p. 217–224, 2015.

COSTA JUNIOR, L. M.; RABELO, E. M. L.; MARTINS FILHO, O. A.; RIBEIRO, M. F. B. Comparison of different direct 305 diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated 306 parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, n. 1–3, p. 231–236, 2006. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.02.034>>.

DALGLIESH, R. J. Babesiosis. In: WARREN, S. K. (Ed.) **Immunology and molecular biology of parasite infections**. Oxford: Blackwell, 1993. p. 352–383.

DALGLIESH, R. J.; STEWART, N. P.; CALLOW, L. L. Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adult male *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, West Sussex, v. 54, n. 4, p. 205–206, 1978.

DE CASTRO, J. J.; Sustainable tick and tick borne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 2–3, p. 77–97, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00033-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00033-2)>.

DEITSCH, K. W.; LUKEHART, S. A.; STRINGER JR, Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. **Nature reviews. Microbiology**, London, v. 7, n. 7, p. 493–503, 2009. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2145>>.

DE WAAL, D. T.; COMBRINK, M. P. Live vaccines against bovine babesiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 138, n. 1–2, p. 88–96, 2006. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.042>>.

DOMINGUEZ, M.; ECHAIDE, I.; DE ECHAIDE, S. T.; MOSQUEDA, J.; CET´RA, B.; SUAREZ, C. E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. In silico predicted conserved B-cellepitopes in the merozoite surface antigen-2 family of *B. bovis* are neutralization sensitive. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 167, n. 2–4, p. 216–226, 2010. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.023>>.

DOUGLAS, J. W.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. Hoboken: Wiley Blackwell, 2010. p. 1232.

DUBREMETZ, J. F.; GARCIA-REGUET, N.; CONSEIL, V.; FOURMAUX, M. N. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 1007–1013, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

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

FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SUAREZ, C.; HINES, S. A.; PALMER, G. H.; BROWN, W. C.; MCELWAIN, T. F. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 7, p. 3566–3575, 2002.

FOOLLY, M. M.; PEREIRA, M. A. V. C.; EMMOTT, V. P.; GILMAR F.; MADRUGA, C. R. 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**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 187–194, 2009.

FURLONG, J.; EVANS, D. Epidemiologia do carrapato *Boophilus microplus* no Brasil: necessidade de uma abordagem compreensível para seu estudo realístico. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 7., SIMPÓSIO SOBRE A MOSCA-DOS-CHIFRES *Haematobia irritans*, 1991, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1991. p. 48–50.

GALE, K. R.; DIMMOCK, C. M.; GARTSIDE, M.; LEATCH, G. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 10, p. 1103–1109, 1996.

GARCIA, T. D.; FIGUEROA, M. J. V.; RAMOS, A. J. A.; ROJAS, M. C.; CANTÓ, A.G.J., FALCÓN, N. A.; ÁLVAREZ, M. J. A. Immune response to *Babesia bigemina* infection in pregnant cows. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Malden, v. 1026, p. 144–148, 2004. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1196/annals.1307.055>>.

GENIS, A. D.; PEREZ, J.; MOSQUEDA, J. J.; ALVAREZ, A.; CAMACHO, M.; MUNOZ, M. L. Using MSA-2b as a molecular marker for genotyping Mexican isolates of *Babesia bovis*. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, 2009; v. 9, n. 6, p. 1102–1107, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.03.012>>.

GENIS, A. D.; MOSQUEDA, J. J.; BORGONIO, V. M.; FALCÓN, A.; ALVAREZ, A.; CAMACHO, M., DE LOURDES MUÑOZ, M.; FIGUEROA, J. V. Phylogenetic analysis of Mexican *Babesia bovis* isolates using *msa* and *ssrRNA* gene sequences. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**, New York, v. 1149, p. 121–125, 2008. Disponível em: <[10.1196/annals.1428.070](https://doi.org/10.1196/annals.1428.070)>.

GOFF, W. L.; JOHNSON, W. C.; PARISH, S.M.; BARRINGTON, G. M.; TUO, W.; VALDEZ, R. A. 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 Immunology**, Oxford, v. 23, n. 9, p. 463–471, 2001.

GOFF, W. L.; STORSET, A. K.; JOHNSON, W. C.; BROWN, W. C. Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis* exposed monocyte cultures. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 221–228, 2006. Disponível em: <[10.1111/j.1365-3024.2006.00830.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00830.x)>.

GOHIL, S.; HERRMANN, S.; GÜNTHER, S.; COOKE, B. M. Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 125–132, 2013. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.008>>.

GOMES, A. O *Boophilus microplus*. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte, 1998. p. 10–46.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDRREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, B. J.; VIELLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. Cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 421–427, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.04.003>>.

HINES, S. A.; PALMER, G. H.; JASMER, D. P.; MCGUIRE, T. C.; MCELWAIN, T. F. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 55, n. 1–2, p. 85–94, 1992.

HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD 3RD, S. R., KRAUSE, P. J., PERSING, D. H. Babesiosis. **Clinical Microbiology**, Los Angeles, v. 13, n. 3, p. 451–469, 2000.

HORAK, I. G.; CAMICAS, J. L.; KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht v. 28, n. 1–4, p. 27–54, 2002.

HOPE, M.; RIDING, G.; MENZIES, M.; COLDITZ, I.; REVERTER, A.; WILLADSEN, P. Potential for recombinant *Babesia bovis* antigens to protect against a highly virulent isolate. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 439–445, 2005. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00795.x>>.

HOYTE, H. M. D. Initial development of Infections with *Babesia bigemina*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Hoboken, v. 8, n. 4, p. 462–466, 1961. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1961.tb01242.x>>.

HUNFELD, K.; HILDEBRANDT A.; GRAY, J. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease, **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 11, p. 1219–1237, 2008. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>>.

JULIANO, R. S.; MACHADO, R. Z.; FIOROVANTI, M. C. S.; ANDRADE, G. M.; JAIME, V. S. Soroepidemiologia da Babesiose em rebanhos de bovinos da raça Curraleiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000500026>>.

KEMP, D. H.; PEARSON, R. D.; GOUGH, J. M.; WILLADSEN, P. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 7, n. 1, p. 43–58, 1989.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 167, n. 2–4; p. 95–107, 2010. Disponível em: <[10.1016/j.vetpar.2009.09.012](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012)>.

KUMAR, S.; YOKOYAMA, N.; KIM, J. Y.; HUANG, X.; INOUE, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 133, n. 2, p. 221–227, 2004.

LAU, A. O.; CERECERES, K.; PALMER, G. H.; FRETWELL, D. L.; PEDRONIA, M. J.; MOSQUEDA, J.; MCELWAIN, T. F. Genotypic diversity of merozoite surface antigen 1 of *Babesia bovis* within an endemic population. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 172, n. 2, p. 107–112, 2010. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.017>>.

LEROITH, T.; BRAYTON, K. A.; MOLLOY, J. B.; BOCK, R. E.; HINES, S. A.; LEW, A. E.; MCELWAIN, T. F. Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 9, p. 5388–5394, 2005. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.9.5388-5394.2005>>.

LEVINE, N. D. Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. **Journal of Protozoology**, Hoboken, v. 35, n. 4, p. 518–520, 1988.

LEW, A.; JORGENSEN, W. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 4, n. 4, p. 292–302, 2005.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: Software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>>.

MCCOSKER, P. J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M.; KREIER, J. P. (Eds.) **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 1–24.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R. F.; VALADÃO, I. F. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 17–26, 1997.

MACKENSTEDT, U.; GAUER, M.; FUCHS, P.; ZAPF, F.; SCHEIN, E.; MEHLHORN, H. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 81, n. 7, p. 595–604, 1995.

MAHONEY, D. F. The application of epizootiological principles in the control of babesiosis in cattle. **Bulletin of the Office Internationaldes Epizooties**, Paris, v. 81, p. 123–138, 1974.

MCLEOD, R.; KRISTJANSON, P. Final report of joint esys/ILRI/ACIAR TickCost project – Economic impact of ticks and tick-borne diseases to livestock in Africa, Asia and Australia. **International Livestock Research Institute**, Nairobi, 1999.

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEIREDO, G. R.; CURVO, B. E. Níveis de anticorpos anti *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n.9, p. 1163–1168, 1984.

MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P. C.; ARAÚJO, F. R.; MIGUITA, M.; CARVALHO, C. M. E.; ARAÚJO, F. S.; UMAKI, A. C. S.; CROCCI, A.; QUEIRÓZ, R. A. Avaliação de um ELISA para detecção de anticorpos contra *Babesia bigemina* em. Avaliação de uma ELISA para detecção de anticorpos contra *Babesia bigemina* em bovinos e sua aplicação em um inquérito sorológico no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio Janeiro, v. 21, n. 2, p. 72–76, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2001000200005>>.

MAHONEY, D. F. Bovine babesiosis: the passive immunization of calves against *Babesia argentina* with special reference to the role of complement fixing antibodies. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 20, n. 1, p. 119–124, 1967.

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G. B. A note on the transmission of *Babesia bovis* (Syn. *B. argentina*) by the one-host tick *Boophilus microplus*. **Research in Veterinary Science**, London, v. 26, n. 2, p. 253–254, 1979.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, West Sussex, v. 48, n. 5, p. 292–298, 1972.

MAHONEY, D. F.; WRIGHT, I. G.; MIRRE, G. B. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infections. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Oxfordshire, v. 67, n. 2, p. 197–203, 1973. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1080/00034983.1973.11686877>>.

MAZUZ, M. L.; MOLAD, T.; FISH, L.; LEIBOVITZ, B.; WOLKOMIRSKY, R.; FLEIDEROVITZ, L.; SHKAP, V. Genetic diversity of *Babesia bovis* in virulent and attenuated strains. **Parasitology**, Cambridge, v. 139, n. 3, p. 317–323, 2012.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, Maryland Heights, v. 23, p. 37–103, 1984.

MOLAD, T.; FLEIDEROVITZ, L.; LEIBOVICH, B.; WOLKOMIRSKY, R.; ERSTER, O.; ROTH, A.; MAZUZ, M. L.; MARKOVICS, A.; SHKAP, V. Genetic polymorphism of *Babesia bovis* merozoite surfaceantigens-2 (MSA-2) isolates from bovine blood and *Rhipicephalus annulatus* ticks in Israel. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 205, n. 1–2, p. 20–27, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.016>>.

MOSQUEDA, J.; MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 11, p. 6448–6455, 2002. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128%2FIAI.70.11.6448-6455.2002>>.

MOSQUEDA, J.; FALCON, A.; ANTONIO, A. J.; ALBERTO, R. J.; OROPEZA, H. L.; FIGUEROA, J. V. *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 1229–1236, 2004. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.07.003>>.

MOSQUEDA, J.; OLVERA-RAMIREZ, A.; AGUILAR-TIPACAMU, G.; CANTO, G. J. Current advances in detection and treatment of babesiosis. **Current Medicinal Chemistry**, Bussum, v. 19, n. 10, p. 1504–1518, 2012.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1981 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, Dordrecht, v. 56, n. 3, p. 169–172, 2003.

MURRELL, A.; CAMPBELL, J. H.; BARKER, S. C. Phylogenetic analysis of the Rhipicephaline ticks indicates that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Maryland Heights, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2000. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1006/mpev.2000.0762>>.

NAGANO, D.; SIVAKUMAR, T.; DE MACEDO, A. C.; INPANKAEW, T.; ALHASSAN, A.; IGARASHI, I.; YOKOYAMA, N. 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**, Tokyo, v. 75, n. 11, p. 1463–1470, 2013.

O'DONOGHUE, P. J.; FRIEDHOFF, K. T.; VISCAINO, O. G.; WEYRETER, H. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using a semi-defined antigens in enzyme immunoassays. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 1–12, 1985.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; ARAUJO JR, J. P.; AMARANTE, A. F. T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**, London, v. 35, n. 1, p. 105–111, 2005. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.09.002>>.

PEREIRA, D. A. A. **Avaliação e otimização de reações da polimerase em cadeia para diagnóstico molecular e estudo epidemiológico de *Babesia bovis***. 2006. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2006.

PERRY, B. D. Epidemiological indicators and their application to the control of tick-borne diseases. In: **Manual on Tick and Tick-borne Disease Control**. Rome: FAO, 1996.

PIPANO, E. Live vaccine against hemoparasitic disease in livestock. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 57, n. 1–3, p. 213–231, 1995.

PREISER, P.; KAVIRATNE, M.; KHAN, S.; BANNISTER, L.; JARRA, W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity, and immune evasion. **Microbes and Infection**, Issy les Moulineaux, v. 2, n. 12, p. 1461–1477, 2000.

RAMOS, C. A.; ARAÚJO, F. R.; ALVES, L. C.; DE SOUZA, I. I. F.; GUEDES, D. S.; SOARES, C. O. Genetic conservation of potentially immunogenic proteins among Brazilian isolates of *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, n. 3–4, p. 548–552, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.020>>.

RIEK, R.F. Immunity to babesiosis. In: GARNHAM, P.C.C.; PIERCE, A.E.; ROITT, I. (Ed.). **Immunity to Protozoa**. Oxford: Blackwell, 1963. p.160–179.

RODRIGUEZ, R. I.; TREES, A. J. In vitro responsiveness of *Babesia bovis* to imidocarb dipropionate and the selection of a drug-adapted line. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 62, n. 1–2, p. 35–41, 1996.

RODRIGUES, A.; RECH, R. R.; BARROS, R. R.; FIGHERA, R. A.; BARROS, C. S. L. Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 121–125, 2005.

ROSS, J. P. J.; LÖHR, K. F. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by indirect fluorescent antibody test. **Research in Veterinary Science**, London, v. 9, n. 6, p. 557–562, 1968.

SANGER, F.; NIKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5163–5169, 1977.

SANTOS, H. Q.; LINHARES, G. F. C.; MADRUGA, C. R. 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**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 133–137, 2001.

SAM-YELLOWE, T. Y. Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. **Parasitology Today**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 308–316, 1996.

SMITH, R. D.; EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; CERESÉR, V. H.; CORREA, B. L.; PETRACCIA, C.; CARDOZO, H.; SOLARI, M. A.; NARI, A. Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. **Annals of the New York Academy Sciences**, Malden, v. 916, p. 510–520, 2000.

SIMKING, P.; SAENGOW, S.; BANGPHOOMI, K.; SARATAPHAN, N.; WONGNARKPET, S.; INPANKAEW, T.; JITTAPALAPONG, S.; MUNKHJARGAL, T.; SIVAKUMAR, T.; YOKOYOMA, N.; IGARASHI, I. The molecular prevalence and MSA-2b gene based genetic diversity of *Babesia bovis* in dairy cattle in Thailand. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 197, n. 3–4, p. 642–648, 2013. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.015>>.

SIVAKUMAR, T.; KAZUHIRO OKUBO, K.; IGARASHI, I.; DE SILVA, W. K.; KOTHALAWALA, H.; SILVA, S. S. P.; VIMALAKUMAR, S. C.; MEEWEWA, A. S.; YOKOYAMA, N. Genetic diversity of merozoite surface antigens in *Babesia bovis* detected from Sri Lankan cattle. **Infection Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 19, p. 134–140, 2013.

SHODA, L. K.; PALMER, G. H.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; GODSON, D. L.; BROWN, W. C. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 9, p. 5139–5145, 2000.

SMEENK, I.; KELLY, P. J.; WRAY, K.; MUSUKA, G.; TREES, A. J.; JONGEJAN, F. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 71, n. 1, p. 21–24, 2000.

SOARES, C. O.; SOUZA, J. C. P.; MADRUGA, C. R.; MADUREIRA, R. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 26–30, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2000000200004>>.

SOARES, C. O. Princípios, padronização e validações de provas sorológicas. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: EMBRAPA – Gado de Corte, 2001. p. 145–176.

SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 12, p. 1293–1302, 2001.

SOUZA, F. A. L.; BRAGA, J. F. V.; PIRES L. V.; CARVALHO, C. J. S.; COSTA, E. A.; RIBEIRO, M. F. B.; SANTOS, R. L.; SILVA, S. M. M. S. Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 9, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000900002>>.

SUAREZ, C. E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; HINES, S. A.; PALMER, G. H.; BROWN W. C.; MCELWAIN, T. F. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 12, p. 6865–6870, 2000.

SUAREZ, C.E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.180, n.1/2, p. 109–125, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/urn:doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.032>>.

TATTIYAPONG, M.; SIVAKUMAR, T.; YBANEZ, R. H.; YBANEZ, R. H.; PEREZ, Z. O.; GUSWANTO, A.; IGARASHI, I.; YOKOYAMA, N. Diversity of *Babesia bovis* merozoite surface antigen genes in the Philippines. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 57–63, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.003>>.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. Koogan: Editora Guanabara, 2010. p. 89–124.

TIMMS, P.; STEWART, N. P.; DE VOS, A. J. Study of virulence and vector transmission of *Babesia bovis* by use of cloned parasite lines. **Infection and Immunity**, Washington, v. 58, n. 7, p. 2171–2176, 1990.

TODOROVIC, R. A.; VISCAINO, O. G.; ADAMS, L. G. The detection of babesial antibodies by the complement fixation technique. **Revista Instituto Colombiano Agropecuario**, Bogota, v. 6, p. 213 – 233, 1976.

TRINDADE, H. I.; SILVA, G. R. A.; TEIXEIRA, M. C. A.; SOUSA, M. G.; MACHADO, R. Z.; FREITAS, F. L. C.; ALMEIDA, K. S. Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguína State of Tocantins, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 19, n. 3, 169–173, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612010000300008>>.

TRUEMAN, K. F.; BLIGHT, G. W. The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. **Australian Veterinary Journal**, West Sussex, v. 54, n. 6, p. 301–305, 1978.

VILORIA, M. I. V.; SALCEDO, J. H. P. Patofisiologia da infecção por *Babesia bovis*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 13, n. 1, 2004.

WAGNER, G.; CRUZ, D.; HOLMAN, P.; WAGHELA, S.; PERRONE, J.; SHOMPOLE, S.; RURANGIRWA, F. Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, suppl., p. 193–199, 1992.

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G. S.; HUNGERFORD, J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, Cambridge, v. 110, suppl., S43–S50, 1995.

WILKOWSKY, S.; FARBER, M.; ECHAIDE, I.; MOSQUEDA, J.; ALCARAZ, E.; SUAREZ, C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. Taking advantage of the polymorphism of the MSA-2 family for *Babesia bovis* strain characterization. **Parassitologia**, Rome, v. 49, suppl., p. 63–66, 2007.

WRIGHT, I. G.; CASU, R.; COMMINS, M. A.; DALRYMPLE, B. P.; GALE, K. R.; GOODGER, B. V.; RIDDLES, P. W.; WALTISBUHL, D. J.; ABETZ, I.; BERRIE, D. A.; BOWLES, Y.; DIMMOCK, C.; HAYES, T.; KALNINS, H.; LEATCH, G.; MCCRAE, R.; MONTAGUE, P. E.; NISBET, I. T.; PARRODI, F.; PETERS, J. M.; SCHEIWE, P. C.; SMITH, W.; RODE-BRAMANIS, K.; WHITE, M. A. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n. 1–2, p. 3–13, 1992.

YOKOYAMA, N.; BORK, S.; NISHISAKA, M.; HIRATA, H.; MATSUO, T.; INOUE, N.; XUAN, X.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; IGARASHI, I. Roles of the Maltese cross form in the development of parasitemia and protection against *Babesia microti* infection in mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 1, p. 411–417, 2003.

YOKOYAMA, N.; SUTHISAK, B.; HIRATA, H.; MATSUO, T.; INOUE, N.; SUGIMOTO, C.; IGARASHI, I. Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 10, p. 5822–5826, 2002.

YOKOYAMA, N.; OKAMURA, M.; IGARASHI, I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites; current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 138, n. 1–2, p. 22–32, 2006. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.037>>.

YOKOYAMA, N.; SIVAKUMAR, T.; TUVSHINTULGA, B.; HAYASHIDA, K.; IGARASHI, I.; INOUE, N.; LONG, P.; THANG, L.; DINH, T. B. Genetic variations in merozoite surface antigen genes of *Babesia bovis* detected in Vietnamese cattle and water buffaloes. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 30, p. 288–295, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.035>>.

ZINTL, A., MULCAHY, G., SKERRETT, H.E., TAYLOR, S. M., GRAY, J. S. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, 16, p. 622–636, 2003.

ZINTL, A.; GRAY, J. S.; SKERRETT, H. E.; MULCAHY, G. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 115–120, 2005. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00748.x>>.

APÊNDICE

Apêndice 1. Alinhamento de seqüências de nucleotídeos do gene *msa-2c* de *B. bovis* amplificadas por Ramos et al. (2012) e do DNA de amostras de sangue de bovinos da fazenda Pesagro. Mostrando mutações de nucleotídeos particularmente na sequência KX463633.

| | | | | | | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| HM352731 | TGCTCCATCC | TTTTCAATTA | TGCAGTGGCA | TCTCCACAAG | AGGAGGCTGT | ACCAACTAAG |
| HM352732 | TGCTCCATCC | TTTTCAATTA | TGCAGTGGCA | TCTCCACAAG | AGGAGGCTGT | ACCAACTAAG |
| HM352734 | TGCTCCATCC | TTTTCAATTA | TGCAGTGGCA | TCTCCACAAG | AGGAGGCTGT | ACCAACTAAG |
| HM352735 | TGCTCCATCC | TTTTCAATTA | TGCAGTGGCA | TCTCCACAAG | AGGAGGCTGT | ACCAACTAAG |
| KX463632 | TGCTCCATCC | TTTTCAATTA | TGCAGTGGCA | TCTCCACAAG | AGGAGGCTGT | ACCAACTAAG |
| KX463633 | TGCTCCATCC | TTTTCAATGC | TGCAGTGGCA | TCTCCACAAG | AGGAGGCTGT | ACCAACTAAG |
| KX463634 | TGCTCCATCC | TTTTCACTTA | TGCAGTGGCA | TCTCCACAAG | AGGAGGCTGT | ACCAACTAAG |
| KX463635 | TGCTCCATCC | TTTTCAATTC | TGCAGTGGCA | TCTCCACAAG | AGGAGGCTGT | ACCAACTAAG |
| KX160804 | TGCTCCATCC | TTTTCAATTA | TGCAGTGGCA | TCTCCACAAG | AGGAGGCTGT | ACCAACTAAG |
| | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| HM352731 | CAGGTGAATG | GGAGTCATTT | ACTGTTTGAT | GATATGAAA | TGTTGTATGA | TGTAATGCGC |
| HM352732 | CAGGTGAATG | GGAGTCATTT | ACTGTTTGAT | GATATGAAA | TGTTGTATGA | TGTAATGCGC |
| HM352734 | CAGGTGAATG | GGAGTCATTT | ACTGTTTGAT | GATATGAAA | TGTTGTATGA | TGTAATGCGC |
| HM352735 | CAGGTGAATG | GGAGTCATTT | ACTGTTTGAT | GATATGAAA | TGTTGTATGA | TGTAATGCGC |
| KX463632 | CAGGTGAATG | GGAGTCATTT | ACTGTTTGAT | GATATGAAA | TGTTGTATGA | TGTAATGCGC |
| KX463633 | CAGGTGAATG | GGAGTCATTT | ACTGTTTGAT | GATATGAAA | TGTTTATGA | TGTAATGCGC |
| KX463634 | CAGGTGAATG | GGAGTCATTT | ACTGTTTGAT | GATATGAAA | TGTTGTATGA | TGTAATGCGC |
| KX463635 | CAGGTGAATG | GGAGTCATTT | ACTGTTTGAT | GATATGAAA | TGTTGTATGA | TGTTGATGCGC |
| KX160804 | CAGGTGAATG | GGAGTCATTT | ACTGTTTGAT | GATATGAAA | TGTTGTATGA | TGTTGATGCGC |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| HM352731 | AGCATTGATG | AAAGCATGTT | GAAAAGCATT | CTTGAGAAGA | ATTTTGAGGC | TGTTGGCATG |
| HM352732 | AGCATTGATG | AAAGCATGTT | GAAAAGCATT | CTTGAGAAGA | ATTTTGAGGC | TGTTGGCATG |
| HM352734 | AGCATTGATG | AAAGCATGTT | GAAAAGCATT | CTTGAGAAGA | ATTTTGAGGC | TGTTGGCATG |
| HM352735 | AGCATTGATG | AAAGCATGTT | GAAAAGCATT | CTTGAGAAGA | ATTTTGAGGC | TGTTGGCATG |
| KX463632 | AGCATTGATG | AAAGCATGTT | GAAAAGCATT | CTTGAGAAGA | ATTTTGAGGC | TGTTGGCATG |
| KX463633 | AGCATTGATG | AAAGCATGTT | GAAAAGCATT | CTTGAGAAGA | ATTTTGAGGC | TGTTGGCATG |
| KX463634 | AGCATTGATG | AAAGCATGTT | GAAAAGCATT | CTTGAGAAGA | ATTTTGAGGC | TGTTGGCATG |
| KX463635 | AGCATTGATG | AAAGCATGTT | GAAAAGCATT | CTTGAGAAGA | ATTTTGAGGC | TGTTGGCATG |
| KX160804 | AGCATTGATG | AAAGCATGTT | GAAAAGCATT | CTTGAGAAGA | ATTTTGAGGC | TGTTGGCATG |
| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| HM352731 | GAAGCTACAT | CGGCTACTAA | AACACATGAC | GCTCTGAAGG | CTGTAAAACA | ATTAATCAAA |
| HM352732 | GAAGCTACAT | CGGCTACTAA | AACACATGAC | GCTCTGAAGG | CTGTAAAACA | ATTAATCAAA |
| HM352734 | GAAGCTACAT | CGGCTACTAA | AACACATGAC | GCTCTGAAGG | CTGTAAAACA | ATTAATCAAA |
| HM352735 | GAAGCTACAT | CGGCTACTAA | AACACATGAC | GCTCTGAAGG | CTGTAAAACA | ATTAATCAAA |
| KX463632 | GAAGCTACAT | CGGCTACTAA | AACACATGAC | GCTCTGAAGG | CTGTAAAACA | ATTAATCAAA |
| KX463633 | GAAGCTACAT | CGGCTACTAA | AACACATGAC | GCTCTGAAGG | CTGTAAAACA | ATTAATCAAA |
| KX463634 | GAAGCTACAT | CGGCTACTAA | AACACATGAC | GCTCTGAAGG | CTGTAAAACA | ATTAATCAAA |
| KX463635 | GAAGCTACAT | CGGCTACTAA | AACACATGAC | GCTCTGAAGG | CTGTAAAACA | ATTAATCAAA |
| KX160804 | GAAGCTACAT | CGGCTACTAA | AACACATGAC | GCTCTGAAGG | CTGTAAAACA | ATTAATCAAA |
| | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| HM352731 | ACCGATGCAC | CTTTCAACAC | ATCGGACTTT | GACACACTCG | ATTTGGAATA | TCTCTCAGGG |
| HM352732 | ACCGATGCAC | CTTTCAACAC | ATCGGACTTT | GACACACTCG | ATTTGGAATA | TCTCTCAGGG |
| HM352734 | ACCGATGCAC | CTTTCAACAC | ATCGGACTTT | GACACACTCG | ATTTGGAATA | TCTCTCAGGG |
| HM352735 | ACCGATGCAC | CTTTCAACAC | ATCGGACTTT | GACACACTCG | ATTTGGAATA | TCTCTCAGGG |
| KX463632 | ACCGATGCAC | CTTTCAACAC | ATCGGACTTT | GACACACTCG | ATTTGGAATA | TCTCTCAGGG |
| KX463633 | ACCGATGCAC | CTTTCAACAC | ATCGGACTTT | GACACACTCG | ATTTGGAATA | TCTCTCAGGG |
| KX463634 | ACCGATGCAC | CTTTCAACAC | ATCGGACTTT | GACACACTCG | ATTTGGAATA | TCTCTCAGGG |
| KX463635 | ACCGATGCAC | CTTTCAACAC | ATCGGACTTT | GACACACTCG | ATTTGGAATA | TCTCTCAGGG |
| KX160804 | ACCGATGCAC | CTTTCAACAC | ATCGGACTTT | GACACACTCG | ATTTGGAATA | TCTCTCAGGG |
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |

| | | | | | | |
|----------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| HM352731 | CAATCTAATG | AAGAGCTGTT | GAAGCTTCTG | ATTGAGGCAA | TATATGGTAT | GGAAATCATA |
| HM352732 | CAATCTAATG | AAGAGCTGTT | GAAGCTCCTG | ATTGAGGCAA | TATATGGTAT | GGAAATCATA |
| HM352734 | CAATCTAATG | AAGAGCTGTT | GAAGCTTCTG | ATTGAGGCAA | TATATGGTAT | GGAAATCATA |
| HM352735 | CAATCTAATG | AAGAGCTGTT | GAAGCTTCTG | ATTGAGGCAA | TATATGGTAT | GGAAATCATA |
| KX463632 | CAATCTAATG | AAGAGCTGTT | GAAGCTTCTG | ATTGAGGCAA | TATATGGTAT | GGAAATCATA |
| KX463633 | CAA A CTAATG | A G GAGCTGTT | GAAGCTTCTA | ATTGA T GCAA | TATATGGTAT | GGAAATCATA |
| KX463634 | CAATCTAATG | AAGAGCTGTT | GAAGCTTCTG | ATTGAGGCAA | TATATGGTAT | GGAAATCATA |
| KX463635 | CAATCTAATG | AAGAGCTG C T | CAA A CTTCTC | ATTGAGGCAA | TATATGGTAT | GGAAATCATA |
| KX160804 | CAATCTAATG | AAGAGCTG C T | CAA A CTTCTC | ATTGAGGCAA | TATATGGTAT | GGAAATCATA |
| | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| HM352731 | ATTGAAAAAA | CTAACTCTTT | TGTGGGAGAG | AGTGCAAAAC | ATTCCGATAA | ATTGGACACC |
| HM352732 | ATTGAAAAAA | CTAACTCTTT | TGTGGGAGAG | AGTGCAAAAC | ATTCCGATAA | ATTGGACACC |
| HM352734 | ATTGAAAAAA | CTAACTCTTT | TGTGGGAGAG | AGTGCAAAAC | ATTCCGATAA | ATTGGACACC |
| HM352735 | ATTGAAAAAA | CTAACTCTTT | TGTGGGAGAG | AGTGCAAAAC | ATTCCGATAA | ATTGGACACC |
| KX463632 | ATTGAAAAAA | CTAACTCTTT | TGTGGGAGAG | AGTGCAAAAC | ATTCCGATAA | ATTGGACACC |
| KX463633 | ATTGAAAAAA | CC G ACTCTTT | TGTGGGAGAG | AGTCA A AAAT | ATTCC A ATAA | ATTG A GACACC |
| KX463634 | ATTGAAAAAA | CTAACTCTTT | TGTGGGAGAG | AGTGCAAAAC | ATTCCGATAA | ATTGGACACC |
| KX463635 | ATTGA T AAAA | CC A ACTCTTA | TGTGGGAGAG | AGTGCA G AAC | ATTCC A ATAA | CGT A GACACC |
| KX160804 | ATTGAAAAAA | CTAACTCTTT | TGTGGGAGAG | AGTGCA G AAC | ATTCC A ATAA | CGT A GACACC |
| | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| HM352731 | GACTTGAGAC | AGTACTACTG | GGATAATATT | TACGATGACC | AGAGTGAATA | TAATAAGGAC |
| HM352732 | GACTTGAGAC | AGTACTACTG | GGATAATATT | TACGATGACC | AGAGTGAATA | TAATAAGGAC |
| HM352734 | GACTTGAGAC | AGTACTACTG | GGATAATATT | TACGATGACC | GGAGTGAATA | TAATAAGGAC |
| HM352735 | GACTTGAGAC | AGTACTACTG | GGATAATATT | TACGATGACC | AGAGTGAATA | TAATAAGGAC |
| KX463632 | GACTTGAGAC | AGTACTACTG | GGATAATATT | TACGATGACC | AGAGTGAATA | TAATAAGGAC |
| KX463633 | GAG T TGAGAA | AA T TACTACTG | GGATAATATT | TACGATGACC | AGAGTGAATA | TAATAAGGAC |
| KX463634 | GACTTGAGAC | AGTACTACTG | GGATAATATT | TACGATGACC | AGAGTGAATA | TAATAAGGAC |
| KX463635 | GAG T TGAGAA | AA T TACTACTG | GGATAATATT | TACGATGACC | AGAGTGAATA | TAATAA A GAC |
| KX160804 | GAG T TGAGAA | AA T TACTACTG | GGATAATATT | TACGATGACC | AGAGTGAATA | TAATAAGGAC |
| | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| HM352731 | AAATTAAGCA | ACCTATACAA | AGCATTCATC | ACTGATTCTG | GCGCTTTGAG | AATCGCATCG |
| HM352732 | AAATTAAGCA | ACCTATACAA | AGCATTCATC | ACTGATTCTG | GCGCTTTGAG | AATCGCATCG |
| HM352734 | AAATTAAGCA | ACCTATACAA | AGCATTCATC | ACTGATTCTG | GCGCTTTGAG | AATCGCATCG |
| HM352735 | AAATTAAGCA | ACCTATACAA | AGCATTCATC | ACTGATTCTG | GCGCTTTGAG | AATCGCATCG |
| KX463632 | AAATTAAGCA | ACCTATACAA | AGCATTCATC | ACTGATTCTG | GCGCTTTGAG | AATCGCATCG |
| KX463633 | AAATTAAGCA | ACCTATACAA | AGCATTCATC | ACTGATTCTG | GCGCTTTGAG | AATCGCATCG |
| KX463634 | AAATTAAGCA | ACCTATACAA | AGCATTCATC | ACTGATTCTG | GCGCTTTGAG | AATCGCATCG |
| KX463635 | AAATTA A TTA | ACCT T TACAA | AGCATTCA T T | ACTGATTCTG | G T GCTTTGAG | AA A CGCATCG |
| KX160804 | AAATTAAGCA | ACCT T TACAA | GGCATTCATC | ACT A AATTCTG | CCGCTTTGAG | AATCGCATCG |
| | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| HM352731 | GAGGAACTTA | TAAAATTCGA | AACAAGGAAA | GCTCAAAAGG | ATGACTACAG | ATTTATCAAT |
| HM352732 | GAGGAACTTA | TAAAATTCGA | AACAAGGAAA | GCTCAAAAGG | ATGACTACAG | ATTTATCAAT |
| HM352734 | GAGGAACTTA | TAAAATTCGA | AACAAGGAAA | GCTCAAAAGG | ATGACTACAG | ATTTATCAAT |
| HM352735 | GAGGAACTTA | TAAAATTCGA | AACAAGGAAA | GCTCAAAAGG | ATGACTACAG | ATTTATCAAT |
| KX463632 | GAGGAACTTA | TAAAATTCGA | AACAAGGAAA | GCTCAAAAGG | ATGACTACA A | ATTTATCAAT |
| KX463633 | GAGGAACTTA | TAAAATTCGA | AACAAGGAAA | GCTCAAAAGG | ATGACTACAG | ATTTATCAAT |
| KX463634 | GAGGAACTTA | TAAAATTCGA | AACAAGGAAA | GCTCAAAAGG | ATGACTACAG | ATTTATCAAT |
| KX463635 | GAGGAACTTA | CA A AAATTCGA | AACA A AGAAA | GCTCAAAAGG | A G GACTACAG | ATTTATCAAT |
| KX160804 | GAGGAACTTA | GAAAATTCGA | AACAAGGAAA | GCTCAAAAG A | ATGACTACAG | ATTTATCAAT |
| | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |

| | | | | | | |
|----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| HM352731 | CCTTCTCAA | CTTCGGAAGC | CGAAACACCC | TCTCCATCGT | CTGGAGAAAA | TACTGCAGCA |
| HM352732 | CCTTCTCAA | CTTCGGAAGC | CGAAACACCC | TCTCCATCGT | CTGGAGAAAA | TACTGCAGCA |
| HM352734 | CCTTCTCAA | CTTCGGAAGC | CGAAACACCC | TCTCCATCGT | CTGGAGAAAA | TACTGCAGCA |
| HM352735 | CCTTCTCAA | CTTCGGAAGC | CGAAACACCC | TCTCCATCGT | CTGGAGAAAA | TACTGCAGCA |
| KX463632 | CCTTCTCAA | CTTCGGAAGC | CGAAACACCC | TCTCCATCGT | CTGGAGAAAA | TACTGCAGCA |
| KX463633 | CCTTCTCAA | CTTCGGAAGC | CGAAACACCC | TCTCCATCGT | CTGGAGAAAA | TACTGCAGCA |
| KX463634 | CCTTCTCAA | CTTCGGAAGC | CGAAACACCC | TCTCCATCGT | CTGGAGAAAA | TACTGCAGCA |
| KX463635 | CCTTCTCAA | CTTCGGAACC | CGAAACACCC | TCTCCATCGT | CTGGAGAAAC | TACTGCAGCC |
| KX160804 | CCTTCTCAA | CACCGGAAC | CGAAACATCC | TCTCCATCGC | ATGGAGAAAA | TACTGCAGCA |

| | | | | | | |
|----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |
| HM352731 | CAACCTCCA | AACCTGCCGA | GACCCCTAAG | CCTACTGGAT | CTTCTTTCAC | CTATGGCGGA |
| HM352732 | CAACCTCCA | AACCTGCCGA | GACCCCTAAG | CCTACTGGAT | CTTCTTTCAC | CTATGGCGGA |
| HM352734 | CAACCTCCA | AACCTGCCGA | GACCCCTAAG | CCTACTGGAT | CTTCTTTCAC | CTATGGCGGA |
| HM352735 | CAACCTCCA | AACCTGCCGA | GACCCCTAAG | CCTACTGGAT | CTTCTTTCAC | CTATGGCGGA |
| KX463632 | CAACCTCCA | AACCTGCCGA | GACCCCTAAG | CCTACCGGAT | CTTCTTTCAC | CTATGGCGGA |
| KX463633 | CAACCTCCA | AACCTGCCGA | GACCCCTAAG | CCTACCGGAT | CTTCTTTCAC | CTTCGGCGGA |
| KX463634 | CAACCTCCA | AACCTGCCGA | GACCCCTAAG | CCTACTGGAT | CTTCTTTCAC | CTATGGCGGA |
| KX463635 | CAACCTCCA | AACCTGCCGA | GACCCCTAAG | CCTACCGGAT | CTTCTTTCAC | CTTTGGCGGA |
| KX160804 | CAACCTCCA | AGCCTGCCGA | GACCCCTAAG | CCTACCGGAT | CTTCTTTCAC | CTTCGGCGGA |

| | | |
|----------|------------|----------|
| | 730 | |
| HM352731 | TTGACTGTGG | CCACTCTC |
| HM352732 | TTGACTGTGG | CCACTCTC |
| HM352734 | TTGACTGTGG | CCACTCTC |
| HM352735 | TTGACTGTGG | CCACTCTC |
| KX463632 | TTGACTGTGG | CTACTCTC |
| KX463633 | TTGACTGTGG | CTACTCTC |
| KX463634 | TTGACTGTGG | CCACTCTC |
| KX463635 | TTGACTGTGG | CTACTCTC |
| KX160804 | TTGACTGTGG | CTACTCTC |