UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO QUANTITATIVO DA INFECÇÃO POR *Babesia bovis* EM BOVINOS DE CORTE DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS

Rodrigo Giglioti

Biólogo

2013

TESE/GIGLIOTI

R.

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO QUANTITATIVO DA INFECÇÃO POR *Babesia bovis* EM BOVINOS DE CORTE DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS

Rodrigo Giglioti

Orientador: Prof. Dr. Henrique Nunes Oliveira

Co-orientadora: Dra. Márcia Cristina de Sena oliveira

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 Genética e Melhoramento Animal

2013

Giglioti, Rodrigo
G459e Estudo quantitativo da infecção por *Babesia bovis* em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos / Rodrigo Giglioti. – – Jaboticabal, 2013
xix, 81 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Henrique Nunes de Oliveira
Banca examinadora: Jesus Aparecido Ferro, Tereza Cristina Goulart de Oliveira Sequeira, Anderson Ferreira da Cunha, Marcos Rogério André
Bibliografia

1. *Babesia bovis*. 2. qPCR. 3. ELISA-teste. 4. Anticorpos. 5. Bovinos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 616.993:636.2

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

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO QUANTITATIVO DA INFECÇÃO POR Babesia bovis EM BOVINOS DE CORTE DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS

AUTOR: RODRIGO GIGLIOTI

ORIENTADOR: Prof. Dr. HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARCIA CRISTINA DE SENA OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARCIA CRISTINA DE SENA OLIVEIRA
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / São Carlos/SP

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. TERESA CRISTINA GOULART DE OLIVEIRA SEQUEIRA
Departamento de Parasitologia / Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. ANDERSON FERREIRA DA CUNHA
Universidade Federal de São Carlos / São Carlos/SP

Marcos R. André

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 25 de novembro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RODRIGO GIGLIOTI - Filho de Roberto Pedro Giglioti e Amália Neris Giglioti, nascido em 18 de janeiro de 1982, no município de São Carlos – SP. Biólogo, graduado pelo Centro Universitário Central Paulista – Unicep, em dezembro de 2007, com a monografia intitulada: “Estudo do perfil protéico e atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de larvas de terceiro estágio de *Cochliomyia hominivorax*”. A titulação de Mestre foi obtida, em junho de 2010, com a dissertação “Efeito de extratos de sementes de Nim (A*zadirachta indica*) sobre fêmeas ingurgitadas e larvas de *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE)”, sob orientação da Profa. Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque. Em março de 2010, ingressou no Doutorado em Genética e Melhoramento Animal, área de concentração em Zootecnia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal. Realizou parte experimental de seu projeto de doutorado na Embrapa pecuária Sudeste (CPPSE) de São Carlos, SP. Inicialmente, recebeu apoio financeiro da CAPES e posteriormente, se tornou bolsista FAPESP até a conclusão deste curso. Em novembro de 2013, obteve o título de mestre em Genética e Melhoramento Animal.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Roberto e Amália, as minhas irmãs Roberta e Rachel, à minha esposa Aline e *in memória* de sua mãe Isabel, pelo amor que fizeram transparecer por mim e pelo amparo em diversos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho vem concluir uma das etapas de um grande sonho, que só seria possível ser realizado com a participação de pessoas que foram essenciais para o meu crescimento e desenvolvimento como ser humano e profissional. Manifesto a minha gratidão a todas elas e de forma particular:

À minha co-orientadora pesquisadora Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira, que foi a primeira pessoa a confiar em meu trabalho e estudo, propiciando oportunidades de desenvolvimento continuo. Tenho como exemplo de pesquisador a ser seguido e com ideais dignos de respeito diante de toda a sua sabedoria. Agradeço-lhe por ajudar no desenvolvimento de minhas ideias e por sempre me fazer lembrar as pretensões da verdadeira finalidade educativa no campo da pesquisa. Obrigado por suas sugestões, ensinamentos e a participação indispensável para a realização desse trabalho.

A meu orientador Prof. Dr. Henrique Nunes Oliveira, agradeço por me acolher como seu aluno de doutorado, pela sua inestimável contribuição por seu incentivo e disponibilidade em trocar informações, sugestões e críticas fundamentais à elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e ao Prof. Dr. Marcos Rogério André, por participar como membro da banca examinadora, que veio acompanhando desde a qualificação.

À Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, por participar como membro da banca de qualificação, mas principalmente em participar intensamente nesse trabalho, fornecendo toda sua atenção e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, por participar como membro da banca examinadora da defesa de doutorado, além da contribuição para o desenvolvimento do estudo, fornecendo toda sua atenção.

À Profa. Dra. Tereza Cristina Goulart de Oliveira Sequeira, por toda atenção fornecida e contribuição por participar como membro da banca examinadora da defesa de doutorado.

A todos os pesquisadores da Embrapa Pecuária Sudeste e professores do programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da UNESP/Fcav, pelo carinho e atenção dispensada.

Aos amigos estagiários e funcionários dos laboratórios de Sanidade Animal, pela amizade, respeito, agradável convivência, atenção e paciência oferecidos a mim cotidianamente. Agradeço toda ajuda por eles oferecida.

A todos os pecuaristas, por disponibilizar os animais, essenciais na realização deste projeto.

A CAPES, pela bolsa de estudo até o final do segundo ano de doutorado.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro e a concessão da bolsa durante um ano e seis meses, que foram fundamentais para a execução do estudo.

Obrigado a todos mais uma vez por me proporcionarem partilhar parte de minha vida com pessoas tão especiais.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS xxii

LISTA DE TABELAS xxiii

LISTA DE QUADROS xxiv

LISTA DE ABREVIATURAS xxv

RESUMO xxvi

ABSTRACT xxvii

1. INTRODUÇÃO 18

2. REVISÃO DE LITERATURA 20

3. OBJETIVOS 26

3.1. Objetivo Geral 26

3.2. Objetivos Específicos 26

4. MATERIAL E MÉTODOS 27

4.1. Animais experimentais 27

4.2. Contagem de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 30

4.3. Detecção de anticorpos IgG contra *Babesia bovis* pelo ELISA-teste 30

4.3.1. Tratamento dos dados do ELISA-teste 31

4.4. Reação em Cadeia Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) 32

4.4.1. Extração de DNA 32

4.5. Detecção do DNA de *Babesia bovis* por meio daqPCR 32

4.6. Padronização das reações da PCR em Tempo Real quantitativo (qPCR) 33

4.6.1. Otimização das reações de qPCR 33

4.6.2. Cálculo da eficiência da reação (E) dos ensaios de qPCR 36

4.6.3. PCR convencional para a confirmação da identidade dos produtos da qPCR e construção da curva de calibração 36

4.6.4. Clonagem dos produtos purificados de qPCR para a construção da curva de calibração 38

4.6.5. Diluições dos produtos clonados e construção da curva de calibração de *B. bovis* 38

4.6.6. Avaliação da sensibilidade da qPCR para a detecção de *B. bovis* 39

4.6.7. Pré-amplificação de amostras de DNA para quantificação por qPCR.... 39

4.6.8. Determinação do número de cópias de moléculas de DNA de *B. bovis*.. 43

4.7. Análise estatística dos dados..... 44

5. RESULTADOS 45

5.1. Contagens de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 45

5.2. Resultados do teste de ELISA na detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*.. 46

5.3. Resultados das quantificações de *B. bovis* por qPCR em Tempo Real ..50

6. DISCUSSÃO 54

7. CONCLUSÕES 69

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Ensaio de qPCR para testar o efeito da diluição das amostras de DNA extraídas dos animais. Ciclos de Quantificação (Cq) (a) e Curva de Dissociação (b). As amostras diluídas estão destacadas em azul enquanto as não diluídas estão em vermelho.....34
Figura 2. Resultados do teste de especificidade obtidos pela qPCR comparando as temperaturas da curva de dissociação entre os iniciadores específicos para *B. bovis* (Cbosg 1 e 2) e *B. bigemina* (Cbisg 1 e 2). As temperaturas das curvas de dissociação para o amplicon de *B. bovis* foi de 77,5ºC e para o amplicon de *B. bigemina* foi de 76ºC. 35
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 2,0% com amostras de DNA de isolados de *B. bovis* e amostras de DNA de sangue de bovinos positivos confirmados em ensaios de qPCR. 1= Padrão de peso molecular (pb); 2 – 9: isolados de *B. bovis*; 10 -11: amostras de DNA de sangue de bovinos pertencentes ao experimento; 17: controle negativo (Tampão de reação + água ultrapura.....37
Figura 4. Ensaio de qPCR contendo amostras de amplicons de isolados clonados de *B. bovis* diluídos em série para a construção da curva de calibração (a); Curva de dissociaçãodas amostras diluídas em série estabelecidas em 77°C (b). 39
Figura 5. Exemplo dos resultados de uma placa de reação de qPCR contendo amostras que não puderam ser quantificadas por não estarem no intervalo de quantificação da curva de calibração. 40
Figura 6. Ensaio de pré-amplificação e qPCR contendo amostras de isolados clonados de *B. bovis* da curva de calibração (a) e curva de dissociação das mesmas amostras (b). As amostras foram pré-amplificadas e em seguida quantificadas por qPCR.....41
Figura 7. Reações de pré-amplificação seguida de qPCR de amostras dos animais. Os Cqs em vermelhos são de amostras oriundas de pré-amplificação, enquanto os C_{qs} em azul foram amplificados sem pré-amplificação (a). A temperatura da curva de dissociação não mudou em ambos os casos (b).....42
Figura 8. Distribuição geral de frequência dos valores dos Níveis de ELISA (NE) para *B. bovis* de todos os animais utilizados no experimento, de acordo com a colheita (1 e 2).....47
Figura 9. Distribuição geral de frequência dos valores dos Níveis de ELISA (NE) da absorvância de IgG para *B. bovis* separados por grupo-local e colheita. AJB= Angus de José Bonifácio-SP; MS3L= Cruzados ½ Senepol x ½ Nelore de três lagoas-MS; SPI= Senepol de Pirajuí-SP; SATMG= Simangus de Turvolândia-MG; SITMG= Simental de Turvolândia-MG; colheita 1=1 e colheita 2=2. 48
Figura 10. Ensaio de qPCR para teste de sensibilidade dos iniciadores Cbosg1 e Cbosg2 que flanqueiam a sequência do gene do citocromo b *para B. bovis* utilizando o reagente EvaGreen®. As concentrações testadas variaram entre 10^{-1} (0,1 ng/µL) a 10^{-9} (0,01 fg/µL). A menor concentração a qual permitiu a detecção de *B. bovis* para este ensaio foi de 0,1 fg/µL (10^{-8}).....50

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Informações sobre os animais utilizados no experimento.....29
Tabela 2. Valores das diferenças entre os C_{qs} com e sem pré-amplificação em animais utilizados no experimento (n=18). 42
Tabela 3. Médias geral e por colheita e erros-padrão do número de *R. (B.) microplus* transformadas em log10 (n+1) por local de colheita x grupo genético. 45
Tabela 4. Escala de nível de Elisa (NE) segundo as faixas dos valores de A/P. Os soros foram considerados positivos quando os valores de A/P apresentaram-se superiores ou iguais ao NE 4. 46
Tabela 5. Frequência de animais soropositivos para *B. bovis* detectados pelo ELISA-teste por grupo-local e grupo-local separado por colheita.....49
Tabela 6. Médias e erros-padrão dos valores de A/P transformados em log10 do ELISA-teste para *B. bovis* por local de colheita x grupo genético. 49
Tabela 7. Valores da Eficiência da reação (E), *slope* e coeficiente de correlação (r2) para cada placa analisada no experimento por qPCR. 51
Tabela 8. Médias geral e por colheita e erros-padrão do número de cópias (NC) de *B. bovis* transformados em log10 por local de colheita x grupo genético.....52
Tabela 9. Valores dos componentes de variância e de repetibilidade (r) estimados para contagem *R.(B.) microplus*, Número de Cópias (NC) de *B. bovis*, e A/P (ELISA-teste). 53

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1. Número de amostras de animais utilizadas no experimento por medida separados por grupo-local.....28
Quadro 2. Iniciadores utilizados na quantificação do DNA de *B. bovis* pela técnica da qPCR.....32
Quadro 3. Ciclos adotados para as reações de qPCR. 33

LISTA DE ABREVIATURAS

A/P: valor da amostra em relação ao referencial positivo

ACMG: Animais Angus de Careaçu, MG

AJB: Animais Angus de José Bonifácio, SP

BCA: método do ácido bicinconínico

BSA: albumina sérica bovina

C_q: Ciclo Quantitativo

E: Eficiência da Reação

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA-teste: ensaio imuno enzimático

IgG: Imunoglobulina G

MS3L: Animais Cruzados ½ Senepol x ½ Nelore de Três lagoas, MS

NC: Número de Cópias

NE: Nível de ELISA

PBS: salina tamponada fosfatada

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR: Reação em Cadeia Polimerase Quantitativa em Tempo Real

r^2: Coeficiente de correlação

RFU: unidade de fluorescência relativa

SATMG: Animais Simangus de Turvolândia, MG

SITMG: Animais Simental de Turvolândia , MG

SPI: Animais Senepol de Pirajuí, SP

TPB: Tristeza Parasitária Bovina

ESTUDO QUANTITATIVO DA INFECÇÃO POR *Babesia bovis* EM BOVINOS DE CORTE DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS

RESUMO – A babesiose bovina é uma hemoparasitose transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que causa grandes prejuízos à bovinocultura do Brasil. Entre as espécies que causam as babesioses bovinas, *B. bovis* se destaca como a mais patogênica. É amplamente conhecida a resistência natural dos bovinos do grupo genético *Bos taurus indicus* frente a *B. bovis*. Entretanto, a relação quantitativa do nível de infecção em animais *Bos taurus taurus* e seus cruzamentos é desconhecida. O método clássico de detecção e quantificação da parasitemia por *B. bovis* apresenta baixa sensibilidade e falha no diagnostico em animais portadores. Recentemente, a técnica de qPCR tem sido utilizada com grande sucesso para este propósito. Assim, o presente estudo teve como objetivo verificar a associação entre o nível de infestação por *R. (B.) microplus*, a soroprevalência e a parasitemia por *B. bovis*, estimada através dos métodos do ELISA-teste e qPCR em bovinos de corte naturalmente infestados, de diferentes locais e grupos genéticos (grupos-locais).Verificou-se que a infestação por carrapatos foi maior nos grupos locais de taurinos, com diferenças significativas entre os grupos. Nos ensaios do ELISA-teste, 74,39% dos animais avaliados foram positivos, encontrando-se os maiores níveis de anticorpos em animais taurinos quando comparados aos cruzados. Nas quantificações do DNA através da qPCR, a técnica demonstrou alta sensibilidade analítica e todos os animais foram positivos. Foram verificadas diferenças significativas ($P<0,05$) para o numero de copias (NC) de DNA de *B. bovis* entre os grupos locais, onde o grupo Angus de José Bonifácio, SP (AJB) apresentou o maior nível de infecção. As repetibilidades encontradas para as contagens de *R. (B.) microplus* e os NC de DNA de *B. bovis* foram baixas, enquanto que para os níveis de anticorpos obtidos pelo ELISA-teste foram maiores. Nenhuma correlação entre as três medidas analisadas foram encontradas. Conclui-se que existe variação da soroprevalência e do NC do DNA de *B. bovis* entre os diferentes grupos-locais e que o nível de anticorpos detectados por Elisa nos animais não está diretamente associado ao NC de DNA de *B. bovis*, e ambas são independentes da infestação pelo carrapato.

PALAVRAS-CHAVE: *Babesia bovis*, qPCR, ELISA-teste, anticorpos, bovinos

QUANTATIVE STUDY OF *Babesia bovis* INFECTION IN BEEF CATTLE IN DIFFERENT GENETIC GROUPS

ABSTRACT - Bovine babesiosis is a tick-borne disease, transmitted by *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* tick, that imposes substantial economic losses in to Brazilian livestock, among the species that cause bovine babesiosis *B. bovis* is the most virulent. Is widely known the natural resistance of the *Bos taurus indicus* genetic group to *B. bovis*, however, the quantitative relationship of the infection levels when compared to *Bos taurus taurus* and their crosses is unknown. The classical detection and quantitation method is of low sensitivity and usually fails to diagnose carrier animals. Recently, the real-time PCR (qPCR) techniques have been used successfully for these purposes. The present study aimed to determine the association among infestations by *R. (B.) microplus*, infection levels by *B. bovis*, estimated by qPCR, and the antibody levels in beef cattle naturally infested, proceeding of different locations and genetic groups (local groups). It was found greater tick infestations in taurine local groups, with significant differences between groups. In the ELISA test, 74.39% of animals were positive, meeting the highest antibodies levels in taurine animals when compared to the crossbred. In the DNA quantification, the analytical sensitivity of qPCR technique was high and all animals were positive. There were significant differences ($P < 0.05$) for the DNA copy number (NC) among local groups, where Angus-Jose Bonifácio group (AJB) showed the highest infection levels. *R.* (*B*.) *microplus* scores and DNA copy number of *B. bovis* show low repeatability, whereas the antibodies levels were higher. No correlation among the examined measures were found. It is concluded that there is variation in the seroprevalence and DNA copy number of *B. bovis* among different local groups and the antibodies levels in the animals is not directly associated with the DNA NC of *B. bovis*, and both are independent of tick infestation.

KEY WORDS: *Babesia bovis*, qPCR, ELISA, antibodies, cattle

1. INTRODUÇÃO

A babesisose bovina é causada por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* sendo que o único vetor biológico é o carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (MADRUGA et al., 2000). Os prejuízos causados pelas babesioses são devidos principalmente à mortalidade, morbidade, queda da produção de leite e carne, abortos, redução de fertilidade, entre outros. A patogenia das babesioses é dependente da amostra, da taxa de inoculação de parasitas e da espécie, sendo que *B. bovis* é considerada mais patogênica que *B. bigemina* (LEMOS, 1998). As babesioses se caracterizam por intensa destruição dos eritrócitos, já que os parasitas se dividem dentro destas células sanguíneas dos bovinos. É uma enfermidade conhecida por provocar infecção aguda e algumas vezes fatal em bovinos jovens e adultos (De WAAL; COMBRINK, 2006).

O uso de acaricidas representa o método mais empregado pelos criadores no combate ao *R. (B.) microplus*. Entretanto, o uso indiscriminado de acaricidas tem aumentado a resistência dos carrapatos aos principais grupos químicos, reduzindo sua eficácia, além de aumentar os custos de produção (JONSSON et al., 2007; JONSSON; HOPE, 2007).

Uma forma direta de controle das babesioses se baseia na vacinação dos animais provenientes de áreas livres, com amostras vivas atenuadas ou na "premunição", com o sangue de animais portadores assintomáticos. Apesar de ser usado como método de imunização contra a Tristeza parasitária Bovina (TPB), a premunição é considerada como sendo altamente questionável (PATARROYO, 1979).

Testes sorológicos são amplamente utilizados em estudos epidemiológicos, a fim de verificar a possibilidade de ocorrência de surtos de babesioses. Dentre eles, destaca-se o Ensaio Imuno Enzimático ELISA-teste (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), o qual foi considerado um avanço em termos de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para a detecção de anticorpos específicos contra os agentes da babesiose bovina (MACHADO et al., 1997), além da capacidade de ser adaptado para testar um grande número de amostras em um curto período de tempo (De ECHAIDE et al., 1995). O uso de estudos sorológicos é uma importante ferramenta para determinar as condições epidemiológicas de uma determinada região, indicando a necessidade ou não da adoção de estratégias de controle para minimizar os efeitos da doença (MADRUGA et al., 2000).

Outra técnica de diagnóstico que mostrou elevada sensibilidade e especificidade em estudos da epidemiologia das babesioses foi a aplicação dos testes baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Entretanto, os testes de PCR convencionais só permitem detectar de forma qualitativa a infecção dos animais. Em contraste, a técnica de PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR) é capaz de superar essas limitações e oferece uma opção de diagnóstico simples e eficaz, além de possibilitar a quantificação da amostra de DNA. Com a utilização de corantes e sondas marcadas com fluorescência em um sistema fechado, a formação dos *amplicons* pode ser detectada e quantificada durante a reação sem risco de contaminação dos *amplicons* com o ambiente (FARRUGIA et al., 2011).

Atualmente, a competividade frente às exigências do mercado consumidor tem levado os criadores de bovinos de corte a optarem por animais de maior capacidade produtiva e qualidade da carne. Assim, muitos criadores têm tentado utilizar animais taurinos ou cruzamentos a fim de aumentar a produtividade dos rebanhos. O grande problema com relação a esta escolha é que quando se aumenta a proporção de genes de taurinos nos animais, a sensibilidade aos parasitas também cresce. Os prejuízos gerados pelas babesioses são um dos fatores que limitam a introdução de animais taurinos nos sistemas de criação de bovinos de corte na pecuária brasileira. Bilhassi et al. (2014) quantificou a presença de DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* em zebuínos, taurinos e cruzados, e verificaram diferenças entre os grupos genéticos estudados. Estudos anteriores já haviam indicado que a resistência às babesioses estaria ligada a efeitos genéticos (BOCK et al., 1997; BOCK et al., 1999), porém aquele foi o primeiro trabalho em que diferenças em nível de infecção entre raças puderam ser detectadas. O conhecimento dos fatores ligados à variação individual no nível de infecção por babésias e suas relações com o nível de infestação por carrapatos e com a presença de anticorpos no sangue poderiam ajudar no delineamento de métodos de controle destas doenças e fornecer indicativos sobre a possibilidade de utilização destas informações para aplicação no melhoramento genético dos bovinos, com características relacionadas à resistência a estes parasitas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As babesioses bovinas causadas por *B. bigemina* e *B. bovis* são as hemoparasitoses de bovinos mais importantes que ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Ambas as espécies são transmitidas pelo carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Entretanto, apenas larvas de carrapatos transmitem *B. bovis*, enquanto ninfas e adultos podem transmitir *B. bigemina* (RADOSTITS et al., 2008). As infecções por *B. bigemina* são menos virulentas, quando comparadas àquelas por *B. bovis* (TAYLOR et al., 2007).

A fêmea do carrapato se infecta com as babésias durante o ingurgitamento. Os protozoários se multiplicam em vários tecidos do carrapato, localizando-se inclusive nos ovários, onde estabelecem a transmissão transovariana (SAHINDURAN, 2012). As babésias que se reproduzem no hospedeiro invertebrado, são incorporadas durante o desenvolvimento embrionário dos carrapatos, sendo os agentes da doença transmitidos a novos hospedeiros por meios dos ínstares de larvas e ninfas (ZAUGG, 2009). A parasitemia presente no hospedeiro vertebrado se inicia por meio da inoculação de esporozoítas presentes nas glândulas salivares do carrapato, durante o repasto sanguíneo destes ácaros (RADOSTITS et al., 2008).

Nos vertebrados, estes hemoparasitas se multiplicam assexuadamente por divisão binária no interior dos eritrócitos, rompendo-os e penetrando em novas células, dando sequência ao ciclo evolutivo (KUTTLER, 1998; QUINTÃO; RIBEIRO, 2003). A evolução da doença está intimamente ligada à idade do hospedeiro, imunidade humoral conferida pelos anticorpos colostrais, quantidade do inóculo, virulência da amostra e do estado nutricional do animal (KUTTLER, 1998).

Os grandes prejuízos ocasionados pelas babesioses bovinas nos Estados Unidos no início do século XX incentivaram as pesquisas que culminaram na demonstração, pela primeira vez, do envolvimento de um artrópode na transmissão de protozoonoses. Além da importância epidemiológica dessa descoberta, foi este conhecimento que possibilitou a erradicação da babesiose bovina em grande parte dos Estados Unidos, a partir da erradicação do transmissor, o carrapato *Boophilus annulatus* (KREIER, 1977). A presença da babesiose neste país se limita na divisa entre o estado do Texas e o México, a qual está associada com a abundância de veados de cauda branca e talvez, outras espécies de mamíferos silvestres (ESTRADA-PENÃ; VENZAL, 2006; POUND et al., 2010).

Em relação às infestações pelo carrapato, sugere-se não erradicar este ácaro completamente de um rebanho no Brasil, tendo em vista a inexistência de um controle mais amplo por parte dos órgãos governamentais. É necessário manter a população de carrapatos em níveis baixos, uma vez que sua presença no rebanho permite a manutenção da imunidade contra os agentes da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (FURLONG, 1993; SAUERESSIG, 2006).

Os grandes prejuízos gerados pelas infestações por carrapatos e o crescente aumento da resistência aos acaricidas têm levado à utilização de bovinos mais resistentes a parasitoses, como alternativa para a redução de prejuízos. A maior resistência de bovinos zebuínos e cruzados com raças taurinas às babésias tem sido verificada, gerando grande interesse na pesquisa dos fatores responsáveis por essas diferenças (JONSSON et al., 2008).

Com relação aos carrapatos, é amplamente conhecida a resistência dos animais *Bos indicus* a este parasita, e o fato de que o aumento da proporção de *Bos taurus* aumenta a suscetibilidade do rebanho (LEMOS et al., 1985; OLIVEIRA; ALENCAR, 1987; OLIVEIRA et al., 1989; OLIVEIRA; ALENCAR, 1990; SILVA et al., 2007). Esta resistência pode ser consequência das menores infestações por carrapatos observadas nesses animais (FURLONG; EVANS, 1991). Desta forma, o grupo genético pode estar diretamente associado ao nível de infecção por hemoparasitas (BOCK et al., 1999; JONSSON et al., 2000).

Com relação aos métodos de diagnóstico, o exame direto de esfregaços sanguíneos, é considerado como conclusivo, em casos de babesiose clínica. Apesar de funcionarem muito bem para esses casos, não possuem sensibilidade suficiente para detectar animais positivos quando o nível da parasitemia é muito baixo como em casos de infecções subclínicas (O'DONOGHUE et al., 1985; GONÇALVES, 2001).

Os testes sorológicos constituem os métodos indiretos de diagnóstico, que detectam anticorpos sintetizados pelo organismo dos bovinos contra os agentes infecciosos. Dentre eles, destaca-se o ensaio imunoenzimático, o ELISA-teste que fornece um resultado quantitativo (BÖSE et al., 1990), e tem sido cada vez mais utilizado para a detecção de anticorpos contra agentes de diversas doenças em animais e humanos (De ECHAIDE et al., 1995). Estes testes apresentam grande utilidade, uma vez que podem oferecer importantes informações sobre o nível de imunidade dos rebanhos, ajudando na prevenção de surtos da doença. O

inconveniente desta técnica é a ocorrência de reações cruzadas entre *B. bovis e B. bigemina*, e o fato de ser impossível discriminar entre exposições prévias e correntes (KUTLER, 1981). Atualmente, estudos envolvendo a associação de testes imunológicos e detecção molecular de babesioses vem sendo conduzidos (MOUSA et al., 2013; IBRAHIM et al., 2013; HÜE et al., 2013; ROSALES et al., 2013; SHEBISH et al., 2012; MACHADO et al., 2012; RAMOS et al., 2011; JAFFER et al., 2010; FERRERI et al., 2008).

Estudando a soroprevalência de anticorpos IgM contra *B. bovis* por meio do teste de ELISA indireto, Gonçalves et al.(1999) verificaram especificidade de 94% e sensibilidade de 100%, demonstrando que este teste tem uso potencial como ferramenta de diagnóstico na detecção precoce da soroconversão dos animais infectados. O uso do ELISA no diagnóstico e monitoramento da infecção por de *B. bovis* têm sido empregados em diversos estudos (De ECHAIDE et al., 1995; GOFF et al., 2003; GOFF et al., 2006; MOLLOY et al., 1998; ISEKI et al., 2010; HÜE et al., 2013).

A imunização com vacinas atenuadas e a premunição são geralmente usadas em animais provenientes de áreas livres de carrapatos. Entretanto, alguns problemas são frequentemente reportados como a irregularidade dos níveis de proteção conferidos em relação ao desafio subsequente e a instabilidade das vacinas vivas. A vacinação de bovinos com proteínas específicas se encontra em fase experimental (MACHADO et al. 1999; BROWN et al., 2006; De WAAL; COMBRINK, 2006) e portanto, não está ainda disponível para uso a campo.

CALLOW & TAMMEMAGI (1967), estudaram a infectividade e virulência de *B. bovis* proveniente de animais recuperados da doença e relataram que os principais problemas para a imunização efetiva na premunição inclui a variabilidade na infectividade dos parasitas recuperados, a severidade da infecção produzida por algumas amostras e a dificuldade de controlar os sinais clínicos por meio de medicamentos.

Machado et al. (1999) verificaram que antígenos purificados a partir de proteínas de roptrias de *B. bigemina* podem induzir imunidade protetora em animais vacinados, mas existe ainda uma grande dificuldade em se obter essas proteínas nativas em quantidade suficiente para comercialização.

Como métodos efetivos de controle dessas doenças não estão ainda disponíveis, estes tem se baseado quase que exclusivamente no uso de carrapaticidas.

As áreas de ocorrência de babesioses bovinas são classificadas em áreas de estabilidade ou de instabilidade endêmica, dependendo da presença da população dos carrapatos vetores ao longo do ano (MAHONEY; ROSS, 1972). A estabilidade endêmica ocorre em regiões onde a transmissão dos protozoários é frequente e os animais sofrem a primeira infecção no período em que eles são muito jovens e estão ainda protegidos pela imunidade passiva dos anticorpos colostrais e por fatores não específicos (presença de timo, hemoglobina fetal, etc.). Nas áreas de instabilidade endêmica, onde os carrapatos não ocorrem nos meses frios, os animais jovens não se infectam e a imunidade dos adultos não sofre o reforço das constantes infestações. Nessa situação, a exposição a carrapatos infectados pode originar surtos graves de babesioses (De WAAL, 1996).

Vários fatores podem influenciar a susceptibilidade dos bovinos às babesioses, dentre eles podemos mencionar flutuações na população do carrapato vetor e práticas de manejo (MAHONEY; ROSS, 1972), raça e idade dos animais (ALONSO et al., 1992), fatores nutricionais e estresse (FARIAS, 1995). Sabe-se que os animais que se recuperam de uma infecção primária por babésias tornam-se portadores sadios, e o diagnóstico por meio de exame direto de esfregaços de sangue periférico não apresenta sensibilidade analítica suficiente para que os parasitas possam ser detectados. Estudos epidemiológicos são feitos, geralmente, por meio de exames sorológicos. Esses exames detectam anticorpos específicos contra os parasitas, porém eles têm uso limitado porque indicam a exposição ao agente, mas não informam sobre o estágio da infecção (WAGNER et al., 1992). Técnicas moleculares desenvolvidas mais recentemente resolveram grande parte dos problemas relacionados à detecção de animais portadores em populações de bovinos, possibilitando a determinação rápida dos riscos de ocorrência de surtos (FIGUEROA et al., 1993;OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008).

O estado de portador parece depender tanto do parasita como da raça de bovino afetada. Para *B. bovis*, o estado de portador pode ser mantido por toda a vida em animais de raça taurina. Já em gado zebuíno, o parasita pode se manter por períodos de cerca de três anos (CALLOW, 1984; FIGUEROA et al.,1993). Em áreas

endêmicas estáveis, onde os animais são constantemente submetidos a infestações por carrapatos, taxas de infecção próximas de 100% foram detectadas por meio de exames de amplificação do DNA do parasita em bezerros e vacas, tanto em rebanhos leiteiros (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005) como em rebanhos de corte puros zebuínos e com diferentes graus de genes *Bos taurus* (OLIVEIRA et al., 2008).

Estudos conduzidos em colaboração entre os laboratórios da Embrapa Pecuária Sudeste e do Departamento de Parasitologia da UNESP Botucatu, empregando a técnica de PCR clássica e a de Nested-PCR (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005), mostraram que, em bovinos, as frequências de infecção por *B. bovis* não diferiam das taxas de infecção por *B. bigemina* e que ambas eram também semelhantes em bezerros e vacas. Recentemente os mesmos pesquisadores (OLIVEIRA et al., 2008) desenvolveram um trabalho com a finalidade de verificar se a utilização de animais puros *B. indicus* poderia alterar a transmissibilidade da *Babesia bigemina*, provocando a ocorrência de instabilidade endêmica em um sistema estável, e com isso, aumentar o risco de surtos da doença. Neste estudo foram acompanhados quatro grupos genéticos: Nelore e os cruzados (Angus x Nelore, Canchim x Nelore e Simental x Nelore). Os resultados obtidos, utilizando-se exclusivamente a técnica de Nested-PCR, mostraram que as taxas de positividade tanto nos animais zebuínos como nos cruzados *Bos taurus* x *Bos indicus* jovens e adultos, foram altas e não diferiram. No entanto, a metodologia utilizada não possibilitou a verificação de diferenças na intensidade de parasitemia nos grupos genéticos estudados.

Bock et al. (1997) utilizaram o desafio com amostras virulentas de *B. bovis* e *B. bigemina* para determinar a resistência inata às babesioses em bovinos sorologicamente negativos. Esses autores verificaram que bovinos zebuínos apresentaram maior resistência quando comparados aos taurinos, sendo que os cruzados apresentaram resistência intermediária. Benavides e Sacco (2007) desafiaram animais puros *Bos taurus*, usando uma amostra patogênica de *B. bovis* e conseguiram determinar a ocorrência de três fenótipos distintos: suscetíveis (45,4%), intermediários (26,7%) e resistentes (27,9%). Não se sabe, no entanto, se a maior resistência pode ser interpretada como menor parasitemia.

A Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) possibilita o diagnóstico das babesioses bovinas e a estimativa aproximada do nível

de parasitemia nos animais, mediante a amplificação de uma sequência de DNA específica, sendo considerada de alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Estes testes permitiram a estimativa da parasitemia por *Babesia* spp. em bovinos de diferentes grupos genéticos (BILHASSI et al., 2014).

Embora o estudo de Bilhassi et al.(2014) seja o primeiro trabalho que mediu a resistência do nível de parasitemia de *B. bovis* e *B. bigemina* entre bovinos de diferentes grupos genéticos, muitos estudos têm usado á técnica de qPCR para estimar os níveis de parasitemia e estágio da doença causados por diferentes parasitas. A qPCR é amplamente utilizada para o monitoramento e diagnóstico de *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da doença da malária (BESHIR et al., 2010; ALAM et al., 2011; MUHAMAD et al., 2011; FARRUGIA et al., 2011; LAMIKANRA et al., 2012).

Polanco et al. (2002) estudaram a parasitemia de *Plasmodium vivax* por meio da qPCR em macacos *Aotus* e concluíram que a técnica é indicada para determinar a parasitemia, sendo rápida, reprodutível e acurada, além de diminuir o risco potencial de contaminação, pois envolve o sistema de reação de “tubos fechados”, não requerendo manipulações pós-PCR, como é o caso da Nested-PCR.

Outro protozoário que vem sendo estudado por meio desta técnica é o agente causador da doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi*. Moreira et al., (2013) utilizaram a qPCR para monitorara infecção por *T. cruzi* em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica e constataram que a sensibilidade e reprodutibilidade da metodologia se mostravam adequadas para detectar baixa carga parasitária em pacientes com a doença crônica. Caldas et al. (2012) declaram ainda que esta técnica pode ser útil nas investigações que envolvem quimioterapia experimental no tratamento desta doença e os benefícios do tratamento em relação ao parasitismo e resposta inflamatória.

O primeiro trabalho que relata o uso da qPCR para a quantificação de *B. bovis* e *B. bigemina* a partir de amostras de sangue de mamíferos é o de Buling et al. (2007). Estes autores constataram a ocorrência de babesiose bovina no equino, e concluíram que estes animais são potenciais reservatórios de *B. bigemina,* e sugerem que a mudança de hospedeiro é possível entre alguns ungulados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar a associação entre a variação individual do nível de infestação do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos de corte naturalmente infestados de diferentes locais e grupos genéticos, e a parasitemia de *B. bovis* estimada por métodos moleculares e sorológicos quantitativos.

3.2. Objetivos Específicos

- Estimar o nível de infestação por *R.(B.) microplus* em bovinos de grupos genéticos diferentes, criados em áreas endêmicas para as babesioses;
- Determinar quantitativamente a presença do DNA de *B. bovis* em amostras de sangue de bovinos de diferentes grupos genéticos;
- Determinar o título de anticorpos de classe IgG contra *B. bovis*;
- Estimar as repetibilidades da presença do DNA de *B. bovis*, do título de anticorpos contra *B. bovis* e da contagem de carrapatos;
- Verificar as associações entre o nível de infestação por carrapatos, a parasitemia de *B. bovis* estimada por qPCR e o título de anticorpos contra *B. bovis*, dentro dos grupos genéticos estudados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Os animais experimentais integravam rebanhos de cinco diferentes fazendas, duas localizadas em regiões no interior do estado de São Paulo, uma em Minas Gerais e uma em Mato Grosso do Sul. Na Tabela 1 estão apresentadas todas as informações dos animais amostrados no presente trabalho. Estes animais pertencentes a diferentes grupos genéticos apresentavam idades variando entre 12 a 24 meses no início do experimento. Para cada animal foram feitas duas contagens do número de carrapatos e colheitas de amostras de sangue em duas oportunidades diferentes, com intervalos entre 60 dias e 120 dias.

Os animais permaneceram por um período mínimo de trinta dias sem tratamento com acaricidas, visando obter infestação natural por *R. (B.) microplus*. Quando necessário, os tratamentos com acaricidas adotados pelas propriedades foram suspensos a fim de respeitar este intervalo. Os tratamentos com acaricidas eram realizados quando a avaliação visual do grau de infestação indicava sua necessidade. Os tratamentos contra as babesioses eram realizados quando os animais apresentavam sinais clínicos da doença.

Foram colhidas duas amostras de sangue de cada animal, uma contendo anticoagulante EDTA e outra sem adição de anticoagulante. As amostras foram colhidas da veia caudal, com auxílio de sistema a vácuo, identificadas e acondicionadas em caixas de isopor com gelo e transportadas para o laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, onde foram processadas.

No trabalho, foram aproveitadas apenas as amostras de sangue dos animais provenientes das duas colheitas, descartando do experimento as amostras que não foi possível realizar duas colheitas. No Quadro 1 estão apresentados os números de amostras de animais que foram utilizadas no experimento quando analisadas separadamente (contagens de carrapatos, ensaios do ELISA-teste e qPCR). Para o estudo de associação, somente amostras de animais que continham as três medidas foram utilizadas para esta análise (Quadro 1).

Quadro 1. Número de amostras de animais utilizadas no experimento por medida separados por grupo-local.

Medida	n, Grupo-Local						
	AJB	**ACMG**	**MS3L**	**SPI**	**SITMG**	**SATMG**	**Total**
Contagem de Carrapato	102	36	244	48	22	40	492
ELISA-teste	90	106	176	54	22	40	488
qPCR	100	46	236	48	24	40	494
Estudo de associação	86	16	166	44	22	38	372

ACMG= Angus de Careaçú-MG; AJB= Angus de José Bonifácio-SP; MS3L= Cruzados ½ Senepol x ½ Nelore de três lagoas-MS; SPI= Senepol de Pirajuí-SP; SATMG= Simangus de Turvolândia-MG; SITMG= Simental de Turvolândia-MG.

Tabela 1. Informações sobre os animais utilizados no experimento.

Raça	Sigla	Local	Coordenadas geográficas: Latitude (N) e Longitude (S)	Tratamento acaricida	Sistema de criação	Data da Colheita e Estação do ano	
						Colheita 1	Colheita 2
Angus*	**AJB**	José Bonifácio - SP	21° 2' 23'' e 49° 41' 28''	Fiprnil (Colosso®) e Amitraz (Triatox®)	Pasto Rotacionado	11/05/2012 Outono	16/07/2012 Inverno
Angus	**ACMG**	Careaçú - MG	22° 2′ 42″ e 45° 41′ 29″	Fluzuaron e Abamectina (Acatak®, Pour On) e Eclorpirifós e Cipermetrina (Flytion® SP)	Pasto Rotacionado, e suplementação de silagem de milho e ração concentrada	18/12/2012 Primavera	16/01/2013 Verão
Cruzado: ½ Senepol, ½ Nelore	**MS3L**	Trê lagoas - MS	20° 45′ 35″ e 51° 41′ 42″	Fluazuron + Abamectina (Fluotac Duo®, Pour On)	Pasto rotacionado, e suplementação de silagem de cana-de-açucar e ração concentrada	17/08/2012 Inverno	20/09/2012 Primavera
Senepol	**SPI**	Pirajuí - SP	22° 0′ 1″ e 49° 27′ 7″	Fluazuron + Abamectina (Fluotac Duo®, Pour On)	Confinamento (silagem de milho e ração concentrada)	17/05/2012 Outono	20/09/2012 Inverno
Simental e Simangus	**SITMG**	Turvolândia - MG	21° 51′ 13″ e 45° 46′ 51″	Fluzuaron e Abamectina (Acatak®, Pour On) e Eclorpirifós e Cipermetrina (Flytion® SP)	Pasto Rotacionado, e suplementação de silagem de milho e ração concentrada	18/12/2012 Primavera	16/01/2013 Verão

* Somente os animais Angus de José Bonifácio eram vacinados contra *R.(B.) microplus* (TIC VAC, Eurofarma®).

Entre os animais dos diferentes grupos genéticos e locais de colheita utilizados no trabalho, somente os animais MS3L eram cruzados taurinos x zebuínos, sendo o restante dos rebanhos taurinos puros. Os animais dos grupos genéticos SITMG e SATMG eram provenientes do mesmo local de colheita, sendo criados nas mesmas condições de manejo e alimentação.

4.2. Contagem de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Foram contados todos os carrapatos com tamanho superior a 4,5 mm (UTECH et al., 1978; HERMANS et al., 1994), presentes no lado esquerdo de cada animal. Foram feitas duas contagens em cada animal, com intervalos entre 60-120 dias. Os dados foram tabulados em planilhas para posterior análise.

4.3. Detecção de anticorpos IgG contra *Babesia bovis* pelo ELISA-teste

A técnica de ELISA para a detecção de anticorpos contra *B. bovis* foi realizada no laboratório de Imunoparasitologia do departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP de Jaboticabal.

As amostras de sangue colhidas em tubos sem anticoagulante foram mantidas à temperatura ambiente até a completa retração do coágulo. Os soros sanguíneos foram extraídos e colocados em tubos de 1,5 mL e mantidos em freezer à -20°C até o momento das análises.

A concentração do antígeno utilizada nos ensaios foi de 5 μg/mL. Esta concentração foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA), utilizando o kit Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific®, Pierce Protein Assay Kit) e albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Uma curva de calibração foi gerada e a partir da equação de regressão gerada pelas diferentes concentrações conhecidas do kit, e o antígeno de *B. bovis* foi quantificado e diluído para a concentração de 5 μg/mL.

A técnica empregada na detecção de anticorpos anti - *B. bovis* foi o ELISA-teste, descrita por Machado et al. (1997). Em resumo, 100 μL de antígeno diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, com concentração de antígeno de 5 μg/mL foram colocados em poços de microplacas poliestireno de ELISA (96 poços, plana, BD FALCON™), as quais foram vedadas e incubadas a 4°C “overnight”. As placas foram bloqueadas com solução a 6% de soro de coelho em tampão PBS-Tween (salina tamponada fosfatada, pH 7,2 e PBS-Tween com

0,05% de Tween 20) por uma hora em câmara úmida a 37°C. As placas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS-Tween, para então adicionar 100 µL de do soro bovino diluído a 1:400 em PBS-Tween. Os soros controles positivos e negativos também foram diluídos a 1:400 no mesmo tampão. As placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida por 90 minutos e então, lavadas três vezes com solução PBS-Tween. Alíquotas de 100 µL de solução diluída a 1:10.000 de anti - IgG bovina conjugada a fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co.) em tampão PBS-Tween foi adicionada a cada poço e as placas foram incubadas a 37°C nas mesmas condições já descritas, por 90 minutos. As placas foram novamente lavadas três vezes com solução PBS-Tween e 100 µL do substrato para a fosfatase, p-nitrofenil fosfato líquido (Sigma Chemical Co.) foram adicionados em cada poço. As placas foram seladas e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Ao fim deste período de incubação, a densidade ótica para as amostras das placas foram lidas em espectrofotômetro (Dynex Technologies®, MRX TC plus), com filtro de 405 nm.

Como controles positivos foram utilizadas amostras de soro de animais do próprio experimento, consideradas sorologicamente positivas e apresentando alto título de IgG anti - *B. bovis*. Como controles negativos foram utilizados soros de bezerros que não mamaram o colostro. Em cada ensaio de ELISA, foram usados dois controles negativos e dois positivos.

O antígeno de *B. bovis* e soros positivos e negativos utilizados nos ensaios de ELISA foram gentilmente cedidos pela professora Dra. Rosângela Zacarias Machado pertencente ao mesmo departamento em que ensaios foram realizados.

4.3.1. Tratamento dos dados do ELISA-teste

A atividade enzimática de cada soro no ELISA-teste indireto foi calculada mediante determinação de seu valor A/P. Este valor A/P (amostra em relação ao referencial positivo) de cada amostra de soro foi calculado, levando em consideração os soros de referência positiva e negativa de acordo com a seguinte fórmula:

$$\mathrm{A/P} = \frac{\mathrm{AMA} - \mathrm{AMSRN}}{\mathrm{AMSRP} - \mathrm{AMSRN}}$$

Onde:

AMA - Absorvância Média da Amostra

AMSRN – Absorvância Média do Soro Referência Negativa

AMSRP - Absorvância Média do Soro Referência Positiva

Os valores A/P foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variaram de zero até nove (0 a 9). A amplitude máxima dos NE zero foi determinada pela média dos valores em absorvância do soro de referência negativa, acrescido de dois desvios padrão da média correspondente. A partir deste limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram acrescidos de 35% cada conforme preconizado por Machado et al. (1997), para o sistema *Babesia* ssp. Os soros foram considerados positivos quando os valores de A/P apresentaram-se superiores ou iguais ao NE quatro. Este ponto de corte foi obtido a partir do cálculo realizado, no qual multiplicou-se o valor da amplitude máxima do NE zero pelo coeficiente 2,5.

4.4. Reação em Cadeia Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

4.4.1. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada empregando-se o Kit *ilustra blood genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare®) seguindo as recomendações do fabricante. O protocolo adotado nas extrações foi o de extração do DNA genômico entre 50-300 µL de sangue, utilizando-se volume de 300 µL de sangue.

4.5. Detecção do DNA de *Babesia bovis* por meio da qPCR

A técnica utilizada para a quantificação do DNA de *B. bovis* nas amostras de DNA extraídos de sangue foi uma adaptação daquela descrita por Buling et al. (2007), com modificações. Os iniciadores para *B. bovis* foram sequências que flanqueiam o fragmento do gene do citocromo B, produzindo *amplicons* com 88 pares de bases, conforme mostrado no Quadro2.

Quadro 2. Iniciadores utilizados na quantificação do DNA de *B. bovis* pela técnica da qPCR.

qPCR	Iniciador	Sequência (5’ – 3’)	Produto (pb)
B. bovis	(F)ª cbosg-1	TGTTCCTGGAAGCGTTGATTC	88
	(R)ª cbosg-2	AGCGTGAAAATAACGCATTGC	

(F)ª: iniciador direto; (R) iniciador reverso.

O equipamento utilizado neste estudo foi o CFX™ Real-Time PCR Detection Systems da BioRad. O reagente utilizado para as reações de qPCR foi o kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix da BioRad (número de catálogo: #172-5200). Este kit contém todos os componentes para reação de qPCR, exceto os iniciadores e a amostra.

4.6. Padronização das reações da PCR em Tempo Real quantitativo (qPCR)

4.6.1. Otimização das reações de qPCR

Para as padronizações dos testes de qPCR em tempo real, foram usadas amostras de isolados de *B. bovis*, gentilmente cedido por R. Z. Machado, responsável pelo laboratório de Imunoparasitologia do departamento de Patologia Veterinária da UNESP/FCAV de Jaboticabal, SP, a qual mantêm este isolado por meio da passagem em bezerros esplenectomizados por cerca de 25 anos de uma amostra fornecida pelo instituto Desiderio Finamor.

Os ciclos adotados para as reações foram os sugeridos pelo fabricante do reagente, com algumas modificações e estão resumidos no Quadro3.

Quadro 3. Ciclos adotados para as reações de qPCR.

Etapa do Ciclo	Ciclos	Temperatura	Tempo
Ativação Enzimática	1	95°C	2 minutos
Desnaturação	37	95°C	5 segundos
Anelamento/Extensão		57°C	30 segundos
Curva de Dissociação	1	65-95°C (incremento de 0,5°C)	5 segundos/passo

As principais modificações foram feitas no passo de anelamento/extensão. O tempo foi aumentado de cinco para trinta segundos, pois os cinco segundos sugeridos pelo fabricante, não foram suficientes para que a amplificação ocorresse até a fase de platô. Além disso, o volume final de cada reação foi modificado para 13 µL, enquanto o kit sugeria uma reação com um volume final de 20 µL. A reação de um volume final de 13 µL continha os seguintes reagentes:6,5µL do reagente SsoFast™ EvaGreen® Supermix;0,4µL (0,31 µM) de cada iniciador;3,7µL de água ultra pura e 2,0 µL de solução de DNA (5ng/µL).

Para as reações de qPCR foram utilizados tubos brancos em tiras (Low-Profile 0,2 ml 8-Tube Strips without Caps ref. TLS-0851, BioRad) e tampas óticas (Optical Flat 8-Cap Strips, ref. TCS-0803, BioRad).

A utilização do DNA genômico diluído a 5ng/µL foi determinado com base nas padronizações realizadas por Bilhassi et al. (2014). Entretanto, novos testes de confirmação foram realizados, uma vez que se utilizou kit de extração de DNA, reagentes e equipamentos para a técnica de qPCR diferentes. Na Figura 1a está apresentada uma reação contendo amostras de DNA não diluídos (com média de 40 ng/µL) e diluídos para 5ng/µL. Observa-se nesta reação que em amostras contendo DNA não diluídas, os ciclos de detecção (ciclo quantitativo ou C_q) ocorrem mais para ao final da reação, enquanto para as amostras diluídas, os C_{qs} são antecipados (Figura 1a), o que possibilita uma melhor detecção e quantificação de amostras com menores concentrações de DNA de *B. bovis*. Nas amostras de DNA não diluídos, os picos da curva de dissociação oscilavam para os valores de unidade de fluorescência relativa (RFU - *Relative Fluorescent Units*), enquanto que, para as amostras diluídas, os valores de RFU mostravam-se mais constantes (Figura 1b), fato este relacionado à antecipação dos C_{qs} originados nas amostras de DNA diluídas.

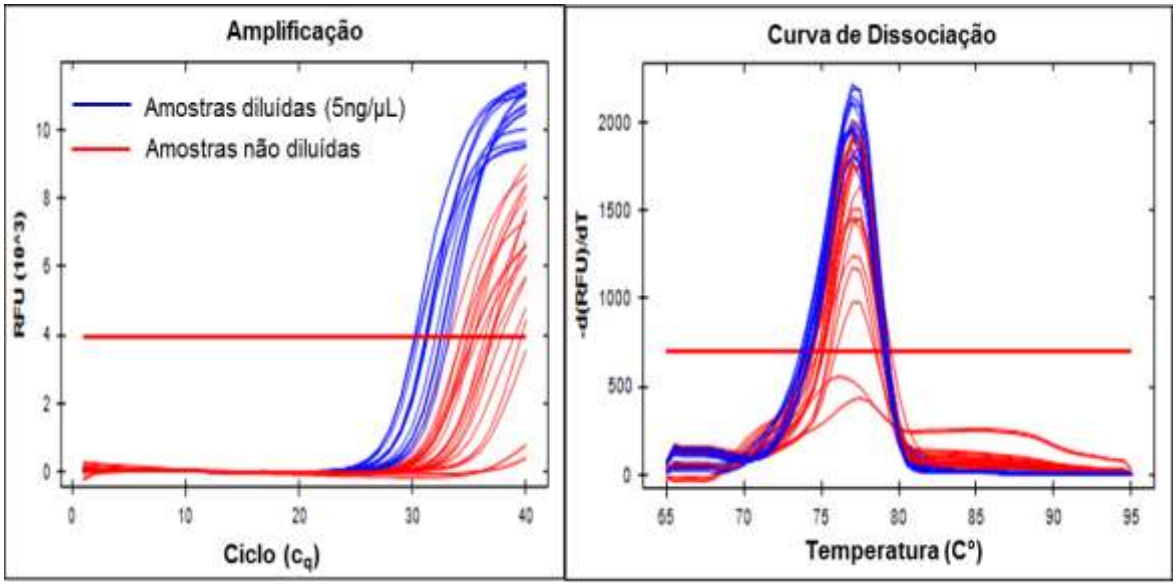

Figura 1. Ensaio de qPCR para testar o efeito da diluição das amostras de DNA extraídas dos animais. Ciclos de Quantificação (Cq) (a) e Curva de Dissociação (b). As amostras diluídas estão destacadas em azul enquanto as não diluídas estão em vermelho.

Para comprovar a especificidade do teste, algumas amostras foram testadas utilizando iniciadores específicos para amplificação de *B. bovis* e *B. bigemina* (BULING et al., 2007). Para isso foi realizada um ensaio de qPCR seguindo as condições já descritas anteriormente. Além dos iniciadores específicos para *B. bovis*, os iniciadores específicos para a amplificação de *B. bigemina* foram descritos por Buling et al. (2007) que também eram sequências que flanqueiam o fragmento do gene do citocromo B, produzindo *amplicons* com mesmo tamanho de *amplicon* (88 pb). Para o ensaio, quatro amostras de DNA diluídas (5ng/µL) foram avaliadas, sendo que cada amostra foi testada para os dois pares diferentes pares de iniciadores. Este teste é muito importante uma vez que amplicons de *B. bovis* foram clonados e utilizados para a construção da curva de calibração que foi utilizada na quantificação das amostras experimentais e, portanto, é necessário garantir o que está sendo amplificado e detectado trata-se de *B. bovis*.

Como pode ser observado na Figura 2, para cada espécie de *Babesia* há uma temperatura da curva de dissociação específica, sendo para *B. bovis* de 77,5°C e para *B. bigemina* de 76,0°C, comprovando a especificidade do teste. Além disso, não houve diferença da temperatura da curva de dissociação entre a amostra do animal para cada espécie de *Babesia*.

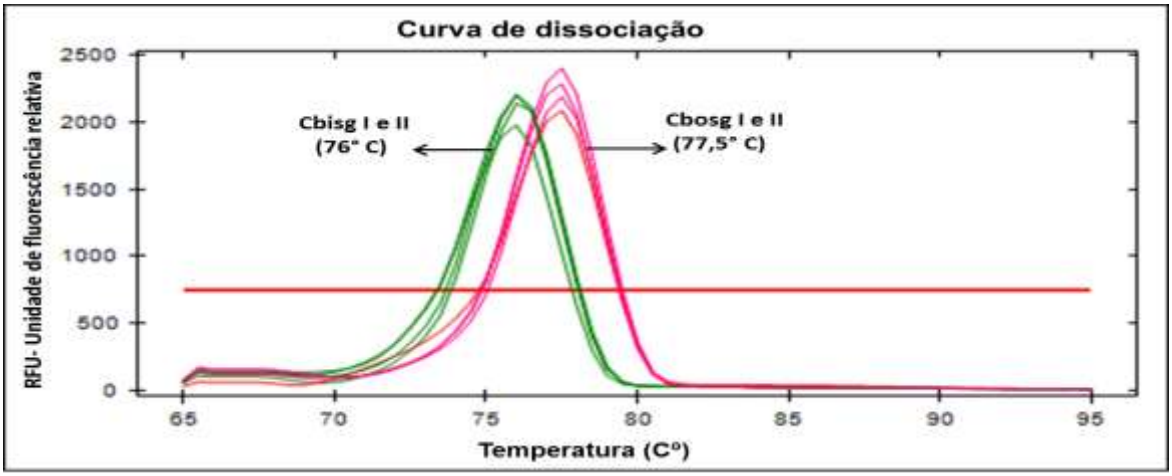

Figura 2. Resultados do teste de especificidade obtidos pela qPCR comparando as temperaturas da curva de dissociação entre os iniciadores específicos para *B. bovis* (Cbosg 1 e 2) e *B. bigemina* (Cbisg 1 e 2). As temperaturas das curvas de dissociação para o amplicon de *B. bovis* foi de 77,5ºC e para o amplicon de *B. bigemina* foi de 76ºC.

4.6.2. Cálculo da eficiência da reação (E) dos ensaios de qPCR

A eficiência da reação (E) descrita por Pfaffl (2001) e Vandesompele et al. (2002) demonstra o quanto que o DNA alvo está sendo produzido em cada ciclo da reação. Uma E de 100% significa que o DNA alvo está sendo duplicado a cada ciclo. O valor padrão da E utilizado nos cálculos é de 100%. Durante o desenvolvimento do ensaio, a E de cada iniciador é avaliada e registrada. Para avaliar a E, uma curva de calibração é gerada utilizando diluições seriadas de uma amostra representativa (neste caso, os isolados clonados de *B. bovis*), e em seguida, grava-se a E para a subsequente análise da quantificação do DNA. O software do equipamento CFX96 da BioRad calcula automaticamente a E, sendo obtida da seguinte forma:

$E = 10^{(-1/Slope)}$

Em que:

Slope = inclinação da linha derivada da curva de calibração

A conversão matemática da E para porcentagem pode ser realizada da seguinte maneira:

% Eficiência = (E - 1) * 100

Os resultados foram analisados com base nos valores de C_q definidos após o término de cada reação. O C_q corresponde ao momento da reação, em que a amplificação do fragmento usado está na fase exponencial, possibilitando analisar de forma quantitativa a taxa de infecção por *B. bovis*, para os respectivos fragmentos em teste, em animais dos diferentes grupos genéticos. A linha *threshold* foi ajustada para um mesmo valor para todos os ensaios de qPCR, pois esta linha é que determinará o ponto exato do C_q de cada amostra e dos valores da curva de calibração. Para cada reação foi obtida uma curva de calibração, possibilitando a estimativa do nível de parasitemia entre os animais dos diferentes grupos genéticos.

4.6.3. PCR convencional para a confirmação da identidade dos produtos da qPCR e construção da curva de calibração

Os *amplicons* do fragmento de *B. bovis* foram clonados e sequenciados. Entretanto, para que isso fosse possível, foi necessário verificar a especificidade dos iniciadores e a possível ocorrência de fragmentos inespecíficos de DNA (dímeros de iniciadores e contaminações). Assim, um ensaio de PCR

convencional contendo amostras de isolados de *B. bovis* e de amostras de DNA do sangue de animais considerados positivos previamente por qPCR foi realizado.

A PCR foi preparada, sendo utilizados os iniciadores Cbosg1 e Cbosg2 e em tubos de 200µL, livres de DNAses e RNAses (Axygen®) em volume final de 20 µL, sendo 2 µLde solução de DNA (10ng) das amostras teste e 20 µL de tampão de reação ("mastermix") com a seguinte composição: Tris-HCl 10 mM; KCl 50 mM; $MgCl_2$ 1,5 mM; 1,5 U de Taq-DNA-Polimerase (Platinum® Taq Technology, Invitrogen™); 200 µM de cada iniciador (Invitrogen™) e 10 pmol de cada iniciador (Cbosg1 e Cbosg2). As condições da reação foram: 40 ciclos de 94ºC de desnaturação, 55ºC de anelamento dos iniciadores e 73ºC de extensão, cada fase com 1 minuto de duração. A reação da PCR foi realizada em termociclador T100™ThermalCycler (BioRad). A eletroforese dos produtos de amplificação foi feita em gel de agarose a 2,0 % contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml). O comprimento dos produtos amplificados foi estimado pela inclusão de um padrão de pares de base (100 Base-PairLadder - Amersham Pharmacia Biotech) no gel de corrida. A visualização dos produtos amplificados foi feita em transiluminador UV. A reação mostrou que apenas o *amplicon* de 88 pares de bases estava presente não contendo a presença de fragmentos inespecíficos e sem contaminação (Figura3).

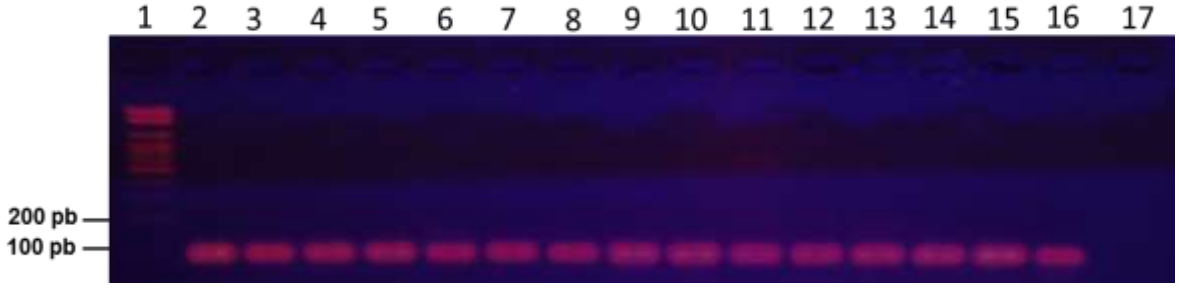

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose com amostras de DNA de *B. bovis* confirmados positivos em ensaios de qPCR. 1= Padrão de peso molecular (pb); 2 – 9: isolados de *B. bovis*; 10 -11: amostras de DNA de sangue de bovinos pertencentes ao experimento; 17: controle negativo.

Em seguida, os produtos da PCR das amostras de *B. bovis* foram purificados (PureLink™ PCR Purification Kit, Invitrogen™), clonados e sequenciados. As amostras clonadas de isolados de *B. bovis* foram utilizadas para a construção da curva de calibração, enquanto as amostras de DNA de sangue de

animais do experimento (tomadas ao acaso) foram sequenciadas e pareadas com as sequências dos isolados para a validação das duas sequências.

4.6.4. Clonagem dos produtos purificados de qPCR para a construção da curva de calibração

A clonagem dos *amplicons* purificados de *B. bovis* foi realizada no laboratório de Genética Animal da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia. O kit de clonagem utilizado foi o pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). O protocolo utilizado para a clonagem seguiu as instruções do fabricante. A enzima de restrição utilizada foi a ECOR1. Após a clonagem, as amostras foram purificadas e sequenciadas no equipamento Amplie Bi systems/HITACHI ABI Prisma® 3130XL Avant Genetic Analyzer, usando o kit BigDye® terminator v.3.1.No total foram clonados e sequenciados 15 amostras (Figura 3), sendo 8 amostras de isolados de *B. bovis* e 7 amostras de DNA de sangue colhidas dos animais. As sequências obtidas na clonagem foram comparadas com as presentes no banco de dados de sequência – GeneBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). As sequências comparadas apresentaram 100% de identidade com sequência de DNA mitocondrial de *B. bovis* do gene que codifica o citocromo b.

4.6.5. Diluições dos produtos clonados e construção da curva de calibração de *B. bovis*

Uma vez padronizada as reações de qPCR e comprovada a ausência de inespecificidade das reações tanto para as amostras contento isolados clonados de *B. bovis* e amostras de DNA dos animais, foi padronizada a curva de calibração para a quantificação das amostras.

Uma alíquota da solução do produto clonado (479,6 ng/µL) foi usada para a construção da curva de calibração. A partir desta solução foram preparadas 10 alíquotas diluídas (10^{-1} a 10^{-10}). Para definição do intervalo de trabalho foi testada a faixa de 10^{-10} a 10^{-1}, no entanto verificou-se que o intervalo de 10^{-8} a 10^{-2}(4,79E-06 ng/µL a 4,79 ng/µL) foi o ideal para quantificação das amostras. Para as demais diluições os valores de C_{qs} ficaram entre os ciclos 13 e 33, que por sua fez corresponde à faixa característica para quantificação das amostras de DNA (Figura 4). Para cada reação de qPCR, uma curva de calibração foi construída.

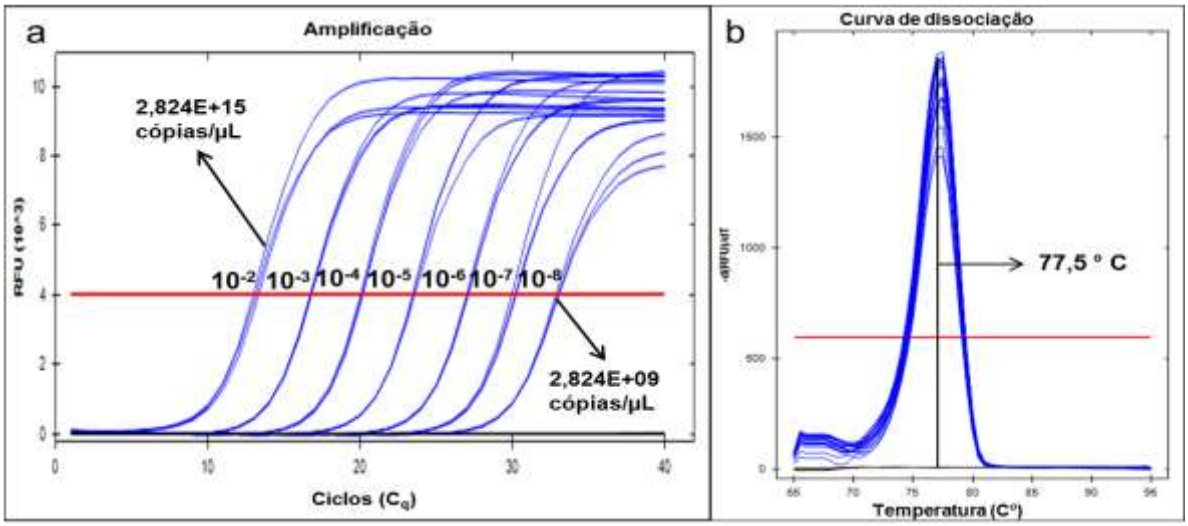

Figura 4. Ensaio de qPCR contendo amostras de amplicons de isolados clonados de *B. bovis* diluídos em série para a construção da curva de calibração (a); Curva de dissociaçãodas amostras diluídas em série estabelecidas em 77°C (b).

4.6.6. Avaliação da sensibilidade da qPCR para a detecção de *B. bovis*

Para verificar a sensibilidade dos ensaios da qPCR, uma alíquota do *amplicons* clonado do isolado de *B. bovis* contendo 1ng/µL foi diluído em série (10^{-1} a 10^{-9}), em que a concentração variou entre 0,1ng/ µL a 0,01 fg/ µL. Para isto, uma reação de qPCR foi realizada com os iniciadores Cbosg1 e Cbosg2 (Quadro 1) e a metodologia utilizada foi a mesma conforme os mesmos procedimentos já citados anteriormente.

4.6.7. Pré-amplificação de amostras de DNA para quantificação por qPCR

Foi verificado nos ensaios de qPCR que a grande maioria das amostras analisadas não ficavam entre os limites de quantificação da curva de calibração (10^{-8} a 10^{-2}). A figura5 representa um exemplo de uma placa de qPCR em que as amostras não puderam ser quantificadas por não estarem dentro dos intervalos de quantificação da curva. Observa-se que as amostras apresentam fase exponencial após aquela da concentração de 10^{-8} da curva de calibração. Desta forma, a grande maioria das amostras de DNA dos animais não poderia ser quantificada pela técnica.

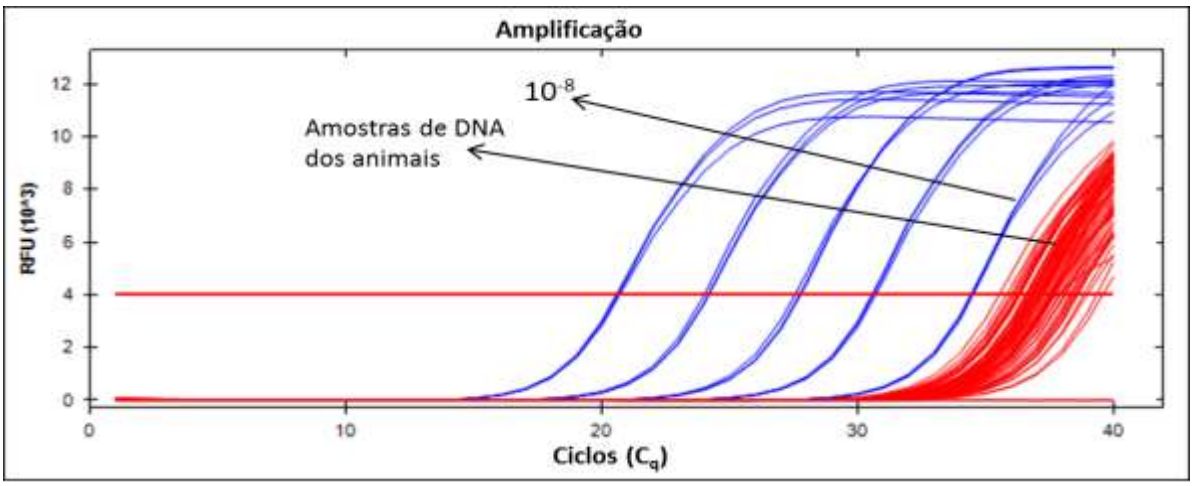

Figura 5. Exemplo dos resultados de uma placa de reação de qPCR contendo amostras que não puderam ser quantificadas por não estarem no intervalo de quantificação da curva de calibração.

Para a possibilidade de utilizar todas as amostras de sangue dos animais no experimento, algumas padronizações e modificações foram necessárias. Uma reação inicial de PCR foi realizada para aumentar a quantidade de DNA. Esta reação, denominada de pré-amplificação, foi realizada utilizando os mesmos reagentes e aparelho descritos para os ensaios da qPCR, com a finalidade de diminuir erros posteriores. As amostras foram pré-amplificadas nas mesmas condições citadas anteriormente, porém, a quantidade de ciclos foi reduzida para 10 ciclos. Os ensaios de pré-amplificação e qPCR foram realizados da seguinte maneira: inicialmente as amostras dos animais foram pré-amplificadas, cada amostra em duplicata, e três controles negativos (“tampão de reação” + água) foram utilizados para cada reação. Ao final desta reação, os tubos contendo as amostras pré-amplificadas permaneciam no aparelho de quantificação, e as amostras contendo as diluições em série da curva de calibração eram inseridas no aparelho. Assim, a quantificação pelo aparelho iniciava com as amostras já pré-amplificadas e as amostras da curva sem pré-amplificação.

Contudo, para proceder com a técnica, foram necessários testes de validação para verificar a reprodutibilidade do ensaio das amostras da curva de calibração e das amostras dos animais. Para isto, duas reações de qPCR seguindo o protocolo já descrito foram realizadas para estes testes. O primeiro ensaio foi realizado com as amostras contendo as diferentes concentrações da curva de calibração. A Figura 6 apresenta a curva de calibração com as amostras diluídas em série dos isolados clonados de *B. bovis* pré-amplificadas. Os valores da eficiência da reação (E), *slope* e coeficiente de correlação (r^2) para a curva de

calibração com pré-amplificação foram de 96,6; -3,405 e 0,998, respectivamente. Uma correlação linear, com um fator de inclinação da curva entre -3,1 e -3,6, que equivale a um cálculo de eficiência de reação de 95-105%, são valores aceitáveis para a maioria das aplicações que requerem quantificação exata.

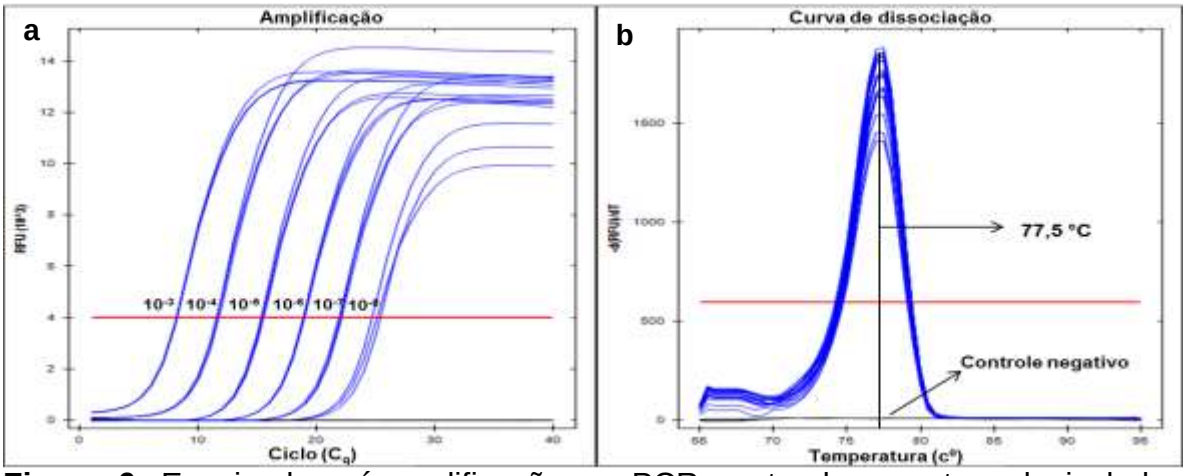

Figura 6. Ensaio de pré-amplificação e qPCR contendo amostras de isolados clonados de *B. bovis*da curva de calibração (a) e curva de dissociação das mesmas amostras (b). As amostras foram pré-amplificadas e em seguida quantificadas por qPCR.

Os testes de reprodutibilidade com amostras de animais foram feitos da mesma maneira. Contudo, ao invés de se verificar os valores de E, *slope* e r^2, foram considerados como um parâmetro comparativo as diferenças dos ciclos entre amostras pré-amplificadas e sem pré-amplificação. Foram comparadas 18 amostras de diferentes animais que foram analisados em duplicatas. Os resultados da diferença de ciclos entre animais testados com e sem pré-amplificação estão apresentados na figura 7 e Tabela 2. A média e desvio-padrão da diferença entre os C_{qs} com e sem pré-amplificação foi de 9,82±0,25. Estes resultados demonstraram que os 10 ciclos iniciais de pré-amplificação são precisos e que as amostras pré-amplificadas podem ser usadas para a quantificação posterior por qPCR. O desvio encontrado (Tabela 2) pode estar associado a erros no processo amostragem, ou seja, devido a retirada de alíquotas contendo diferentes concentrações de DNA de *B. bovis* nas repetições de cada amostra. Desvios semelhantes também são encontrados nas quantificações sem pré-amplificação. A figura 7a ilustra as curvas de amplificação de amostras com e sem pré-amplificação. Não houve mudanças das temperaturas da curva de dissociação entre as amostras com e sem pré-amplificação (figura 7b).

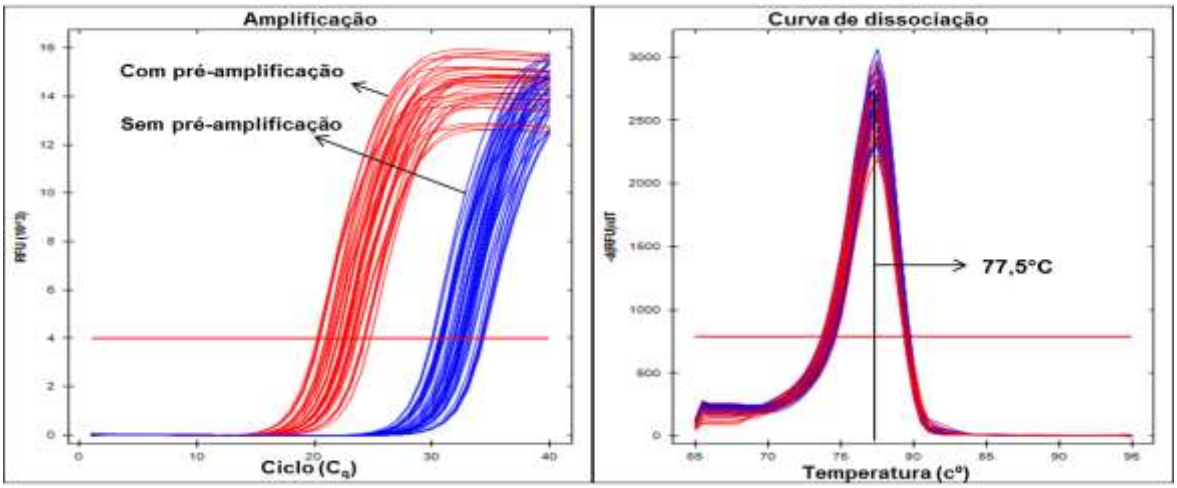

Figura 7. Reações de pré-amplificação seguida de qPCR de amostras dos animais. Os C_{qs} em vermelhos são de amostras oriundas de pré-amplificação, enquanto os C_{qs} em azul foram amplificados sem pré-amplificação (a). A temperatura da curva de dissociação não mudou em ambos os casos (b).

Tabela 2. Valores das diferenças entre os C_{qs} com e sem pré-amplificação em animais utilizados no experimento (n=18).

Amostra	Média C_q sem pré	Média C_q com pré	Diferença
1	32,94	23,10	9,84
2	31,65	22,27	9,38
3	34,06	24,37	9,69
4	33,81	24,02	9,79
5	33,37	23,37	10,00
6	32,61	22,62	9,99
7	33,73	24,60	9,13
8	31,57	21,41	10,16
9	33,05	23,47	9,58
10	33,29	23,49	9,80
11	33,35	22,50	10,85
12	32,30	22,44	9,86
13	35,05	25,16	9,89
14	32,54	23,28	9,26
15	34,96	25,12	9,84
16	33,20	23,56	9,64
17	31,23	21,13	10,10
18	31,70	21,80	9,90
Média			9,82
Desvio-padrão			0,25

4.6.8. Determinação do número de cópias de moléculas de DNA de *B. bovis*

O número de cópias (NC) de moléculas foi calculado seguindo a fórmula descrita por Ke et al., (2006):

$$\text{Número de cópias } /\mu\text{L} = \frac{6{,}022 \text{ x } 10^{23} \left(\frac{\text{cópias}}{\text{mol}}\right) \text{x Concentração } \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{\text{Massa Molecular } \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{L}}\right)}$$

Onde:

-6,022 x 10^{23} é o número de Avogadro;

-Massa Molecular: é o peso molecular médio da molécula do nucleotídeo fita dupla (330 x 2) multiplicado pelo tamanho do fragmento clonado (vetor e inserto, 3088 pb);

Para calcular o número de cópias do produto clonado (número de cópias/µL), a concentração determinada em espectrofotômetro em ng/µL foi convertida para g/µL (x 10^{-9}), e em seguida, multiplicada por 10^{-2} que foi a concentração inicial usada da primeira diluição da curva de calibração do produto clonado e, no final, multiplicado por 1,5 que é o volume da amostra de DNA aplicada (µL).

O valor encontrado do número de cópias foi utilizado pelo software do equipamento CFX96 da BioRad para calcular os valores de quantidade inicial de DNA de *B. bovis* para cada amostra.

Nos ensaios, as pré-amplificações só foram realizadas para as amostras de animais, enquanto a curva de calibração foi obtida sem pré-amplificar os padrões. Como o objetivo do trabalho foi quantificar DNA de *B. bovis* em amostras de animais, e que, sem a pré-amplificação as mesmas não ficariam dentro faixa de quantificação da curva de calibração as amostras dos animais foram pré-amplificadas. Apesar da pré-amplificação aumentar a concentração de DNA na amostra na ordem de 1000 vezes, esse aumento ocorre sistematicamente para todas as amostras, de modo que mesmo deslocando a média não altera a variação dos resultados, o que permitiu a comparação dos valores mesmo superestimados.

4.7. Análise estatística dos dados

Os dados das contagens de *R.(B.) microplus*, NC e A/P foram transformados em log10 (n+1), visando aproximar a distribuição dos dados, em distribuições normais. Após as transformações, os dados foram analisados separadamente para cada grupo genético, utilizando a metodologia dos modelos mistos.

O modelo de análise incluiu o efeito de local e grupo genético (grupo-local), animal dentro de grupo-local, colheita e interação grupo-local x colheita, sendo os efeitos de grupo-local e colheita fixos, e o de animal aleatório. Foram estimados os componentes de variância residual e de animal dentro de grupo-local, sendo a repetibilidade de cada característica estimada, pela correlação intraclasse entre as medidas do mesmo animal, como o componente de variância de animal dividido pela variância fenotípica (residual + animal). As correlações, entre os efeitos residuais foram estimadas a partir das covariâncias entre os efeitos de animal e entre os resíduos. O procedimento MIXED do pacote estatístico SAS foi utilizado para realização das análises.

O teste de qui-quadrado considerando o efeito grupo-local foi realizado para verificar associações entre frequências de positividade para os resultados das quantificações da qPCR e ELISA-teste e para os níveis de ELISA (NE) .

5. RESULTADOS

5.1. Contagens de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Foram observados efeitos significativos (*P<0,05*) de grupo-local, colheita e interação entre grupo-local e colheita para as contagens de *R. (B.) microplus*. As médias da primeira e segunda colheita foram 0,68±0,03 e 0,91±0,03, respectivamente. As maiores médias de contagem de carrapatos foram encontradas nos animais Simental e Simangus de Turvolândia – MG (SITMG) e Angus de José Bonifácio – SP (AJB). O grupo-local Senepol de Pirajuí – SP (SPI) apresentou a menor média (Tabela 3). Em relação aos valores das médias por colheita, os animais Cruzados ½ Senepol x ½ Nelore de Três Lagoas-MS (MS3L) e Angus de Careaçú – MG (ACMG) foram os grupos em que as contagens menos variaram nas duas colheitas.

Tabela 3. Médias geral do número e por colheita e erros-padrão donúmero de *R. (B.) microplus* transformadas em log10 (n+1) por local de colheita x grupo genético.

	Colheita*		
Grupo-Local**	**1**	**2**	**Média**
SITMG	0,82±0,10Ab	1,39±0,10Ba	1,11±0,08a
AJB	1,20±0,05Aa	0,96±0,05Bb	1,08±0,03a
SATMG	0,72±0,08Ab	1,27±0,08Ba	0,99±0,06a
ACMG	0,81±0,08Ab	0,92±0,08Ab	0,87±0,06b
MS3L	0,42±0,03Ac	0,41±0,03Ac	0,41±0,02c
SPI	0,10±0,07Ad	0,48±0,07Bc	0,29±0,05d

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si *(P<0,05*).
**Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si (*P<0,05*).
ACMG= Angus de Careaçú-MG; AJB= Angus de José Bonifácio-SP; MS3L= Cruzados ½ Senepol x ½ Nelore de três lagoas-MS; SPI= Senepol de Pirajuí-SP; SATMG= Simangus de Turvolândia-MG; SITMG= Simental de Turvolândia-MG.

Somente para os animais MS3L e ACMG não houve diferenças entre colheitas. O sentido das variações não foi o mesmo entre as colheitas, para os animais dos outros grupos-locais (Tabela 3), evidenciando o efeito da interação. É importante ressaltar que as variações entre os grupos refletem não apenas as diferenças genéticas, mas também os efeitos de clima e manejo. O grupo de animais SPI apresentou a menor média de contagens de carrapatos comparada aos demais grupos.

5.2. Resultados do teste de ELISA na detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*

As absorvâncias médias dos soros positivos e negativos obtidas por meio do ELISA-teste foram de 0,857±0,152 e 0,090±0,004, respectivamente.

Após a aplicação do ELISA-teste indireto a 15 soros negativos, obteve-se para os mesmos uma média de DO de 0,090±0,004. Dessa forma, a escala de nível de ELISA (NE) ficou assim definida, conforme a Tabela 4:

Tabela 4. Escala de nível de Elisa (NE) segundo as faixas dos valores de A/P. Os soros foram considerados positivos quando os valores de A/P apresentaram-se superiores ou iguais ao NE 4.

NE	Faixas de A/P
1	0,000 - 0,098
2	0,099 - 0,133
3	0,134 - 0,181
4	0,182 - 0,245
5	0,246 - 0,332
6	0,333 - 0,449
7	0,450 - 0,607
8	0,608 - 0,820
9	< 0,821

A positividade dos animais foi estabelecida a partir do NE 4. A média dos controles positivos ficou dentro do NE 9.

Em relação aos Níveis de ELISA (NE), foram verificadas diferenças significativas (*P<0,05*) das frequências entre os diferentes NE em relação às colheitas e grupos-locais. Na Figura 8 estão apresentadas as distribuições das frequências dos valores de NE separados por colheita. Nota-se que as maiores frequências observadas foram nos NE 7 e 8, que também apresentaram a menor variação entre as duas colheitas.

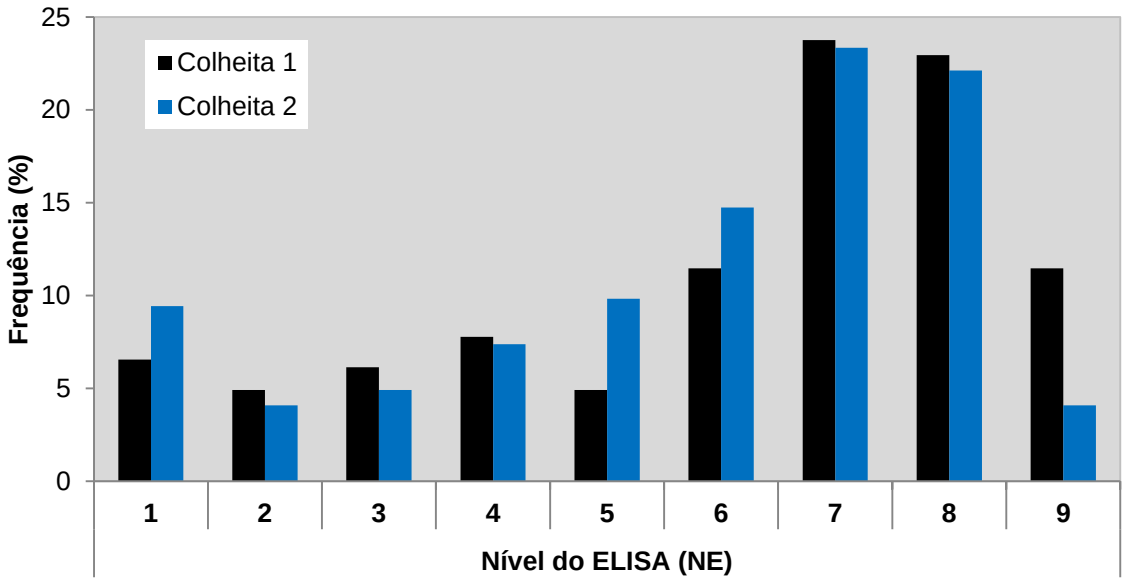

Figura 8. Distribuição geral de frequência dos valores dos Níveis de ELISA (NE) para *B. bovis* de todos os animais utilizados no experimento, de acordo com a colheita (1 e 2).

Analisando-se os NE de acordo com os grupo-locais (Figura 9), pode-se observar que para a maioria dos grupos as maiores frequências ocorreram para os níveis 7 e 8. Os animais SITMG, apresentaram as maiores frequências no nível 7, e pouca variação entre colheitas. As maiores variações entre os valores de NE dentro de grupo foram observadas no grupo MS3L. Este grupo de cruzados apresentou as maiores frequências entre os NE 1 e 4 em ambas as colheitas.

As maiores frequências para o NE 8 foram verificadas no grupo SATMG, na primeira colheita. Os animais AJB também apresentaram altas frequências nos NE 7 e 8, sendo que para o NE 8 não houve variação entre as colheitas. As maiores frequências do NE 9 foram observadas nos animais AJB, SPI e SATMG, nas amostras da primeira colheita.

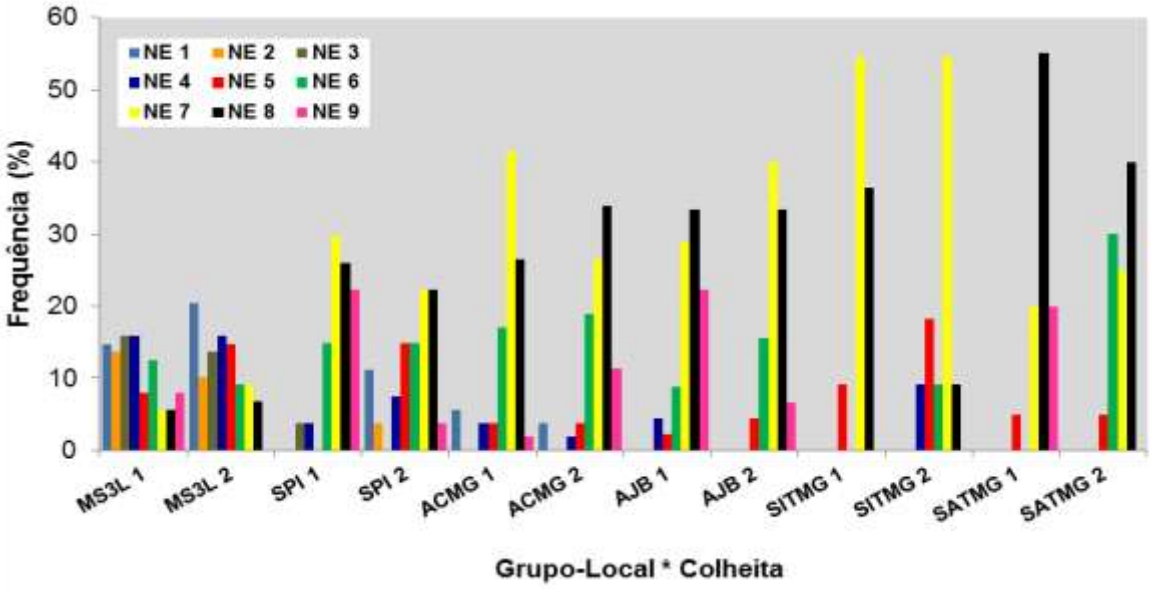

Figura 9. Distribuição geral de frequência dos valores dos Níveis de ELISA (NE) da absorvância de IgG para *B. bovis* separados por grupo-local e colheita. AJB= Angus de José Bonifácio-SP; MS3L= Cruzados ½ Senepol x ½ Nelore de três lagoas-MS; SPI= Senepol de Pirajuí-SP; SATMG= Simangus de Turvolândia-MG; SITMG= Simental de Turvolândia-MG; colheita 1=1 e colheita 2=2.

Foram verificadas diferenças significativas (*P<0,01*) das frequências testadas entre os grupos-locais (Tabela 5). A sensibilidade do ELISA – teste para a detecção de anticorpos da classe IgG como uso de antígenos de *B. bovis* foi de 74,39%. Entretanto, se verificarmos separadamente por local de colheita, observa-se que a maioria dos animais considerados negativos ao teste eram Cruzados ½ Senepol x ½ Nelore provenientes de Três Lagoas-MS (MS3L). Entre estes animais, 60,23% foram considerados negativos. Por outro lado, a frequência de positivos do grupo-local SITMG foi de 100%.

Com relação às frequências de animais soropositivos separados por colheita, nota-se que o grupo-local que mais variou entre as colheitas foi o dos animais Senepol de Pirajuí-SP (SPI) (Tabela 5). Observa-se também que o grupo-local SITMG da primeira colheita e AJB da segunda foram 100% soropositivos. Coincidentemente, o grupo-local MS3L apresentou a mesma frequência de soropositivos em ambas as colheitas (Tabela 5). Apesar disto neste grupo foi notada a maior ocorrência de animais que não apresentaram o mesmo resultado nas duas colheitas. Foi também verificado que animais positivos para *B. bovis* na primeira colheita passaram a ser negativos na segunda, e outros foram negativos na primeira colheita, foram positivos para a segunda. O grupo-local que

apresentou a maior variação entre estes resultados foi MS3L, no qual 40 amostras dos animais deste grupo eram positivas em uma única colheita.

Tabela 5. Frequência de animais soropositivos para *B. bovis* detectados pelo ELISA-teste por grupo-local e grupo-local separado por colheita.

	Geral		Colheita 1		Colheita 2	
Grupo-local	**Positivo (%, n)**	**n total**	**Positivo (%, n)**	**n total**	**Positivo (%, n)**	**n total**
SATMG	100,00 (40)	40	100,00 (20)	20	100,00 (20)	20
AJB	97,78 (88)	90	95,56 (43)	45	100,00 (45)	45
SITMG	95,45 (21)	22	100,00 (11)	11	90,91 (10)	11
ACMG	92,45 (98)	106	90,57 (48)	53	94,34 (50)	53
SPI	85,19 (46)	54	92,59 (25)	27	77,78 (21)	27
MS3L	39,77 (70)	176	39,77 (35)	88	39,77 (35)	88
Total	74,39 (363)	488	74,59 (182)	244	74,18 (181)	244

AJB=Angus de José Bonifácio-SP; MS3L= Cruzados ½ Senepol x ½ Nelore de três lagoas-MS; SPI= Senepol de Pirajuí-SP; SATMG= Simangus de Turvolândia-MG; SITMG= Simental de Turvolândia-MG.

Para o valor da amostra em relação ao referencial positivo (A/P) do ELISA-teste foram verificadas diferenças significativas (*P<0,05*) para todos os efeitos testados. Na Tabela 7 estão apresentados os valores das médias e erros-padrão por grupo-local e separados por colheita. As médias e erros-padrão dos valores de A/P para a primeira e segunda colheita foram 0,19±0,00 e 0,17±0,00, respectivamente. Em relação ao efeito de grupo-local, MS3L foi o único grupo que se diferiu entre os demais, apresentando a menor média de A/P. Com exceção do grupo ACMG, os valores de A/P foram maiores na primeira colheita.

Tabela 6. Médias e erros-padrão dos valores de A/P transformados em log10 do ELISA-teste para *B. bovis* por local de colheita x grupo genético.

	Colheita*		
Grupo-Local**	**Colheita 1**	**Colheita 2**	**Média**
AJB	0,22±0,01Aa	0,20±0,01Aa	0,21±0,00a
SATMG	0,23±0,01Aa	0,19±0,01Ba	0,21±0,01a
ACMG	0,18±0,01Ab	0,19±0,01Aa	0,20±0,01a
SPI	0,21±0,01Aa	0,15±0,01Bb	0,18±0,01a
SITMG	0,20±0,02Aab	0,16±0,02Aab	0,18±0,01a
MS3L	0,11±0,00Ac	0,10±0,00Bc	0,10±0,00b

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si *(P<0,05*).
**Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si (*P<0,05*).
AJB= Angus de José Bonifácio-SP; MS3L= Cruzados ½ Senepol x ½ Nelore de três lagoas-MS; SPI= Senepol de Pirajuí-SP; SATMG= Simangus de Turvolândia-MG; SITMG= Simental de Turvolândia-MG.

5.3. Resultados das quantificações de *B. bovis* por qPCR em Tempo Real

O limite de detecção encontrado para os ensaios de qPCR para a quantificação de *B. bovis* foi de 0,1fg (figura 10). Observa-se na Figura 10 que a partir da concentração de 0,01 fg (1ng x 10^{-8}) não é mais possível confirmar a presença e/ou quantificar *B. bovis* por meio desta técnica. Transformando em número de cópias (NC) seguindo o cálculo de KE et al. (2006), a sensibilidade foi de 600 cópias.

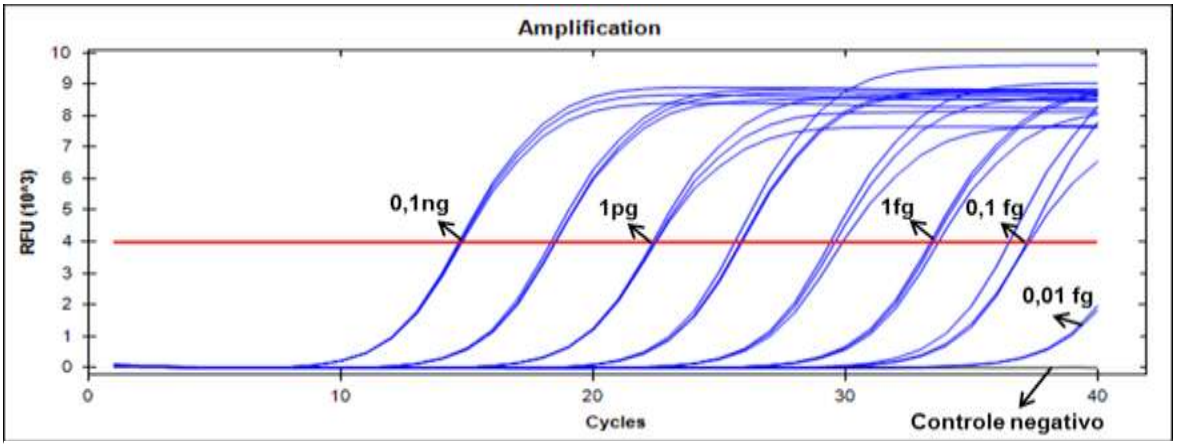

Figura 10. Ensaio de qPCR para teste de sensibilidade dos iniciadores Cbosg1 e Cbosg2 que flanqueiam a sequência do gene do citocromo b *para B. bovis* utilizando o reagente EvaGreen®. As concentrações testadas variaram entre 10^{-1} (0,1 ng/µL) a 10^{-9} (0,01 fg/µL). A menor concentração a qual permitiu a detecção de *B. bovis* para este ensaio foi de 0,1 fg/µL (10^{-8}).

Foram realizados 17 ensaios de qPCR, cada um incluindo uma curva de calibração, as amostras de DNA dos animais e três amostras de controle negativo ("Tampão de reação" + água). Na Tabela8 estão apresentados os valores da Eficácia da reação (E), o *slope* e o coeficiente de correlação (r^2) de cada ensaio de qPCR realizado para quantificação das amostras de DNA dos animais utilizadas no experimento. Os resultados encontrados estão próximos dos valores teóricos considerados ideais que são: E= 100%, *slope*= -3,32 e r^2= 0,999. Nestas condições, para cada 3,32 ciclos de amplificação transcorridos na fase exponencial da reação a concentração dos *amplicons* da PCR aumenta 10 vezes.

Tabela 7. Valores da Eficiência da reação (E), *slope* e coeficiente de correlação (r2) para cada placa analisada no experimento por qPCR.

Placa	E	*slope*	r^2
1	95,0	-3,432	1,000
2	96,7	-3,403	0,998
3	101,1	-3,296	0,997
4	100,5	-3,310	0,999
5	101,0	-3,299	0,998
6	99,5	-3,334	0,998
7	99,2	-3,341	0,997
8	100,1	-3,318	0,998
9	98,9	-3,349	0,998
10	99,7	-3,328	0,999
11	98,6	-3,355	0,998
12	99,3	-3,340	0,999
13	101,1	-3,297	0,998
14	100,4	-3,314	0,998
15	102,2	-3,271	0,998
16	101,2	-3,293	0,996
17	101,9	-3,278	0,996
Média	99,8	-3,327	0,998

Os resultados obtidos nas reações de qPCR de amostras pré-amplificadas demonstraram alta sensibilidade na detecção de *B. bovis*. Todas as amostras de DNA para as duas colheitas analisadas foram positivas para *B. bovis*. Os valores de C_q encontrados ficaram 19,0 e 33,0. Para os controles negativos presentes em cada reação de qPCR não houve amplificação de nenhum produto em todas as placas analisadas nos ensaios.

Para o número de cópias (NC), foram verificados efeitos significativos (*P<0,05*) de grupo-local, colheita e interação entre grupo-local e colheita. Na Tabela9 estão apresentados os valores das médias e erros-padrão dos de grupo-local e separados por colheita. As médias e erros-padrão do NC transformados em log10 para a primeira e segunda colheita foram 12,06±0,04 e 11,28±0,04, respectivamente. A maior média de NC foi verificada para o grupo AJB, que se diferiu dos demais.

Tabela 8. Médias geral e por colheita e erros-padrão do número de cópias (NC) de *B. bovis* transformados em log10 por local de colheita x grupo genético.

	Colheita*		
Grupo-Local**	**Colheita 1**	**Colheita 2**	**Média**
AJB	12,41±0,06Aa	11,62±0,06Ba	12,02±0,05a
SPI	11,97±0,09Abc	11,65±0,09Ba	11,81±0,07b
MS3L	12,01±0,04Ab	11,42±0,04Bb	11,72±0,03b
SATMG	12,10±0,10Ab	10,94±0,10Bc	11,53±0,07c
ACMG	11,75±0,09c	11,20±0,09c	11,47±0,07cd
SITMG	11,80±0,13Abc	10,75±0,13Bcd	11,28±0,09d

*Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si *(P<0,05*).
**Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si (*P<0,05*).
AJB= Animais Angus de José Bonifácio-SP; MS3L= Cruzados ½ Senepol x ½ Nelore de três lagoas-MS; SPI= Senepol de Pirajuí-SP; SATMG= Simangus de Turvolândia-MG; SITMG= Simental de Turvolândia-MG.

O efeito da interação grupo-local x colheita são mais evidentes para os animais Simental (SITMG) e Simangus (SATMG), que apresentavam valores mais altos na primeira colheita e passaram a apresentar os valores mais baixos na segunda colheita (*P<0,05*). É importante notar que estes dois grupos de animais, provenientes do mesmo local e criados nas mesmas condições, não diferiram entre si, em cada colheita, nem com respeito ao NC nem quanto à contagem de carrapatos (Tabela 3). Como se observa na Tabela 9, as médias de NC destes dois grupos na segunda colheita foram as menores entre todos os grupos-locais, enquanto a média de contagem de carrapatos foram as maiores. Nota-se também, nas Tabelas 3 e 8, que para estes animais foram observadas as maiores variações para NC e contagem de carrapatos entre colheitas. Em contraste, para os animais Senepol de Pirajuí – SP (SPI) houve pouca variação das médias de NC entre as colheitas. Assim, ao compararmos somente os animais criados em sistemas de criação de pastejo rotacionado, que eram todos com exceção de SPI, o grupo-local MS3L apresentou a menor média de contagem de carrapatos.

5.4. Repetibilidade e estudo da associação das contagens de *R. (B.) microplus*, NC de *B. bovis* e A/P do ELISA-teste

Foram observadas baixas repetibilidades para contagens de *R. (B.) microplus* e números de cópias (NC). Para os valores de A/P do ELISA-teste, a repetibilidade encontrada foi maior. As estimativas dos componentes de variância e repetibilidade estão apresentadas na Tabela 10. Nas análises de correlação,

não foram encontradas associações significativas (*P>0,05*) entre as três medidas analisadas.

Tabela 9. Valores dos componentes de variância e de repetibilidade (r) estimados para contagem *R.(B.) microplus*, Número de Cópias (NC) de *B. bovis*, e A/P (ELISA-teste).

	R. (B.) microplus		**A/P**		**NC**	
Componente	**Estimado**	**r**	**Estimado**	**r**	**Estimado**	**r**
Animal	0,0066	0,05	0,0015	0,34	0,0085	0,04
Resíduo	0,1154		0,0028		0,1989	

6. DISCUSSÃO

No presente experimento foram usados bovinos *B. t. taurus* e produtos do cruzamento entre B. *t. taurus* e *B. t. indicus*, por serem considerados mais suscetíveis aos carrapatos e às babesioses, quando comparados aos animais puros *B. t. indicus*. As propriedades escolhidas estão localizadas em regiões onde a ocorrência do carrapato é comum, sendo que todos os rebanhos eram monitorados para a presença desse parasita, assim como eram submetidos a tratamentos regulares.

As raças Angus e Simental foram escolhidas por apresentarem alta suscetibilidade aos carrapatos e às babesioses. Os animais oriundos do cruzamento do Senepol com o Nelore foram escolhidos por mostrarem geralmente um grau elevado de resistência a vários parasitas, em estudos conduzidos previamente (MATTIOLI et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2009; IBELLI et al., 2012). Entre as propriedades visitadas, apenas aquela localizada em José Bonifácio apresentava registros de mortalidade de bezerros devido a ocorrência de hemoparasitoses, assim como problemas no controle do carrapato. Bilhassi et al. (2014) trabalhando com o mesmo rebanho de animais Angus, mostrou que essa região apresentava características de estabilidade endêmica para as babesioses. As demais propriedades estavam localizadas em regiões onde se suspeitava que também apresentassem características de estabilidade endêmica, devido, à ocorrência de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do vetor durante todos os meses do ano. Essas suspeitas puderam ser confirmadas a partir dos resultados das sorologias e das qPCRs para *B. bovis*.

Estudos epidemiológicos sobre a prevalência da infecção por babésias nas populações bovinas são fundamentais para a previsão da ocorrência de surtos destas doenças. A estabilidade endêmica caracteriza a maior parte das regiões produtoras de bovinos no Brasil, onde o carrapato *R. (B.) microplus* ocorre durante quase todos os meses do ano, de modo que a taxa de transmissão dos protozoários hemoparasitas é suficiente para infectar a maioria dos bezerros antes que a imunidade passiva conferida pelo colostro seja perdida (MAHONEY; ROSS, 1972). No presente experimento foram usados animais jovens, masque já haviam sofrido infecções sucessivas por babésias e por isso não apresentaram sinais clínicos de infecção na época das colheitas. Como os animais utilizados no presente trabalho eram mantidos em pastos desde o nascimento, é provável que

os anticorpos colostrais tenham evitado o desenvolvimento de muitos casos clínicos e que a exposição aos carrapatos tenha possibilitado o desenvolvimento da imunidade protetora na grande maioria dos animais. Contrariamente ao que ocorre em outras infecções, os bezerros são considerados mais resistentes às infecções por babésias do que os adultos, um fenômeno conhecido como resistência inversamente relacionada à idade (ZINTL et al., 2005). Uma vez controlada a infecção inicial, os animais tornam-se portadores sadios e outros mecanismos imunológicos são responsáveis pelo controle da doença. Sabe-se que os bezerros sofrem as infecções primárias, desenvolvem parasitemias patentes e tornam-se portadores. De acordo com Callow et al. (1986), em áreas endêmicas, a parasitemia é detectável por um período de cerca de 10 dias após a infecção primária e, quando se tornam portadores, atinge níveis não detectáveis pelos exames diretos em microscopia óptica, demonstrando assim a necessidade da utilização de técnicas com alta sensibilidade.

Um dos objetivos deste experimento foi verificar a presença de diferenças nas contagens de carrapatos nos animais dos diferentes grupos genéticos e estimar a repetibilidade da contagem desse parasita. A análise das contagens de *R. (B.) microplus*, mostrou que os animais *B. t. taurus* (AJB, SATMG, SITMG) apresentaram maiores médias, seguidas pelo grupo ACMG, MS3L e SPI. Embora no presente estudo tenha sido utilizado apenas um grupo de animais cruzados taurinos x zebuínos (MS3L) e não tenha sido possível encontrar animais puros e mestiços criados na mesma propriedade, MS3L diferiu da maioria dos grupos taurinos com menores médias encontradas, com exceção do grupo SPI, o qual apresentou a menor média da contagem de carrapatos. É importante salientar que o grupo SPI foi o único rebanho entre os estudados, que era criado em confinamento e esse fato deve ter influenciado no número de ectoparasitas presentes no corpo desses animais. O contato destes animais com larvas infestantes era muito restrito, pelo fato de serem animais selecionados para exposições.

De maneira geral, os nossos achados estão de acordo com muitos estudos que mostraram a maior resistência dos animais cruzados de taurinos com zebuínos a estes parasitas (UTECH et al., 1978; OLIVEIRA; ALENCAR, 1987; OLIVEIRA; ALENCAR, 1990; WAMBURA et al., 1998; SANTOS JÚNIOR et al., 2000; SILVA et al., 2007; 2010; OLIVEIRA et al. 2013).

No presente estudo, a média das contagens de carrapatos encontradas para o grupo MS3L foi de 0,41±0,02, sendo que a menor média de contagem de um grupo taurino criado extensivamente foi de 0,87±0,08 dos animais do grupo ACMG. Os resultados encontrados neste estudo estão próximos daqueles descritos por Silva et al. (2010). Estes autores estudaram a infestação natural de *R. (B.) microplus* em quatro grupos genéticos diferentes (Nelore, Canchim x Nelore, Angus x Nelore e Simental x Nelore) em diferentes épocas do ano, e verificaram que o grupo Nelore apresentou a menor média de contagens de carrapatos. Entretanto, os autores ressaltaram que as diferenças verificadas entre os diferentes grupos genéticos eram também dependentes do efeito do ano e da época das contagens. Embora, no presente experimento não tenham sido utilizados animais zebuínos puros, as médias encontradas no grupo MS3L durante as duas contagens de carrapatos (inverno e verão, 0,42 e 0,41) também ficaram próximas daquelas descritas por estes autores para os animais Nelore na primavera de 2003 e verão de 2004.

Além da resistência aos ectoparasitas, animais cruzados Senepol x Nelore também são considerados resistentes a tripanossomoses e helmintos (MATTIOLI et al., 1993; OLIVEIRA, et al., 2009), além da reconhecida tolerância ao calor (RIBEIRO et al., 2009). Existem vários mecanismos de resistência aos carrapatos que não são ainda bem compreendidos, mas que incluem desde reações de hipersensibilidade (KEMP; BOURNE, 1980), comportamento de auto limpeza (De CASTRO et al., 1985), resposta imune específica (KASHINO et al., 2005) e características do pelame (IBELLI et al., 2012), entre outros.

Oliveira et al. (2013) destacaram que embora, os níveis das infestações pelo carrapato tenham variado entre os grupos genéticos estudados por eles (Nelore e cruzados com alta porcentagem de sangue taurino), o clima foi um fator que exerceu grande influencia sobre o número de parasitas encontrados nos animais a cada colheita. No presente experimento não foi possível a realização das colheitas durante um período que compreendesse uma única estação do ano, de modo que as contagens de *R.(B.) microplus* foram realizadas nas diferentes estações. Entretanto, observa-se que mesmo nas épocas do outono e inverno, foram verificadas altas contagens de carrapato, como é o caso dos animais do grupo AJB. Na primeira colheita, realizada no outono, este grupo-local apresentou contagens superiores quando comparados a todos os outros grupos-locais. Na

segunda colheita ele não diferiu do grupo ACMG em que a colheita foi realizada no verão. Na literatura, os resultados também divergem quanto a época de maior infestação do carrapato. Alguns autores declaram que as maiores infestações de *R.(B.) microplus* podem ocorrer nos períodos de outono (BRUM et al., 1987; VERÍSSIMO et al., 1997; ANDRADE et al., 1998), outono e inverno (GUARAGNA et al., 1988; OLIVEIRA et al., 1989), no inverno (UTECH et al., 1978) e no verão. Silva et al. (2010) verificaram que as maiores infestações de carrapato ocorreram no inverno e no outono, enquanto as menores ocorreram na primavera e no verão. Resultados contrastantes também foram encontrados por Oliveira et al. (2013) que verificaram maiores picos de infestação nos meses mais úmidos que ocorreram na primavera e no verão.

Para as duas contagens de carrapatos feitas neste experimento a repetibilidade encontrada foi de 0,05. Estes achados contrastam com os encontrados por Mackinnon et al. (1991) que calcularam a repetibilidade de 0,45, ao estudar a infestação natural deste carrapato em diferentes grupos genéticos. Esses autores trabalharam com dados de contagens de carrapatos registrados ao longo de cinco anos. No Brasil, Fraga et al. (2003) estudaram a resistência aos carrapatos em animais Caracu por meio de contagens e escores da infestação natural e verificaram repetibilidade de 0,29 e 0,21, respectivamente. Estes autores verificaram que o número de contagens influenciou significativamente a repetibilidade. Assim eles comentaram que uma primeira contagem seria 29% acurada para predizer a segunda contagem, enquanto que a média das duas primeiras seria 45% acurada para predizer a terceira contagem. No presente estudo, foram realizadas apenas duas contagem de carrapatos, em diferentes épocas do ano e isso pode ter influenciado o valor da estimativa de repetibilidade. Silva et al. (2007) estudaram a infestação artificial por *R.(B.) microplus* em bovinos de diferentes grupos genéticos e encontraram repetibilidade de 0,65. Este valor foi estimado a partir de quatro contagens de carrapatos com intervalos de 14 dias. Segundo os autores o valor da repetibilidade encontrada por eles já era esperado, pois as condições ambientais deste estudo eram mais controladas quando comparadas a situações de infestações naturais, e que longos períodos entre as contagens de carrapatos pode reduzir a repetibilidade devido a alterações fisiológicas nos animais, no clima e nas pastagens. A baixa repetibilidade para as contagens de carrapatos encontrada no presente experimento ocorreu

provavelmente devido ao pequeno número de contagens, mudanças nas condições climáticas em cada coleta, e especialmente à presença de interação entre os grupos locais e coletas. De qualquer forma o valor indica que, nas condições deste experimento em que cada grupo foi sujeito a um tipo de manejo, a variação ambiente em cada medida foi muito mais importante que a capacidade do animal em manter a infestação em valores mais baixos. Assim, para um estudo mais abrangente, presume-se que maior número de contagens, e condições mais controladas seja necessário.

Com relação ao ELISA-teste, verificou-se uma soroprevalência de anticorpos da classe IgG anti - *B. bovis* de 73,39%, com 74,59% e 74,18% soropositivos na primeira e segunda colheita, respectivamente. Pôde-se observar que praticamente não houve variação entre as colheitas. Entretanto, a análise dos resultados para os grupos *B. t. taurus* e *B. t. taurus* x *B. t. indicus*, mostraram diferenças significativas, sendo de 94,17%para os animais taurinos e de 39,77%para os animais Cruzados.

A interpretação da soroprevalência obtida para os animais MS3L indicaria a ocorrência de instabilidade endêmica naquela região do Mato Grosso do Sul. Entretanto, nas duas coletas foram encontrados carrapatos nos animais provenientes deste local, e não houve relato da ocorrência de casos clínicos de babesiose. Na literatura, os estudos que utilizaram o ELISA-teste em sua grande maioria descreveram padronizações da técnica e levantamentos epidemiológicos (BÖSE et al., 1990; De ECHAIDE et al., 1995; ARAUJO et al., 1998; MOLLOY et al., 1998; GONÇALVES et al., 1999; GOFF et al., 2003). Não são encontrados estudos que se referem a comparação entre níveis de titulação de anticorpos entre bovinos de diferentes grupos genéticos. Se considerarmos apenas os grupos dos animais taurinos, as frequências de soropositivos encontradas no presente estudo seriam semelhantes àquelas descritas na maior parte dos estudos citados acima.

A repetibilidade encontrada para os valores de A/P e NE obtidas do ELISA-teste foi de 0,34 e 0,35, respectivamente. Não há na literatura trabalhos em que se estimou o coeficiente de repetibilidade dos resultados do ELISA-teste. Este valor pode ser interpretado como a correlação entre as medidas subsequentes do mesmo animal, indicando que apenas uma medida é relativamente pouca para evidenciar a capacidade do animal produzir anticorpos.

Os resultados das quantificações do DNA de *B. bovis* a partir da qPCR demonstraram que todas as amostras de sangue utilizadas no experimento continham o DNA do hemoparasita. Esses resultados são fidedignos, uma vez que para cada placa de reação foram incluídos controles negativos em que não foi verificada amplificação.

Na comparação das técnicas de ELISA-teste e qPCR, esta última foi mais na detecção de *B. bovis*. Além disso, pela qPCR foi possível estabelecer que os produtos de amplificação da qPCR eram específicos para *B. bovis*, usando controles específicos e *B. bigemina* a fim de diferenciar os dois parasitas. Os dois protozoários puderam ser facilmente diferenciados por meio das diferentes temperaturas das curvas de dissociação de cada um. Em ensaios de ELISA-teste pode ocorrer reações cruzadas entre *B. bovis e B. bigemina* (KUTLER, 1981), que limita sua especificidade. As frequências de animais soropositivos obtidas por meio do ELISA-teste mostraram que o único grupo em que todos os animais foram soropositivos foi SATMG. Como citado anteriormente, os resultados obtidos pelo ELISA-teste para o grupo-local MS3L indicaria uma zona de instabilidade endêmica. Entretanto, esta hipótese não pode ser confirmada, uma vez que os ensaios da qPCR mostraram que todos os animais deste grupo apresentaram-se infectados por *B. bovis*. Além disso, foi verificado que em ambas as contagens os animais deste grupo apresentaram-se infestados por carrapatos. Em um estudo epidemiológico, Madruga et al. (2000) verificaram a titulação de IgG anti- *B. bovis* por meio do ELISA-teste em soros de 1365 animais provenientes da região do Pantanal em Matogrosso do Sul, e verificaram que 83,9% foram positivos para os anticorpos para *B. bovis*, caracterizando a região estudada como endemicamente estável. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por qPCR nos animais MS3L. A sensibilidade do ensaio de qPCR para a quantificação do DNA de *B. bovis* verificada no presente estudo foi de 100%, enquanto que para os ensaios de titulação de IgG detectados pelo ELISA-teste foi de 74,39%. Atualmente muitos autores têm trabalhado com metodologias moleculares e testes sorológicos conjuntamente a fim de melhorar os dados para monitoramento e diagnóstico das babesioses. Na literatura foram encontrados vários estudos que usaram as duas técnicas de diagnóstico e observaram melhores resultados do ELISA-teste quando comparado aos estudos moleculares, tanto aos que se referem ao Nested-PCR (TERKAWI et al., 2012; TERKAWI et al., 2011;

MACHADO et al., 2012; IBRAHIM et al., 2013), quanto aos estudos da PCR em Tempo Real (RAMOS et al., 2011; SHEBISH et al., 2012; HÜE et al., 2013; SILVA et al., 2013; ROSALES et al., 2013). O uso simultâneo de exames moleculares e testes sorológicos pode ser uma importante ferramenta a ser usada em estudos epidemiológicos diversos. Hüe et al. (2013) estudaram diferentes métodos para monitorar surtos de *B. bovis* em um rebanho de bovinos “naives” e constataram que o ELISA-teste e a qPCR foram ferramentas adequadas para o acompanhamento da evolução dos surtos de babesioses. Entretanto, estes autores declararam que o uso dos dois diferentes métodos de diagnóstico depende primordialmente do objetivo do monitoramento. Quando comparamos os resultados das quantificações do DNA de *B. bovis* por qPCR e os níveis de anticorpos da classe IgG contra *B. bovis* detectados pelo ELISA-teste, no presente trabalho verificamos que nos ensaios de qPCR, além da prevalência de 100%, as quantificações de *B. bovis* para o grupo MS3L apresentaram valores altos em média, superados apenas pelo grupo-local AJB, enquanto que para o ELISA-teste MS3L apresentou 39,77% de soroprevalência em cada colheita. É interessante ressaltar para este grupo que, se fossem consideradas como soropositivas as amostras que foram negativas apenas em uma colheita, a prevalência seria de 62,5%. Também Ferreri et al. (2008), trabalhando com diagnóstico de *B. bovis* em búfalos na Argentina, ao utilizarem as técnicas Nested-PCR e ELISA-teste, verificaram que a técnica molecular apresentou maior sensibilidade. Resultados diferentes foram encontrados por Rosales et al. (2013) quando diagnosticaram *B. caballi* em cavalos venezuelanos por meio da técnica da qPCR e ELISA-teste. Estes autores não conseguiram detectar este parasita pela técnica molecular, enquanto que para o ELISA-teste identificaram 23,2% como portadores da doença. Os autores declararam que esta discrepância encontrada pode ser explicada pelos diferentes parâmetros que são avaliados em cada técnica, sendo que a qPCR detecta o DNA do parasita, enquanto o ELISA-teste detecta anticorpos contra o parasita.

Embora a grande maioria dos trabalhos demonstre maior sensibilidade do ELISA-teste para a detecção das babesioses quando comparados aos estudos moleculares, alguns detalhes devem ser considerados quando realizamos tais comparações. Em nosso estudo, quando realizamos as quantificações do DNA de *B. bovis* por meio da técnica da qPCR, os iniciadores utilizados para este fim

(BULING et al, 2007) são sequências de DNA mitocondrial de babésias que flanqueiam genes que codificam o citocromo b, sendo assim genes de múltiplas cópias. Isto pode ser responsável pelo aumento da sensibilidade encontrada nestes ensaios. Ramos et al., (2011) estudaram a detecção de *B. bovis* através da técnica da PCR em Tempo Real e ELISA-teste. Estes autores utilizaram iniciadores que flanqueiam sequências de genes de cópia única e monitoraram duas regiões diferentes, uma localizada em área de estabilidade endêmica para babesioses (Juíz de Fora, MG) e a outra localizada em área de instabilidade endêmica (Bagé, RS). Para a área de estabilidade endêmica as frequências de positivos para *B. bovis* através das técnicas da qPCR, PCR convencional e ELISA-teste foram 95,91%, 82,65 e 92,85, respectivamente. Já para a área de instabilidade endêmica só foi possível a detecção de *B. bovis* pela qPCR, detectando-se 10% de animais portadores de *B. bovis*. Os resultados obtidos por estes autores podem sustentar os nossos achados, pois mesmo utilizando sequências de genes de cópia única, verificaram alta sensibilidade do teste. Também no presente experimento pode-se concluir que o ELISA-teste apresentou alta sensibilidade entre os grupos-locais taurinos testados (média de 94,2%).

Outro fator que pode ter influenciado os resultados da soroprevalência pelo ELISA-teste encontrados para o grupo-local MS3L é a variação antigênica entre isolados de *B. bovis*, que pode ser encontrada nas diferentes regiões onde há a ocorrência deste parasita. Segundo Dalgliesh e Stewart (1993), isolados e amostras selecionadas deste parasita podem diferir antigenicamente. Experimentos de imunidade cruzada demonstraram que bovinos são mais resistentes quando são desafiados com o mesmo isolado homólogo do que quando são desafiados com isolados heterólogos (De VOS et al., 1987; DALGLIESH; STEWART, 1993; SHKAP et al, 1994). Allred (2003) salienta que a variação antigênica é um dos fatores que provavelmente pode facilitar a persistência da resposta imune individual do hospedeiro. Este autor também sugeriu que a expressão mono-alélica de diferentes membros de uma família multi-gênica pode facilitar infecções múltiplas no hospedeiro, e a dispersão da população em áreas endêmicas.

Quanto aos altos índices de animais positivos nas qPCRs, muitos podem ser os fatores associados a esses resultados. Salem et al. (1999) desenvolveram um teste de PCR para avaliar a sensibilidade e a especificidade na detecção de *B.*

bigemina e *B. bovis* comparando-se sequências de DNA episssomal e ribossomal destes parasitas. A sequência episssomal é pertencente ao gene do citocromo b do DNA mitocondrial de *Babesia*. Para a sequência episssomal, eles detectaram 85% de *B. bovis* enquanto que para a sequência ribossomal encontraram 65%. Os autores declararam que a maior sensibilidade encontrada para PCR realizada a partir de regiões episssomais pode ser explicada em função do número de cópias das duas sequências. Enquanto cada parasita possui em seu genoma três cópias do gene ribossomal, o mesmo possui cerca de 100 cópias do DNA episssomal. Estas informações reforçam os achados encontrados no presente estudo, uma vez que utilizamos iniciadores que flanqueiam regiões do gene do citocromo b do DNA mitocondrial, específico para *B. bovis* e que segundo Buling et al. (2007) provocou um aumento de mais de 100 vezes da sensibilidade do teste.

No presente experimento foi usado o corante EvaGreen®, que pode ter atuado melhorando ainda mais a detecção e quantificação do DNA de *B. bovis*. Segundo Wang et al. (2006) reações de PCR em Tempo Real que fazem o uso do corante EvaGreen® requerem baixas quantidades de DNA e de corante, especialmente útil quando as amostras apresentam baixas concentrações de DNA. Mao et al. (2007) caracterizaram o EvaGreen® e as implicações de suas propriedades físico-químicas para aplicações em qPCR e verificaram que o uso desse corante implica no menor aparecimento de amplificações não específicas além de baixa inibição da reação de polimerização do DNA.

Os ensaios de qPCR utilizando a padronização da pré-amplificação possibilitaram a quantificação de *B. bovis* em todos os animais usados no presente estudo. Os testes de reprodutibilidade, tanto para as amostras de isolados clonados que foram utilizados para a construção da curva de calibração, quanto as amostras de DNA dos animais, permitiram verificar que o teste é reprodutível e pode ser utilizado para ensaios de quantificação absoluta. Na literatura, não existem muitas informações sobre a utilização da técnica de pré-amplificação para a quantificação absoluta por qPCR. Em estudos de expressão gênica em que a quantidade de RNA extraído é limitada, com consequente baixa concentração desse ácido nucleico, tem-se utilizado a pré-amplificação com a finalidade de aumentar a sensibilidade da transcrição reversa (RT-PCR), especialmente em estudos com genes de baixa abundância (NOUTSIAS et al., 2008).

Para quantificação dos produtos pré-amplificados foram utilizados os mesmos reagentes da pré-amplificação, possibilitando uma maior precisão e sensibilidade do teste. A média das diferenças entre as amostras com e sem pré-amplificação ficaram próximas dos 10 ciclos (9,82±0,25), comprovando que é possível utilizar a pré-amplificação para qPCR, especialmente quando a presença do DNA alvo é pequena.

Estudos genômicos são amplamente utilizados para a análise de organismos geneticamente modificados (OGM) devido à sua alta detectabilidade. Entretanto, a detecção e a quantificação exata do DNA são dependentes da especificidade e sensibilidade do protocolo de amplificação, bem como na qualidade e quantidade do DNA usado na reação de PCR (Del GAUDIO et al., 2010). A fim de aumentar a sensibilidade da PCR em tempo real e, consequentemente, aumentar o número de genes alvo para análise, esses autores usaram a técnica de pré-amplificação em alimentos processados, onde o DNA poderia estar presente em quantidades baixas e/ou em formas degradadas. Estes autores utilizaram iniciadores específicos para a pré-amplificação e verificaram melhoria dos valores de C_{qs} dos genes pré-amplificados estudados, evidenciando que a técnica pode ser igualmente aplicável a outros campos que exigem testes de DNA por qPCR. Embora no presente trabalho não se tenha estudado a expressão gênica, o princípio da técnica de quantificação absoluta por qPCR utilizado pode ser considerado o mesmo. As diferenças existentes são que nos estudos de expressão gênica o produto pré-amplificado é a molécula de cDNA sintetizada a partir de uma molécula de RNA extraída de tecido, e no presente trabalho, o produto pré-amplificado é a própria molécula de DNA de *B. bovis* contida no DNA genômico extraídos de sangue dos animais.

A dificuldade de se quantificar o DNA por qPCR encontrada no presente estudo também foi encontrada em estudos de genética humana, como foi descrito por Lau et al., (2003). Estes autores estudaram a síndrome respiratória aguda grave (SARS) causada pelo coronavírus em humanos, e compararam a técnica da PCR tradicional, a qPCR e a qPCR denominada pelos autores de "melhorada", sendo esta auxiliada pela pré-amplificação. Os autores verificaram que esta última foi 100 vezes mais sensível do que o ensaio de PCR em tempo real e 10^7 vezes mais sensível do que os métodos convencionais de PCR. Esses autores

afirmaram que a melhor sensibilidade deste ensaio pode ajudar em trabalhos de controle da propagação da doença durante futuros surtos de SARS.

Para a realização da técnica de pré-amplificação no presente trabalho foi utilizado o mesmo par de iniciadores usados para a quantificação do produto pré-amplificado por qPCR. Desta forma, os valores do número de cópias (NC) quantificados eram aqueles em que se consideravam a quantidade de molécula de DNA da reação de pré-amplificação mais a quantidade detectada em cada reação de qPCR. Noutsias et al. (2008) analisaram dois tipos de técnicas de pré-amplificação para estudos de expressão gênica. Uma das técnicas, a T-PreAmp (TaqMan® PreAmp Master Mix techine) se baseava em pré-amplificar produtos de cDNA e analisar a expressão gênica, e em ambos os procedimentos, se utilizava dos mesmos iniciadores. A outra técnica, a SSRT (sequência específica da transcriptase reversa) era semelhante, porém a amplificação dos genes para os estudos da expressão era realizada com outros iniciadores diferentes daqueles da pré-amplificação, sendo considerada uma reação de Nested-PCR em tempo real. Eles concluíram que na comparação das duas técnicas, a T-PreAmp permitia um fluxo de trabalho relativamente simples, que resultou em uma forte pré-amplificação de múltiplos genes alvos, com a antecipação do C_q em cerca de 7 ciclos. No presente trabalho observamos um aumento derivado da pré-amplificação de cerca de 10 ciclos de antecipação, comparada ao produto não pré-amplificado.

Hernandéz-Arteaga e López-Revilla (2010), quantificaram sequências oncogênicas do papilomavirus humano através da técnica da Nested-PCR em tempo real utilizando o mesmo corante do presente experimento, o EvaGreen. Ao contrário do que foi realizado no presente estudo, a pré-amplificação realizada por estes autores foi feita por PCR convencional, e em seguida a Nested-PCR em tempo real com iniciadores que flanqueavam uma região dentro do *amplicon* da PCR convencional. Entretanto, os resultados encontrados por estes autores são semelhantes ao verificados no presente trabalho, principalmente no que diz respeito às diluições feitas para quantificações do número de cópias (NC), pois houve uma antecipação seriada dos ciclos de amplificação das amostras diluídas pré-amplificadas, aumentando a sensibilidade do teste e consequentemente a quantificação da sequência do oncogene.

Em relação ao teste de sensibilidade para o ensaio de qPCR padronizados para a quantificação de *B. bovis*, verificamos que a concentração mínima do produto clonado de *B. bovis* que permitiu a detecção deste parasita foi de 0,1fg/µL, a mesma sensibilidade encontrada por Buling et al., (2007), que descreveu a técnica. Entretanto, através da transformação em número de cópias (NC) descrita por Ke et al. (2006), pôde-se verificar que a sensibilidade do ensaio no presente experimento foi de 600 cópias, enquanto que Buling et al. (2007) calculou que o teste padronizado por eles tinha a sensibilidade de 1000 cópias. Essa pequena diferença nesses resultados podem ter ocorrido principalmente devido a características próprias dos equipamentos e dos reagentes usados, que foram diferentes.

Um dos principais objetivos do presente estudo foi investigar se havia alguma diferença na quantidade do DNA de *B. bovis* presente em amostras de sangue de bovinos de diferentes grupos genéticos. Como já exposto acima, os testes de qPCR usados no presente experimento mostraram elevada sensibilidade e especificidade tornando possível avaliar quantitativamente o DNA de *B. bovis* presente nas amostras de sangue de todos os animais dos diferentes grupos genéticos. Desta forma, para todos os municípios estudados, assumimos que eles apresentaram uma condição de estabilidade endêmica, principalmente devido às condições climáticas prevalecentes que são favoráveis ao desenvolvimento do vetor. Os resultados obtidos no presente estudo com as qPCR dão suporte a esta suposição.

Uma das maneiras que tem sido propostas para o controle de carrapatos e babésias em áreas de alta ocorrência destes parasitas é a introdução de animais naturalmente resistentes, tais como diversos cruzamentos de bovinos *B. t. indicus*. Embora alguns autores tenham postulado que a introdução do sangue de *B. t. indicus* poderia reduzir o nível de inoculação de *Babesia* ao ponto de converter estabilidade em instabilidade endêmica, (GUGLIELMONE, 1995; UILENBERG, 1995), esta suposição não pôde ser confirmada por Oliveira et al. (2008), Bilhassi et al. (2014) e no presente estudo.

Bilhassi et al. (2014) estudaram animais *Nelore*, Nelore x Angus e Angus e verificaram as prevalências de infecção por *B. bovis* de 96%, 98% e 100% respectivamente. No estudo destes autores não foram verificadas diferenças na prevalência de infecção entre animais Nelore, cruzados e Angus. Resultados

semelhantes foram encontrados no presente trabalho, uma vez que em todos os animais estudados foram positivos para *B. bovis*. Entretanto, ao considerarmos as quantificações do DNA do parasita, nos diversos grupos genéticos o presente estudo difere em parte, dos achados por Bilhassi et al. (2014). Estes autores verificaram que as médias do número de cópias de DNA de *B. bovis* foram significativamente maiores para os animais da raça Angus, sendo que não houve diferença entre os grupos Nelore e cruzados Nelore x Angus. No presente trabalho, apesar de não terem sido avaliados animais puros *B. t. indicus*, foram avaliados seis rebanhos de diferentes grupos genéticos e locais, sendo cinco *B. t. taurus* e um *B. t. taurus* x *B. t. indicus*. Foi verificado que o grupo AJB apresentou a maior média de NC, sendo que na primeira colheita a média do NC foi superior à segunda. Os grupos SPI e MS3L não diferiram entre si, e o primeiro grupo na primeira colheita apresentou quantificação muito próxima daquela observada para o grupo AJB. O grupo MS3L embora constituído de animais com 50% de sangue zebuíno apresentaram médias de contagens mais próximas das observadas para o grupo AJB. O grupo SATMG não diferiu do ACMG e o SITMG apresentou a menor média de NC.

A maior média de NC observadas para os animais AJB em relação aos demais grupos está de acordo com achados anteriores em animais da mesma propriedade. Entretanto, ao consideramos a mesma raça, porém de um local diferente, verificamos que o rebanho Angus provenientes de Careaçu-MG (ACMG) apresentaram médias do NC inferiores quando comparadas ao grupo AJB, que também foram inferiores à MS3L. A análise desses resultados indica que existem outros fatores além da raça dos animais, que podem influenciar a taxa de parasitemia por *B. bovis*. Bilhassi et al. (2014) postularam que a maior resistência encontrada nos animais Nelore pode estar associada ao fato de esses animais desenvolverem uma resposta imunológica mais eficiente contra *B. bovis,* provavelmente porque zebuínos têm evoluído na presença de carrapatos e das babesioses. O rebanho MS3L apresentou médias de NC superiores quando comparadas aos grupos-locais ACMG, SATMG e SITMG. Vale a pena lembrar que, dois destes três grupos (SATMG e SITMG) eram provenientes de uma mesma propriedade, e que também o grupo ACMG mesmo não sendo da mesma propriedade, era de uma propriedade próxima e pertencente ao mesmo produtor destes outros dois grupos, apresentando, portanto condições de clima e manejo

muito semelhantes. Outra informação importante, é que o grupo AJB que apresentou a maior média de NC era proveniente da mesma propriedade a qual pertenciam os animais Angus que Bilhassi et al. (2014) utilizaram.

No que diz respeito à resistência do hospedeiro, tem sido estabelecido que as raças variam quanto a sua resistência aos carrapatos, e embora haja pouca informação disponível sobre a resistência genética à babesiose, a variação entre as raças de bovinos foi observada (AGUIRRE et al., 1990; BOCK et al, 1997, 1999). *B. t. indicus* são mais resistentes a carrapatos e às babesioses que *B. t. taurus* (JONSSON et al, 2008; PIPER et al, 2010). Os genes envolvidos na expressão da resistência às babesioses ainda não foram bem identificados, mas sabe-se que é uma característica hereditária (BILHASSI et al., 2014). Porém os resultados obtidos no presente experimento levam à hipótese que na verdade o NC em cada animal depende da raça e do manejo geral a que o animal é submetido, incluindo as condições ambientais e de clima.

Outra importante informação que podemos salientar são os resultados encontrados para a quantificação do DNA de *B. bovis* para os animais Senepol de Pirajuí, SP (SPI) que, foram os únicos animais deste experimento criados em um sistema de confinamento integral. Estes animais apresentaram médias inferiores de NC somente quando comparadas ao grupo AJB, entretanto, a média da contagem de *R. (B.) microplus* foi a menor observada entre os grupos. O fato do grupo SPI não ter apresentado infestações semelhantes aos outros grupos de taurinos puros e NC superiores aos SATMG, ACMG e SITMG não pode ser considerado um indicativo de que quantidade do inóculo estaria associada com a quantidade de carrapatos no animal, pois não podemos afirmar quais foram as infestações antes da primeira e segunda colheita. Outros fatores associados aos dados de NC e que poderiam influenciar os resultados são relacionados a características específicas da amostra do parasita.

Através do método da qPCR aplicado no presente estudo, foi possível estimar o nível de parasitemia por *B. bovis* com mais precisão e observar que o grupo genético pode não ser o principal indicador do nível de infecção por *B. bovis*. Embora seja impossível saber se a infestação pelo carrapato ou a resistência ao protozoário foi a principal causa das diferenças nos níveis de infecção, podemos ressaltar com base nos resultados encontrados, que a variação da parasitemia por *B. bovis* não foi dependente das infestações de

carrapatos, uma vez que não foi observada associação entre a quantidade de DNA de *B. bovis* e as duas contagens de carrapatos não foram associadas.

A repetibilidade encontrada para as duas colheitas quanto ao NC do DNA de *B. bovis* entre os diferentes grupos genéticos foi baixa (0,04). Estes resultados demonstraram que a flutuação no nível de *B. bovis* varia muito entre colheitas do mesmo indivíduo, ou seja, a observação medida do nível de infecção em uma observação não pode ser utilizada para predizer uma próxima medida no mesmo animal.

Também não foram verificadas associações entre os resultados da qPCR com as contagens de carrapatos e os resultados dos valores de A/P. Não há na literatura trabalhos sobre estudos de repetibilidade e associação entre as medidas analisadas.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados da presente investigação, pode-se concluir:

1. Com base nos resultados de qPCR (NC), a soroprevalência e a infestação pelo carrapato, pôde-se inferir que todas as regiões estudadas apresentam estabilidade endêmica para as babesioses;
2. O nível de anticorpos contra *B. bovis* detectada pelo Elisa teste nos rebanhos taurinos estudados foi maior, quando comparado com os animais cruzados;
3. A parasitemia por *B. bovis*, estimada pelo número de cópias (NC) do DNA de *B. bovis*, varia entre os diferentes grupos-locais, independentemente do grupo genético;
4. A prevalência de anticorpos contra *B. bovis* observadas nos rebanhos estudados mantém um comportamento mais estável no tempo, enquanto que no NC do DNA do parasita observou-se maior variação;
5. O NC do DNA de *B. bovis* quantificado pela qPCR nos animais, não está diretamente associado ao nível de anticorpos detectado pelo Elisa-teste, e ambas são independentes da infestação pelo carrapato.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, D.H.; BERMÚDEZ, A.C.; MAGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Infección natural com *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos de raza Hereford, Criolla y Nelore em Tucumán, Argentina. **Rev. Med. Vet.**, 71, p.54-60, 1990.

ALAM, M.S.; MOHON, A.N.; MUSTAFA, S.;KHAN, W.A.;ISLAM, N.; KARIM, M.J.;KHANUM, H.; SULLIVAN, D.J.; HAQUE, R. Real-time PCR assay and rapid diagnostic tests for the diagnosis of clinically suspected malaria patients in Bangladesh. . **Malar.J.** v. 10: 175, 2011.

ALLRED, D. R. Immune evasion by *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: cliff-dwellers of the parasite world. **Parasitol. Today,** 11, p.100–105, 1995.

ALONSO, M.; ARRELANO-SOTA, C.; CERESER, V,H. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean, **Vet. Sei. Tech. Off. Int. Epiz**., v.11.p.713-733. 1992.

ANDRADE, A.B.F. et al. **Genetic and environmental aspects of the resistence of Zebu cattle to the tick *Boophilus microplus***. In WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 6., 1998, Armidale: NSW, Austrália. ***Proceedings***…Armidale, 1998. v.27, p.339-342.

ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; LEAL, C.R.; SCHENK, M.A.; KESSLER, R.H.; MARQUES, A.P.; LEMAIRE, D.C. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid conglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. **Vet Parasitol.** 74(2-4), p101-108, 1998.

BENAVIDES, M. V.; SACCO, A. M. S. Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. **Vet. Parasitol.**v.150, p.54-64, 2007.

BESHIR, K.B.; HALLETT, R.L.; EZIEFULA, A.C.; BAILEY, R.; WATSON, J.; WRIGHT, S.G.; CHIODINI, P.L.; POLLEY, S.D.; SUTHERLAND, C.J. Measuring the efficacy of anti-malarial drugs in vivo: quantitative PCR measurement of parasite clearance. **Malar. J.**, v. 9:312, 2010.

BILHASSI ET AL, T.B.; OLIVEIRA, H.N.; IBELLI, A.M.G.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; BRESSANI, F.A.; MALAGÓ JR , W.; RESENDE, F.D.; OLIVEIRA, M.C.S. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil.**Ticks Tick borne dis.**, 2013, no prelo.

BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; DE VOS, A. J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J**., v.77, n.7, p.461-464, 1999.

BOCK, R.E.; de VOS, A. J.; KINGSTON, T.G.; McLELLAN, D. J. Effect of breed of catle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasmamarginale*, **Aust. Vet. J.,** v.75, n.5, p.337-40, 1997.

BÖSE, R.; JACOBSON R.H.; GALE, K.R.; WALTISBUHL, D.J.; WRIGHT, I.G. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis*antigen. **Parasitol. Res**., 76, p. 648-652, 1990.

BROWN, W.C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P.; GOFF, W. L. Immune control of *Babesia bovis* infection, **Vet. Parasitol**., v. 138, v.75-87, 2006.

BRUM, J.G.; RIBEIRO, P.B.; COSTA, P.R.P. Flutuação sazonal de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987) no município de Pelotas. **Arq. B. Med. Vet.Zooctec**., v.39, n.6, p.891-896, 1987.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ACENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBA-CARRETERO, J.C.; FLORIN-CRISTENSEN, M.A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *B. bovis* and *B. bigemina*. **Vet. Parasitol**., v.147, p.16-25, 2007.

CALDAS, S.; CALDAS, I.S.; DINIZ, L. F.; LIMA, W.G.; OLIVEIRA, R.P.; CECÍLIO, A.B.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BAHIA, M.T. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta Trop.**, 123 (3):170-177, 2012.

CALLOW, L.L.; TAMMEMAGI, L. Vaccination against bovine babesiosis. Infectivity and virulence of blood from animals either recovered from or reacting to *Babesiaargentina*. **Aus. Vet. J**., v.43, p.249-256, 1967.

CALLOW, L. L. Protozoan and rickettsial diseases, In: Australian Bureau of Animal Health (ed.), **Animal Health in Australia**, v.5, Aust. Gov. Publishing Serv., Canberra, p.121-216,1984.

CHEN, D.; COPEMAN, D.B.; BURNELL, J.; HUTCHINSON, G.W. Helper T cell and antibody responses to infection of CBA mice with *Babesia microti*. **Parasite Immunol**., 22, p.81–88, 2000.

DALGLIESH, R. J. & STEWART, N. P. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasmamarginale* from cattle with mixed infections. **Vet. Parasitol.**, 13, p.317–323, 1993.

DE CASTRO, J.J.; YOUNG, A.S.; DRANSFIELD, R.D.; CUNNINGHAM, M.P.; DOLAN, T.T. Effects of tick infestation on Boran (*Bos indicus*) cattle immunized against theileriosis in an endemic area of Kenya. **Res. Vet. Sci.** 9, p.279–288, 1985.

De ECHAIDE, S. T.; ECHAIDE, I. E.; GAIDO, A. B.; MANGOLD, A. J.; LUGARESI, C. I.; VANZINI, V. R.; GUGLIELMONE, A.A. Evaluation of an enzyme-linked

immunosorbent assay kit to detect *Babesia bovis* antibodies in cattle. **Prev. Vet. Med**., 24, p.277–283. (1995).

DE VOS, A. J.; DALGLIESH, R. J.; CALLOW, L. L. *Babesia*. In Immune Responses in Parasitic Infections : Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis, vol. III (ed. Soulsby, E. J. L.). Boca Raton, CRC Press Inc., 1987.

De WAAL, T.; COMBRINK, M. P. Live vaccines against bovine babesiosis.**Vet. Parasitol.,** Amsterdã.v.138, n. 1-2, p.88-96, 2006.

De WAAL, D.T. Vaccination against Babesiosis. **Acta Parasitol.Turcica**. v.20, p.487-516, 1996.

DEL GAUDIO, S.; CIRILLO, A.; DI BERNARDO, G.; GALDERISI, U.; CIPOLLARO, M. A preamplification approach to GMO detection in processed foods. **Anal Bioanal Chem**, 396, p.2135–2142, 2010.

ESTRADA-PEÑA, A., AND VENZAL, J.M. High-resolution predictive mapping for *Boophilus annulatus* and *B. microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico and Southern Texas. **Vet. Parasitol**., 142, 350–358, 2006.

FARIAS, N. A. R. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina**. Guaíba: Agropecuária,1995. 80p.

FARRUGIA, C.; CABARET; BOTTEREL, F.; BORIES, C.; FOULET, F.; COSTA, J. M; BRETAGNE, S. Cytochrome b Gene Quantitative PCR for Diagnosing *Plasmodium falciparum* Infection in Travelers. **J Clin Microbiol**., 49 (6): 2191–2195, 2011.

FERRERI, L.; BENITEZ, D.; DOMINGUEZ, M.; RODRIGUEZ, A.; ASENZO, G.; MESPLET, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SCHNITTGER, L. Water Buffalos as carriers of *Babesia bovis* in Argentina. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1149, P.149-151, 2008.

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON,G.S.; BUENING, G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*. *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Vet. Parasitol**., v.50, p.69-81, 1993.

FRAGA, A.B.; ALENCAR M.M.; FIGUEIREDO, L.A.; RAZOOK, A.G.; CYRILLO J.N.S.G. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapato (*Boophilus microplus*). **Rev Bras Zootec**, 32, p.1578-1586, 2003.

FURLONG, J. **Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil**. Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG, Belo Horizonte, n.8, p.49-61, 1993.

FURLONG, J.; EVANS, D. **Epidemiologia do carrapato *B. microplus* no Brasil: necessidade de uma abordagem compreensível para seu estudo realístico**. In: SEMINARIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, 7. 1991, São Paulo, Anais... São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1991, p.48-50.

GOFF, W.L.; MOLLOY, J.B.; JOHNSON, W.C.; SUAREZ, C.E.; PINO, I.; RHALEM, A.; SAHIBI, H.; CECI, L.; CARELLI, G.; ADAMS S.; McGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.; McELWAIN, T.F. Validation of a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies against *Babesia bovis*. **Clin. Vaccine Immunol**., 13(11), P.1212–1216, 2006.

GOFF, W.L.; MCELWAIN, T.F.; SUAREZ, C.E.; JOHNSON, W.C.; BROWN, W.C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**., v.10, p.38-43, 2003.

GONÇALVES, P.M.; PASSOS, L.M.F.; MACHADO, R.Z.; LIMA, J.D.; RIBEIRO, M.F.D. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of IgM Antibodies to *Babesia bigemina* in Cattle. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 96 (2):p.237-240, 2001.

GONÇALVES, P.M.; PASSOS L.M.F.; RIBEIRO M.F.B. Detection of IgM antibodies against *Babesia bovis* in cattle.**Vet. Parasitol**., 82: 11-17, 1999.

GUARAGNA, G. P.; CARVALHO, J. B. P.; FIGUEIREDO, A. L.; GAMBINI, L. B.; BARBOSA, M. I. A. Efeito de fatores genéticos e ambientais na infestação natural de carrapatos (*Boophilus microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. **Boletim de Industria Animal**, Nova Odessa, v.45, p.19-32, 1988.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Vet. Parasitol.**, v.57, p.109-19, 1995.

HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; CHASE JR. C.C.; BOWERS, E.J.; RANDEL R.D.; MURPHY, C.N.; VOGT, D.W.; TEWOLDE, A. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **J. Anim. Sci.** 74, p.295-303, 1996.
HERMANS, P.; DWINGER, R.H.; BUENING, G.M.; HERRERO, M.V. Seasonal incidence and hemoparasite infection rates of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. **Rev. Biol. Trop**., v.42., p.623-32, 1994.

HERNÁNDEZ - ARTEAGA, S.; LÓPEZ - REVILLA, R. Ultrasensitive quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by nested real time PCR. **Infectious Agents and Cancer,** 5:9, 2010.

HODGSON, J.L., STILLER, D., DOUGLAS, P.J., BUENING, G.M., WAGNER, G.G., McGUIRE, C. *Babesia bigemina*: Quantification of infection in nymphal and adult *Boophilus microplus* using DNA probe. **Ex. Parasitol**., v.74, p.117-26, 1992.

HÜE, T.; GRAILLE, M.; MORTELECQUE, A.; DESOUTTER, D.; DELATHIÈRE, J.M.; MARCHAL, C.; TEURLAI, M.; BARRÉ, N. Diagnostic methods used to monitor an outbreak of babesiosis (*Babesia bovis*) in a herd of feral cattle in New Caledonia. **Aust Vet J.** 91(6):254-8, 2013.

IBELLI, A.M.G.; RIBEIRO, A.R.B.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L.C.A.; ALENCAR, M.M.; CHAGAS, A.C.S.; PAÇO, A.L.; OLIVEIRA, H.N.; DUARTE, J.M.S.; OLIVEIRA, M.C.S. Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. **Vet. Parasitol.** 186, p.425– 430, 2012.

IBRAHIM, H.M.; MOUMOUNI, P.F.D.; MOHAMMED-GEBA, K.; SHEIR, K.S.; HASHEN, I.S.Y.; CAO, S.; TERKAWI, M.A.; KAMYINGKIRD, K.; NISHIKAWA, Y.; SUZUKI, H. Molecular and sorological prevalence of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle and water buffalos under small-scale dairy farming in Beheira Faiyum Provinces, Egypt. **Vet. Parasitol.** 198, p.187-192, 2013.

ISEKI, H.; ZHOU, Z.; KIM, C.; INPANKAEW, T.; SUNUNTA, C.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X. ; JITTAPALAPONGB, S.; IGARASHIA, I. Seroprevalence of *Babesia* infections of dairy cows in northern Thailand. **Vet Parasitol.**, v.170, p.193–196, 2010.

JAFFER, O.; ABDISHAKUR, F.; HAKIMUDDIN, F.; RIYA, A.; WERNERY, U.; SCHUSTER, R.K.A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis. **Parasitol Res.**v.106(3), p.709-713, 2010.

JONSSON, N.N.; BOCK, R.E.; JORGENSESN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesioses on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Vet. Parasitol**., v. 155.p. 1-9, 2008.

JONSSON, N.N.; MILLER, R.J.; ROBERTSON, J. L. Critical evaluation of the modified adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. **Vet. Parasitol.,** v.146, p.307-315, 2007.

JONSSON, N. N.; HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol**., v.146.p.193-198, 2007.

JONSSON, N.N.; MATSCHOSS, A.L.; PEPPER, P.; GREEN, P.E.; ANSELL, J. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by cattle tick (*Boophilus microplus*). **Vet. Parasitol**.,v.17, n.89, p. 297-305, 2000.

JOHNSTON, L.A.Y., LEACH, G., JONES, P.N. The duration of latent infection and functional immunity in Droughtmaster and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. **Aust. Vet. J.**, v.54, p.14-18, 1978.

KASHINO, S.S.; RESENDE, J.; SACCO, A.M.S.; ROCHA, C.; PROENC¸ A, L.; CARVALHO, W.A.; FIRMINO, A.A.; QUEIROZ, R.; BENAVIDES, M.; GERSHWIN, L.J.; SANTOS, I.K.F.M. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Exp. Parasitol.** 110, p.12–21, 2005.

KE, G. M; CHENG, H. L.; KE, L. Y.; JI, W. T.; CHULU, J. L.C.; LIAO, M. H.; CHANG, T. J.; LIU, H. J. Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. **J. Virol. Methods**, 133, p.6–13, 2006.

KEMP, D.H.; BOURNE, A. *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle tick larvae: studies in vivo and in vitro. **Parasitology** 80, p. 487–496, 1980.

KREIER, J. P. *Babesia* of Domestic Animals. **Parasitic Protozoa**.vol.4, New York.Academic Press.p.1-52. 1977.

KUTTLER, K. L. **Babesiosis**. Foreign animal diseases “The gray Book”, 1998.

KUTTLER, K. L. **Chemotherapy of babesiosis: a review**. In: Ristic. M.; Kreier. J. (Eds.). Babesiosis. Academic Press, New York, 1981.

LAMIKANRA, A.A.; DOBAÑO, C.; JIMÉNEZ, A.; NHABOMBA, A.; TSANG, H.P.; GUINOVART, C.; MANACA, M.N.; QUINTO, L.; AGUILAR, R.; CISTERÓ, P.; ALONSO, P.L.; ROBERTS, D.J.; MAYOR, A.A direct comparison of real time PCR on plasma and blood to detect *Plasmodium falciparum* infection in children.**Malar. J.**v.15; 11:201, 2012.

LAU, L.T.; FUNG, Y.W.; WONG, F.P.; LIN, S.S.; WANG, C.R.; LI, H.L.; DILLON, N.; COLLINS, R.A.; TAM, J.S.; CHAN, P.K.S.; WANG, C.G.; YUA, A.C. A real-time PCR for SARS-coronavirus incorporating target gene pre-amplification. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 312, p.1290–1296, 2003.

LEMOS. A. A. **Principais enfermidades de bovinos de Corte do Mato Groso do Sul**. Reconhecimento e diagnóstico. Campo Grande. M.S: [s.n.]. 1998, p. 358-365.

LEMOS, A. M.; TEODORO, R.L.; OLIVEIRA, G.P.; MADALENA, F. E. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzera grades in Brazil. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions.**Anim. Prod**.,41.187-191, 1985.

MACHADO, R.Z.; TOLEDO, C.Z.; TEIXEIRA, M.C.; ANDRÉ, M.R.; FRESCHI, C.R.; SAMPAIO, P.H. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus*) in Brazil. **Vet Parasitol.** v.186 (3-4), p.461-465, 2012.

MACKINNON, M.J.; MEYER, K.; HETZEL, D.J.S. Genetic variation and covariation for growth, parasite resistance and heat tolerance in tropical cattle. **Livestock Production Science**, v.27, p.105-122, 1991.

MACHADO R.Z.; MCELWAIN T.F.; PANCRÁSIO, H.P.; FRESHI C.R.; PALMER G.H. *Babesia bigemina*: immunization with purified rhoptries induces protection against acute parasitemia. **Exp. Parasitol**. 93, p.105-108, 1999.

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. **Vet. Parasitol**., v.71.p. 17-26, 1997.

MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P. C.; LEAL, C. R. B.; CARVALHO, C. M. E.; ARAÚJO, F. R.; KESSLER, R. H. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 109-112, 2000.

MAHONEY, D.F.; ROSS, D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Aust. Vet. J.,** v.48, p.292-8, 1972.

MAO, F.; LEUNG, W.; XIN, X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. **BMC Biotechnology**, 7:76, 2007.

MATTIOLI, R. C.; BAH, M.; FAYE, J.; KORA, S.; CASSAMA, M. A comparison of field tick infestation on N'dama, Zebu and N'dama-Zebu crossed cattle. **Vet. Parasitol.** 47, 139–148, 1993.

MOLLOY, J. B.;, BOWLES, P. M.; BOCK, R. E.; TURTON, J. A.; KATSANDE, T. C.; KATENDE, J. M.; MABIKACHECHE, L. G.; WALDRON, S. J.; BLIGHT, G. W.; DALGLIESH R. J. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle in Australia and Zimbabwe. **Prev. Vet. Med.**, v**.** 33, p.59–67, 1998.

MOREIRA, O.C.; RAMÍREZ, J.D.; VELÁZQUEZ, E.; MELO, M.F.; LIMA-FERREIRA, C. GUHL, F.; SOSA-ESTANI, S.; MARIN-NETO, J.A.; MORILLO, C.A.; BRITTO, C. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. **Acta Trop.** 125 (1), p.23-31, 2013.

MOUSA, A.A.; CAO, S.; ABOGE, G.O.; TERKAWI, M.A.; KIRDASY, A.E.; SALAMA, A.; ATTIA, M.; ABOULAILA, M.; ZHOU, M.; KAMYINGKIRD, K.; MOUMOUNI, P.F.; MASATANI, T.; AZIZ, S.A.; MOUSSA, W.M.; CHAHAN, B.; FUKUMOTO, S.; NISHIKAWA, Y.; BALLAL, S.S.; XUAN, X. Molecular characterization and antigenic properties of a novel *Babesia gibsoni* glutamic acid-rich protein (BgGARP). **Exp. Parasitol**., 135, p.414-420, 2013.

MUHAMAD, P.; CHAIJAROENKUL, W.; CONGPUONG, K.; NA-BANGCHANG, K. SYBR Green I and TaqMan quantitative real-time polymerase chain reaction methods for the determination of amplification of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-1 gene (PFMDR1). **J. Parasitol**. v.97 (5): 939-942, 2011.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Vet. Parasitol**., v.57, p.153-165, 1995.

NOUTSIAS, M.; ROHDE, M.; BLOCK, A.; KLIPPERT, K.; LETTAU, O.; BLUNERT, K.; HUMMEL, M.; KÜHL, U.; LEHMKUHL, H.; HETZER, R.; RAUCH, U.; POLLER, W.; PAUSCHINGER, M.; SCHULTHEISS, H.P.; VOLK, H.D.; KOTSCH, K. Preamplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. **BMC Mol. Bio.**, 9:3, p.1-20, 2008.

O'DONOGHUE, K.T.; FRIEDHOFF, O.G.; VIZCAINO, O.G.; WEYRETER, H. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using semidefined antigens in enzyme immunoassays.**Vet. Parasitol,** v.18, p.1-12, 1985.

OLIVEIRA, M.C.S.; ALENCAR, M.M.; GIGLIOTI, R.; BERALDO, M.C.D.; ANÍBAL, F.F.; CORREIA, R.O.; BOSCHINI, L.; CHAGAS, A.C.S.; BILHASSI ET AL, T.B.; OLIVEIRA. H.N. Resistance of beef cattle of two genetic groups to ectoparasites and gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, 197, p.168– 175, 2013.

OLIVEIRA, M.C.S.; ALENCAR, M.M.; CHAGAS, A.C.S.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H.N. Gastrointestinal nematode infection in beef cattle of different genetic groups in Brazil. **Vet. Parasitol.** 166, p.249–254, 2009.

OLIVEIRA, M.C.S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; REGITANO.L.C.A.; ALENCAR, M.M.; NÉO, T. A.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA, H.N. Detection of *Babesia bigemina*in cattle of diferente genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. **Vet. Parasitol**., v. 155, p. 281-286, 2008.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; ARAUJO JR, J. P.; AMARANTE, A. F. T.; OLIVEIRA, H. N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged female and eggs in São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol**., v. 130, p. 61-67, 2005.

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

OLIVEIRA. G. P.; ALENCAR. M. M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arq.Bras. Med. Vet. Zootec**.. 42. 127-135. 1990.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. FREITAS, A. R. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. II Natural infestation. **Pesq. Agropec. Bras**., 24. 1267-1271. 1989.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. I Infestação Artificial. **Pesq. Agropec. Bras**.. 22. (4). 433-438, 1987.

PATARROYO, J.H. Tristeza Parasitária. Seminário Nacional sobre Parasitoses dos Bovinos, I. **Anais** Campo Grande, p.299, 1979.

PFAFFL M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.**Nucleic Acids Research**, 29, E45, 2001.

PIPER, E.K.; JACKSON, L.A.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A.E.; JONSSON, N.N. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistent *Bos indicus*. **Int. J. Parasit.**, 40, p.431-441, 2010.

POLANCO, J.C.; RODRÍGUEZ, J.A.; CORREDOR, V.; PATARROYO, M.A. *Plasmodium vivax*: parasitemia determination by real-time quantitative PCR in *Aotus* monkeys. Exp. Parasitol., 100, p.131-134, 2002.

POUND, J.M.; GEORGE J.E.; KAMMLAH D.M.; LOHMEYER K.H.; DAVEY R.B. Evidence for role of white-tailed deer (Artiodactyla: Cervidae) in epizootiology of cattle ticks and southern cattle ticks (Acari: Ixodidae) in reinfestations along the Texas/Mexico border in south Texas: a review and update**. J. Econ. Entomol**., 103(2):211-218, 2010.

QUINTÃO E SILVA, M. G.; RIBEIRO, M. F. B. Infection rate of *Babesia* spp. Sporokinetes in engorged *Boophlus microplus* from an area of enzootic stability in the State of Minas Gerais. Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n.8, p. 999-1002, 2003.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D.; 2008. Diseases associated with protozoa.10th Edn. In: **Veterinary Medicine: A Textbook of Diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. Saunders Elsevier; pp: 1483-1540.

RAMOS, C.A.; ARAÚJO, F.R.; SOUZA, I.I.; BACANELLI, G.; LUIZ, H.L.; RUSSI, L.S.; OLIVEIRA, R.H.; SOARES, C.O.; ROSINHA, G.M.; ALVES, L.C. Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. **Vet. Parasitol.**v.176 (1), p. 79-83, 2011.

RIBEIRO, A.R.B.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S.; IBELLI, A.M.G. Heat tolerance of Nelore, Senepol x Nelore and Angus x Nelore heifers in the southeast region of Brazil. **S. Afr. J. Anim. Sci.** 39, p.263–265, 2009.

RIEK, R.F. The cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Aust. J. Agric. Res.**, v.17, p.247-54, 1966.

ROSALES, R.; RANGEL-RIVAS, A.; ESCALONA, A.; JORDAN, L.S.; GONZATTI, M.I.; ASO, P.M.; PERRONE, T.; SILVA-ITURRIZA, A.; MIJARES, A. Detection of *Theileriaequi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR. **Vet. Parasitol.** v.196(1-2), 2013.

ROSALES, R.; RANGEL-RIVAS, A.; ESCALONA, A.; JORDAN, L.S.; GONZATTI, M.I.; ASO, P.M.; PERRONE, T.; SILVA-ITURRIZA, A.; MIJARES, A. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR. **Vet. Parasitol.**, 196, p.37-43, 2013.

SAHINDURAN, S. Protozoan Diseases in Farm Ruminants. In: EditadoporCarlos C. Perez-Marin. **A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine**. Ed. Intech. Publicado em 22 de fevereiro de 2012, 626 páginas, p.473-500, 2012.

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

SANTOS JR., J.C.B.; FURLONG, J.; DAEMON, E. Controle do carrapato *Boophilusmicroplus* (Acari: Ixodidae) em sistemas de produção de leite da microrregião fisiográfica fluminense do grande rio. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.305-311, 2000.

SAUERESSIG, T.M. **Produção de proteína animal de qualidade com sustentabilidade: controle racional das parasitoses dos bovinos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 46p. (Documentos/Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111;157).

SHEBISH, E.; VEMULAPALLI, R.; OSETO, C. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. **Vet. Parasitol.**188 (1-2), p.164-167, 2012.

SHEBISH, E.; VEMULAPALLI, R.; OSETO, C. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. **Vet. Parasitol.** 188, p.164-167, 2012.

SHKAP, V.; PIPANO, E.; MCELWAIN, T.F.; HERZBERG, U.; KRIGEL, Y.; FISH, L.; PALMER, G. H. Cross protective immunity induced by *Babesia bovis* clones with antigenically unrelated variable merozoite surface antigens. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, 41, p.367–374, 1994.

SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **R. Bras. Zootec**., v.39, n.7, p.1477-1482, 2010.

SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO; L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S.; BARIONI-JR, W. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Gen. Mol. Biol**., v. 30, 1150-1155, 2007.

SILVA, J.B.; ANDRÉ, M.R.; FONSECA, A.H.; LOPES C.T.A.; LIMA D.H.S.; ANDRADE S.J.; OLIVEIRA, C.M.; BARBOSA, J.D. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the north region of Brazil. **Vet. Parasitol.,** 197, p.678-681, 2013.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **SAS/INSIGHT User's guide**.versão 9.1.3 - versãopara Windows. Cary: SAS Institute, 2002/2003. (CD-ROM).

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. 2007. **Vet. Parasitol.**, Third Edn. Blackwell Publishing.

TERKAWI, M.A.; ALHASAN, H.; HUYEN, N.X.; SABAGH, A.; AWIER, K.; CAO, S.; GOO, Y.K.; ABOGE, G.; YOKOYAMA, N.; NISHIKAWA, Y.; KALB-ALLOUZ, A.K.; TABBAA, D. IGARASHI, I.; XUAN, X. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from central region of Syria. **Vet. Parasitol.**v.187(1-2), p.307-311, 2012.

TERKAWI, M.A.; HUYEN, N.X.; SHINUO C.; INPANKAEW, T.; MAKLON, K.; ABOULAILA, M.; UENO, A.; GOO, Y.K.; YOKOYAMA, N.; JITTAPALAPONG, S.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. **Vet. Parasitol.**,v.178(3-4), p.201-207, 2011.

UILENBERG G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Vet. Parasitol.**, 57, p.19-41, 1995.

UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H.; KERR, J.D. Resistance to *Boophilusmicroplus* (Canestrini) in different breeds of cattle.**Aust. J. Agric. Res**., v. 29, p.885-895, 1978.

VANDESOMPELE, J; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N. ; DE PAEPE, A. ; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 2002.

VERÍSSIMO, C.J. **Resistência e suceptibilidade de bovinos leiteiros mestiços ao carrapato *Boophilus microplus***. 1991. 170p. (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciência Agrária e Veterinária – UNESP, Jaboticabal, 1991.

WAGNER, G.; CRUZ, D.; HOLMAN, P.; WAGHELA, S.; PERRONE, J.; SHOMPOLE, S.; RURANGIRWA, R. Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**., v.87. supl.III, p.193-199, 1992.

WAMBURA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S. RUGAIMUKAMU, E. A. Breed associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Vet. Parasitol.**, v.77, p.63-70, 1998.

WANG W.; CHEN, K.; XU, C. DNA quantification using EvaGreen and a real-time PCR instrument. **Analytical Biochemistry**, 356, p.303-305, 2006.

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

ZINTL, A.; GRAY, J.S.; SKERRETT, H.E.; MULCAHY. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovinebabesiosis. **Parasite Immunology.** v.4 p.115-120, 2005.