

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

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

**Natalia Serra Mendes
Bióloga**

2019

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

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

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

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

2019

M538o	Mendes, Natalia Serra Ocorrência e diversidade genética de Babesia bovis em bovinos de corte amostrados no Pantanal sul matogrossense. / Natalia Serra Mendes. -- Jaboticabal, 2019 80 p. : il., tabs., mapas Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Marcos Rogério André 1. Babesiose bovina. 2. Babesia bovis. 3. Diversidade genética. 4. Pantanal. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: NATALIA SERRA MENDES

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

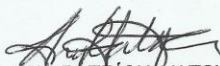
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



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



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



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

Jaboticabal, 01 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

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

EPÍGRAFE

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

Fragmento do livro "Grande sertão Veredas" – Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OBRIGADA!

Sumário

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

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



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.

Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

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

Resumo

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

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

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

Abstract

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

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

1. Introdução

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

No território brasileiro, o Pantanal está localizado nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, ocupando uma área de 140.000 km². A região do Pantanal é considerada um dos maiores sistemas de áreas alagáveis do globo terrestre, sendo reconhecido internacionalmente pela exuberância e riqueza de biodiversidade (Alvarenga, 1980, Junk et al., 2006). Algumas espécies de carrapatos presentes na região compartilham animais selvagens e domésticos como hospedeiros (Bechara et al., 2000; Ramos et al., 2016). A principal atividade econômica da região é a produção extensiva de gado de corte, com um rebanho estimado em quatro milhões de cabeças (Abreu et al., 2008).

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

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

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

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

2. Revisão de Literatura

2.1. Histórico e taxonomia

Em 1888, o pesquisador romeno Victor Babes e sua equipe investigavam uma enfermidade, caracterizada principalmente por anemia hemolítica, que acometia bovinos na Europa. Os pesquisadores relacionaram a doença à presença de microrganismos intraeritrocíticos nos animais infectados, e acreditando tratarem-se de bactérias, denominaram o agente etiológico de *Haematococcus bovis* (Uilenberg, 2006; Bock et al., 2004). Mais tarde, em 1893, Smith & Kilborne observaram, no sul dos EUA, os mesmos microrganismos intraeritrocíticos no sangue de bovinos sintomáticos para a enfermidade conhecida como “Febre do Texas”. Estes relacionaram os sinais clínicos à enfermidade recém-descoberta na Europa. No entanto, os autores concluíram que o agente causador da enfermidade não se tratava de uma bactéria, mas de um protozoário, o qual foi nomeado de *Pyrosoma bigeminum*, devido ao seu formato piriforme. Provaram ainda que o referido agente era transmitido por carrapatos da espécie *Boophilus annulatus*, presentes na América do Norte.

A descoberta do vetor se mostrou de suma importância para a epidemiologia da enfermidade e também para estudos relacionados à transmissão de agentes patogênicos, uma vez que se tratava do primeiro relato do envolvimento de um vetor artrópode na transmissão de uma protozoose (Bock, 2004; Uilenberg, 2006; Bowman, 2010). Ainda no ano de 1893, Starcovici, investigando as semelhanças dos microrganismos anteriormente descritos, propôs a inclusão de ambos parasitas em um único gênero, denominado *Babesia*, em homenagem ao primeiro pesquisador que descreveu a infecção, Victor Babes. Assim, *Haematococcus bovis* passou a ser denominado *Babesia bovis*, enquanto *Pyrosoma bigeminum* passou a ser denominado *Babesia bigemina*.

Após a publicação dos trabalhos mencionados, a babesiose foi relatada em diversos países. No Brasil, o primeiro diagnóstico da enfermidade foi realizado em 1901, por Francisco Fajardo, por meio de exames microscópicos de esfregaços sanguíneos de bovinos importados, em fase de aclimação, no Rio de Janeiro (Cavalcante, 2007; Bock et al., 2004; Fonseca e Braga, 1924). No entanto, a

erradicação do carrapato vetor no país nunca foi uma alternativa viável, tornando primordial o conhecimento da relação parasita-hospedeiro e da epidemiologia da enfermidade para que técnicas de controle fossem desenvolvidas e corretamente aplicadas. Além disso, a presença do carrapato vetor, em quantidade controlada, mantém a imunidade dos animais contra os agentes da babesiose bovina (Saueressig, 2006).

Sendo assim, o gênero *Babesia* como é conhecido hoje, é composto por protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Piroplasma, ordem Piroplasmida e família Babesiidae (Levine, 1971). São parasitas intraeritrocíticos que infectam ampla variedade de animais domésticos, bem como animais selvagens e, eventualmente, o ser humano (Bock et al., 2004; Cantu et al., 2007; Hunfeld et al., 2008). Quatro espécies do gênero são capazes de infectar bovinos: *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* e *B. major*, sendo as três primeiras espécies associadas a manifestações mais severas da enfermidade (Bock et al., 2004; Sivakumar et al., 2013).

2.2. Ciclo Biológico

Os protozoários do gênero *Babesia* apresentam organelas do Complexo Apical, as quais estão relacionadas à síntese de enzimas e demais proteínas promotoras da penetração do parasita nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado. A entrada das babesias no interior dos eritrócitos envolve fases distintas que incluem o contato entre as hemácias e os esporozoítos; orientação do complexo apical na direção das células-alvo; fusão entre as membranas do eritrócito e do protozoário e liberação do conteúdo das roptrias (Kakoma e Melhorn, 1994).

O ciclo heteroxeno de *B. bovis* envolve diversos estágios do parasita no mamífero hospedeiro e no artrópode vetor (**Figura 1**). A infecção por *B. bovis* no vetor pode ocorrer via hematofagia, devido à ingestão de sangue de um bovino infectado com merozoítos de *B. bovis*, ou verticalmente quando a transmissão transovariana acarreta na infecção da progênie das teleóginas infectadas (Hodgson, 1992; Radostits et al., 2008; Zaugg, 2009; Sahinduran, 2012).

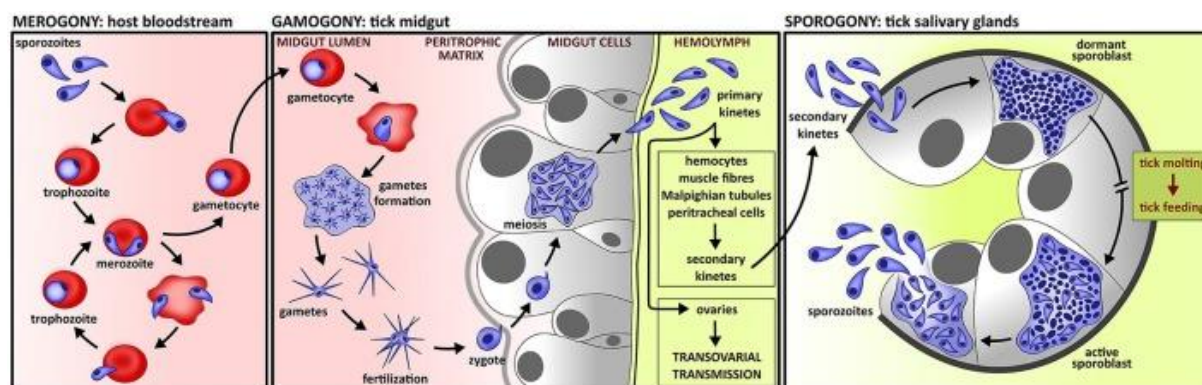


Figura 1. Ciclo de vida de *Babesia bovis* (Jalovecka et al., 2018).

As fêmeas de *Rhipicephalus microplus* se infectam com os merozoítos e gametócitos no momento do repasto sanguíneo. A fertilização, que ocorre no intestino do carrapato, é provocada pela fusão de dois gametas de tipos diferentes, mas morfologicamente indistinguíveis. Filamentos são formados entre as membranas dos gametas adjacentes originando o zigoto, forma móvel que dará origem aos cinetos primários que quando liberados nas células do intestino médio invadem variados tecidos, produzindo os cinetos secundários. Estes então invadem as glândulas salivares do carrapato onde formam redes celulares multinucleadas denominadas esporoblastos, que permanecem dormentes até que o carrapato esteja em contato com o hospedeiro, ativando assim a formação dos esporozoítos que serão inoculados via saliva (Bock et al., 2004; Uilenberg, 2006; Radostits et al., 2008; Jalovecka et al., 2018). Entre os tecidos colonizados pelos cinetos primários estão os órgãos reprodutivos das fêmeas, os cinetos são disseminados nas células ovarianas e infectam os ovos, embriões e os órgãos responsáveis pelo desenvolvimento da progênie da teleógina, dando origem, desta maneira, à transmissão transovariana das babesias.

Os esporozoítos presentes na glândula salivar das larvas do carrapato são transmitidos para os bovinos por meio da saliva, no momento do repasto sanguíneo. A invasão destes na célula hospedeira é um processo que requer inúmeras alterações no metabolismo do esporozoíto e no hospedeiro com envolvimento da saliva do carrapato (Shaw, 1995, 1996; Jalovecka et al., 2018). O primeiro contato entre o estágio invasivo de *B. bovis* e a célula hospedeira ocorre através de colisões aleatórias. A orientação da extremidade apical estabelece a junção entre o parasito e membrana celular hospedeira (Rudzinska et al., 1976; Montero et al., 2009; Asada

et al., 2012; Lobo et al., 2012). Tanto a orientação do parasita quanto a sua penetração na célula são processos mediados por proteínas secretadas a partir de organelas secretoras do Complexo Apical (Dubremetz et al. 1998, Soldati et al. 2004). Em poucos minutos ocorre a internalização completa do parasita, sem a formação de vacúolo parasitóforo. O parasita encontra-se livremente dentro do citoplasma da célula hospedeira (Simpson et al. 1963; Rudzinska et al., 1976; Potgieter e Els, 1977; Kawai et al., 1999; Guimarães et al., 2003; Montero et al., 2009; Lobo et al., 2012; Jalovecka et al., 2018).

Dentro da hemácia, os esporozoítos dão origem aos trofozoítos, que se alimentam do conteúdo celular para, em seguida, reproduzirem-se assexuadamente por divisão binária, originando os merozoítos. Estes rompem as hemácias parasitadas, possibilitando que outras células íntegras do hospedeiro vertebrado sejam parasitadas, dando continuidade ao ciclo biológico (Quintão-Silva et al., 2003; Bock et al., 2004; Uilenberg, 2006).

Enquanto *B. bovis* é transmitida ao bovino pelas larvas de *R. microplus*, não persistindo no carrapato como um agente infeccioso além do estágio larval, *B. bigemina* é transmitida pelos estágios de ninfa e adulto de *R. microplus* (Radostits et al., 2008; Morando et al., 2010).

2.3. Importância da babesiose bovina

A babesiose bovina é uma enfermidade de distribuição mundial limitada às áreas com presença do vetor, sendo assim estritamente relacionada às regiões com condições favoráveis ao desenvolvimento do carrapato *R. microplus* (Cantú-Martínez et al., 2008) e responsabilizada por grandes perdas econômicas em vários países da África, Ásia, Austrália e Américas (Böse et al., 1995; Juliano et al., 2007). As condições climáticas tropicais e subtropicais favorecem o desenvolvimento dos carrapatos, conferindo à babesiose bovina caráter endêmico em tais áreas (Juliano et al., 2007).

Existem três situações epidemiológicas distintas para a babesiose bovina estabelecidas conforme a presença do carrapato vetor ao longo do ano (Mahoney e Ross, 1972; Kessler et al., 1983; Folly et al., 2009). Nas áreas onde o carrapato está presente ao longo de todo o ano, a babesiose assume características de

estabilidade enzoótica, já que a primeira infecção dos animais ocorre nos bezerros ainda muito jovens e protegidos pela imunidade passiva conferida via colostro. No decorrer do tempo, estes são constantemente infestados e infectados pelo carrapato vetor e piroplasmídeos, respectivamente, reforçando a imunidade (Kessler et al., 1983; Madruga et al., 1984). Nestas áreas, estima-se que a parasitemia ocorra em níveis baixos, com sinais clínicos moderados. Mahoney (1974) estimou que se 75% dos bezerros até 9 meses de idade de uma determinada localidade mostrarem-se soropositivos para *B. bovis*, a enfermidade clínica terá baixa incidência na região, a qual passa a ser caracterizada como uma área de estabilidade enzoótica para *B. bovis* e *B. bigemina*. O Brasil, de maneira geral, é considerado território de estabilidade enzoótica; no entanto, alguns estudos mostraram que a região Sul e algumas áreas da região Nordeste são consideradas regiões de instabilidade (Madruga et al., 1984; Patarroyo et al., 1982; Martins et al., 1994; Antoniassi et al., 2009). Tal situação ocorre devido ao fato de que nas regiões onde o carrapato vetor não está presente nos meses frios do ano, pode não ocorrer infecção nos animais ainda jovens. Desta forma, os animais adultos podem não reforçar sua imunidade a partir de reinfecções constantes ao longo da vida. Nestas regiões, a exposição dos animais à *B. bovis* pode provocar consideráveis surtos (De Waal, 1996). Situações epidemiológicas graves também ocorrem quando animais de áreas livres do *R. microplus* são introduzidos em áreas endêmicas (Taylor et al., 2010).

Embora no Brasil a babesiose bovina seja considerada uma enfermidade endêmica, a ocorrência de surtos, especialmente em áreas de instabilidade enzoótica, gera perdas econômicas anuais que atingem cerca de 3,5 milhões de dólares na produção bovina (Grisi, 2014). Além da queda de produção, os gastos com tratamentos dos animais clinicamente afetados e com o controle do vetor aumentam os prejuízos causados por esta enfermidade. Ademais, a babesiose bovina pode ser considerada um dos fatores limitantes para o aumento da produtividade da bovinocultura nas áreas tropicais e subtropicais (Rodrigues et al., 2005; Taylor et al., 2010).

2.4. Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* em bovinos no Brasil

Compreender e conhecer a prevalência de *B. bovis* no Brasil é de grande importância para determinar o estado epidemiológico das variadas regiões, a fim de averiguar a ocorrência de situações de estabilidade ou instabilidade enzoótica. Esta informação pode servir de suporte ao emprego de medidas profiláticas para minimizar os efeitos da enfermidade (Madruga et al., 2000). Os métodos sorológicos mais utilizados para detecção de anticorpos anti- *B. bovis* são o ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), os quais são testes sensíveis e específicos, considerados adequados para estudos soroepidemiológicos da babesiose bovina (Santos et al., 2001; Osaki et al., 2002; Juliano et al., 2007). Nos últimos anos, os estudos soroepidemiológicos no Brasil mostraram uma soroprevalência de *B. bovis* variando entre 24,87% e 100%, enquanto os estudos de prevalência molecular mostraram uma variação de 3,6 a 100% de ocorrência de *B. bovis* (**Quadros 1 e 2**).

Vidotto et al. (1997) caracterizaram a região de Londrina como sendo de instabilidade enzoótica para a babesiose bovina em estudo avaliando amostras de 417 bovinos de leite. A partir do teste de Imunofluorescência indireta, os resultados mostraram que 60,19% (251/417) das vacas apresentavam anticorpos anti- *B. bovis*.

Soares et al. (2000), analisando amostras de sangue de 532 bovinos de leite provenientes de nove municípios da área Norte Fluminense no estado do Rio de Janeiro, encontraram soroprevalência de 90,98% (484/532) pelo iELISA. Ainda no estado do RJ, Folly et al. (2009) investigaram a presença de anticorpos anti- *B. bovis* em soros de bovinos de diferentes faixas etárias em propriedades localizadas na região de Campos do Goytacazes, que tem a pecuária como uma das principais fontes de renda. No referido estudo, 90,2% (275/305) e 88,2% (269/305) dos animais mostraram-se soropositivos nos testes RIFI e ELISA, respectivamente, com grau de concordância dos testes de 98%.

Na microrregião de Goiânia, no estado de Goiás, Santos et al. (2001) encontraram soroprevalência de 100% (180/180) por meio da RIFI, e 98,9%

(178/180) por meio do iELISA, em bovinos com idade acima de um ano amostrados em diversas propriedades da região.

Barros et al. (2005), ao realizarem um estudo na região semiárida do estado da Bahia, encontraram duas áreas de estabilidade e duas de instabilidade enzoótica. A investigação foi realizada em uma população de 848 bovinos com idade superior a 12 meses. A soroprevalência, obtida a partir do teste iELISA com utilização de antígeno total, mostrou 86% (729/848) e 95,5% (809/848) de soropositividade para *B. bovis* nos municípios de Senhor do Bonfim e Euclides da Cunha, respectivamente, caracterizando-os como microrregiões de estabilidade enzoótica. Por outro lado, uma soroprevalência de 63,7% (540/848) e 56,4% (478/848) foi encontrada em bovinos amostrados nos municípios de Uauá e Juazeiro, respectivamente, caracterizando-os como locais de instabilidade enzoótica.

Quadro 1. Prevalência sorológica de *Babesia bovis* em bovinos e bubalinos no Brasil.

Município (estado)	Soroprevalência	Animais	Método diagnóstico	Referência
Londrina (PR)	60,19% (251/417)	Bovinos de leite	RIFI	Vidotto et al., 1997
Municípios Norte Fluminense (RJ)	90,98% (484/532)	Bovinos de leite	iELISA antígeno total	Soares et al. 2000
Goiânia (GO)	100% (180/180)	Bovinos	RIFI	Santos et al., 2001
	98,9% (178/180)	adultos	iELISA antígeno total	
Senhor do Bonfim	86% (729/848)			Barros et al., 2005
Euclides da Cunha	95,5% (806/848)	Bovinos de corte	iELISA	
Uauá	63,7(540/848)	adultos	antígeno total	
Juazeiro				
(BA)	56,4% (478/848)			

Avaré	90,12% (220/245)			
Presidente Prudente	96,50% (305/317)	Holandês		
Avaré	92,98% (227/245)		iELISA	D'Andrea et al., 2006
Presidente Prudente		Nelore	antígeno total	
(SP)	78,08% (276/354)			
Paudalho (PE)	76,59% (127/168)	Bovinos adultos	RIFI	Berto et al., 2008
Campos do Goytacazes (RJ)	90,2% (275/ 305) 88,2% (269/305)		RIFI iELISA antígeno total	Folly et al., 2009
Araguaína (TO)	91,7% (464/506)	Bezerros de corte	iELISA antígeno total	Trindade et al., 2010
Lavras (MG)	94,1% (523/556)	Bovinos de leite	RIFI	Guimarães et al. 2010
Parnaíba (PI)	68,8% (139/202) 33,2% (67/202)	Bovinos de leite	RIFI cPCR	Souza et al., 2013
Paraíba	26,9% (137/509)		RIFI	Costa et al., 2013
Ilha de Marajó (PA)	24,87% (199/800)	Búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>)	iELISA antígeno total	Silva et al., 2013
São Luis (MA)	97,9% (275/281)	Bovinos de leite	ELISA	Costa et al., 2015
Sul (MG)	93,7% (375 /400)	Bovino de leite	RIFI	Barbieri et al., 2016
Petrolina (PE)	32,3% (151/458)	Bovinos adultos	RIFI	Santos et al., 2017
Ouricuri (PE)	54,9% (216/393)		RIFI	

Quadro 2. Prevalência molecular de *Babesia bovis* em bovinos no Brasil.

Município (estado)	Ocorrência molecular	Animais	Método diagnóstico	Gene	Referência
Parnaíba (PI)	33,2% (67/202)	Bovinos de leite	cPCR	18S rRNA	Souza et al., 2013
Ilha de Marajó (PA)	15% (18/199)	Búfalos	qPCR	<i>citB</i>	Silva et al., 2013
Rondônia	95,1% (272/286)	Bovinos de leite	cPCR	18S rRNA	Brito et al., 2013
Acre	96,1% (195/203)				
Colina					
São José do Rio Preto	100% (50/50)	Angus			
	96% (48/50)	Nelore	cPCR	<i>citB</i>	Bilhassi et al. 2014
São Carlos (SP)	98% (49/50)	AxN			
São Luis (MA)	32,38% (91/281)	Bovinos de leite	cPCR multiplex		Costa et al., 2015
Amazônia	3,6% (11/308)	Búfalos	cPCR	18S rRNA	Silveira et al., 2016

Outras regiões brasileiras se encaixam na definição de regiões estáveis enzooticamente para babesiose bovina. Neste sentido, Trindade et al. (2010) encontraram soroprevalência para *B. bovis* de 91,7% (464/506) em bezerros de corte com faixa etária entre 8 e 24 meses amostrados na cidade de Araguaína, no estado do Tocantins, por meio do iELISA. A soroprevalência para *B. bovis* foi maior entre bezerros com faixa etária de 19 a 24 meses.

Investigações sorológicas no estado de MG constataram prevalências de 94,1% (523/556) e 93,7% (374/400) nos municípios de Lavras e em 14 municípios localizados ao Sul de MG, respectivamente, pela RIFI (Guimarães et al., 2011; Barbieri et al., 2016). Ainda na região Sudeste, D'Andrea et al. (2006) realizaram estudo sorológico com 1161 bovinos das raças Nelore e Holandês, em dois municípios do Sudoeste do estado de SP. A soroprevalência a partir do iELISA para a raça holandesa foi de 90,12% em Avaré e 96,50% em Presidente Prudente. Por

outro lado, na raça Nelore, a prevalência foi de 92,98% em Avaré em Presidente Prudente foi de 78,08%.

Souza et al. (2013), em um trabalho realizado com 202 bovinos de leite amostrados em 22 propriedades no município da Parnaíba, Piauí, encontraram 68,8% (139/202) de prevalência sorológica pela RIFI e 33,2% (67/202) de prevalência molecular a partir de PCR convencional dirigida a um fragmento do gene *citB*, caracterizando a região como sendo de instabilidade endêmica pelos dois testes.

Santos et al. (2017) avaliaram 861 bovinos do semiárido pernambucano, das cidades de Petrolina e Ouricuri. A soroprevalência para *B. bovis* aferida a partir do teste RIFI foi de 32,3% (151/458) e 54,9% (216/393) nas duas cidades, respectivamente. Os pesquisadores ainda investigaram a presença de DNA de *Babesia* sp. em 137 carrapatos *R. microplus* recolhidos dos animais, dos quais 5,8% (8/137) mostraram-se positivos para *B. bovis*. Tal estudo permitiu caracterizar a região semiárida estudada como sendo de instabilidade enzoótica. Por outro lado, ainda no estado do Pernambuco, no município de Paudalho, Berto et al. (2008), analisando o soro de 168 bovinos de leite por meio da RIFI, encontraram soroprevalência de 76,59% (127/168) caracterizando o município como área de estabilidade enzoótica.

Na Ilha de Marajó, no estado do Pará, Silva et al. (2013) encontraram prevalência sorológica (iELISA com antígeno total) e molecular (qPCR baseado no gene citocromo-b) de 24,87% (199/800) e 15% (18/199) em búfalos d'água (*Bubalus bubalis*).

Bilhassi et al. (2014) encontraram prevalência molecular de 100% (50/50) em bovinos da raça Angus, 96% (48/50) em bovinos da raça Nelore, e 98% (49/50) em bovinos provenientes de cruzamento entre as duas raças em fazendas experimentais no estado de São Paulo.

Silveira et al. (2016) realizaram estudo na Amazônia com amostras de sangue de 308 búfalos e constatarem uma prevalência molecular de 3,6% (11/308) baseada em cPCR baseada no gene 18S rRNA.

Brito et al. (2013) amostraram 489 bovinos de leite com idade variando entre 4 e 12 meses, na região sudeste da Amazônia a partir de PCR baseada no gene *citB*, e encontraram prevalência molecular de 95,1% (272/286) e 96,1% (195/203) em Rondônia e Acre, respectivamente. A frequência elevada de infecção por *B. bovis* nos animais com idades entre 4 e 12 meses indica uma situação de estabilidade enzoótica nas regiões estudadas.

2.5. Patogenia, sinais clínicos e achados de necropsia

Nos bovinos, as babesias se multiplicam no interior dos eritrócitos. Os animais apresentam sinais clínicos decorrentes de hemólise intra e extravascular, tais como anemia, icterícia, hemoglobinúria, hipertermia, prostração e perda de peso gradativa. No entanto, a gravidade da enfermidade está intimamente relacionada, entre outros fatores, com a virulência dos isolados geográficos, estado imune do animal infectado e estresse (Taylor et al., 2010). O período pré-patente de *B. bovis* é geralmente de 8 a 17 dias, enquanto o período de incubação pode variar de 7 a 15 dias (Callow, 1984; Bock et al., 2004). *Babesia bovis* apresenta-se mais patogênica quando comparada à *B. bigemina* por apresentar predileção por capilares de órgãos vitais como fígado, rins, pulmões, coração e cérebro, ocasionando sérios problemas relacionados à obstrução do fluxo sanguíneo para os órgãos supracitados. Ainda, o acometimento do sistema nervoso é característico de animais infectados por *B. bovis*, podendo leva-los à morte em poucos dias. Quadros de incoordenação motora, agressividade, excitação, tremores musculares e, eventualmente, coma, são sinais nervosos bastante comuns acarretados por este hemoparasita (Florin-Christensen et al., 2014; Kakoma e Melhorn, 1994). A doença aguda geralmente segue um curso de 3 a 7 dias, com febre acima de 40°C precedendo o aparecimento de outros sinais clínicos. Estes envolvem inapetência, depressão e fraqueza. Anemia e icterícia se desenvolvem especialmente nos casos mais prolongados, enquanto em situações ainda mais graves ocorrem tremores e decúbito seguidos de coma (De Vos e Potgieter, 1994). A febre durante a infecção pode fazer com que a fêmea gestante aborte e touros mostrem redução na fertilidade (Bock et al., 2004). Bezerros que se

tornam infectados antes de atingirem nove meses de idade desenvolvem apenas infecções subclínicas (Callow, 1984). Animais que se recuperam permanecem como portadores assintomáticos durante vários anos, com a duração da infecção sendo dependente da raça (Johnston et al., 1978; Bock et al., 2004).

Em um estudo de caso realizado a partir de um surto de babesiose bovina causada por *B. bovis* ocorrido no Rio Grande do Sul em abril de 2007, 28 novilhas da raça Devon morreram cinco dias após apresentarem sinais clínicos como febre, incoordenação, agressividade, anemia e petéquias nas mucosas. Em quatro animais necropsiados foram observadas hemorragias múltiplas, esplenomegalia, fígado aumentado e alaranjado, e vesícula biliar com parede edemaciada contendo bile grumosa. Os rins estavam vermelho-escuro e a bexiga continha urina cor de vinho tinto. O encéfalo apresentava cor róseo cereja externamente, e ao corte, mais marcado no córtex telencefálico, cerebelo e corpo estriado, contrastando com a cor branca da substância branca. Na histologia constatou-se nefrose hemoglobinúrica, necrose hepática paracentral, bilestase canalicular, congestão esplênica, além de congestão com grande quantidade de eritrócitos parasitados por estruturas compatíveis com *B. bovis* na região cortical do encéfalo, também observadas em decalques teciduais dessas regiões. A morte dos animais provavelmente resultou da falta de imunidade dos mesmos, já que na ocasião haviam sido transferidos de uma fazenda onde o manejo incluía controle parasitário para outra onde havia infestação por *R. microplus* e presença de *B. bovis* (Antoniassi et al., 2009).

A patogenia relacionada às infecções causadas por *B. bigemina* é quase inteiramente associada à hemólise intravascular. Para a maioria dos isolados de *B. bigemina*, os efeitos patogênicos relacionam-se diretamente com a destruição dos eritrócitos. A hemoglobinúria faz-se presente precocemente no curso da infecção e de forma mais consistente quando comparada à infecção por *B. bovis* e a febre é um sinal clínico de menor importância. Mesmo as infecções agudas em bovinos não costumam ser tão graves quanto aquelas causadas por *B. bovis*; além disso, não há acometimento cerebral e a recuperação nos casos não fatais é geralmente rápida e completa. Contudo, em alguns casos, a doença pode se desenvolver rapidamente, com anemia súbita e severa, icterícia e morte (Callow, Rogers e De Vos, 1993). Animais que se recuperam clinicamente da enfermidade causada por *B. bigemina*

permanecem como fontes de infecção para os carrapatos no período de 4 a 7 semanas e portadores do hemoparasita por apenas alguns meses (Mahoney, 1969; Johnston et al., 1978; Bock et al., 2004).

2.6. Diagnóstico

2.6.1. Direto por microscopia de luz

No que se refere aos métodos diagnósticos da babesiose bovina, o exame direto de esfregaços sanguíneos com colorações do tipo Romanowsky (Giemsa, Leishman, Wrigth e Panótico), é considerado conclusivo, apresenta baixo custo e não exige nenhum equipamento específico, sendo um dos principais métodos utilizados (Böse et al., 1995; Bock et al., 2004; Kocan et al., 2010). Entretanto, não mostra sensibilidade suficiente para detectar animais positivos quando o nível de parasitemia é muito baixo, como é o caso de infecções subclínicas, tornando-se um método pouco eficiente (O'Donoghue et al., 1985; Böse et al., 1995). No caso da *B. bovis*, que tem predileção por capilares viscerais, a sensibilidade mostra-se ainda mais baixa, haja vista a dificuldade em detectar o referido parasita em esfregaços de sangue periférico (Callow et al., 1993).

2.6.2. Técnicas sorológicas

Os testes sorológicos se mostram ferramentas comprovadamente eficazes de diagnóstico indireto para identificar portadores infectados ou animais previamente expostos. No entanto, apesar da eficácia e confiabilidade dos testes que detectam anticorpos, estes não indicam a situação atual da parasitemia, e tampouco é possível identificar se o título encontrado se refere a uma infecção atual ou prévia (Mosqueda et al., 2012).

A RIFI (Reação de Imunofluorescência indireta), desde que foi adaptada para espécies de *Babesia*, apresenta bom nível de especificidade e sensibilidade (Krause et al., 1994; Mosqueda et al., 2012). A técnica se baseia no reconhecimento de antígenos do parasita por anticorpos séricos do animal e compreende uma série de

lavagens e incubações, além da utilização de anticorpos secundários marcados com um fluorocromo, seguido de análise em microscópio equipado para fluorescência. Apesar da facilidade de execução e do custo relativamente baixo, a técnica requer um antígeno de boa qualidade e pessoal treinado para a leitura dos resultados (Böse et al., 1995).

Nas últimas décadas, o iELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto) tem se destacado e sido amplamente empregado quando se trata de diagnóstico sorológico de infecções por *Babesia* spp., especialmente após a biotecnologia moderna tornar possível o uso de antígenos recombinantes e anticorpos monoclonais que aumentaram a especificidade do teste (Machado et al., 1997; Soares et al., 2000; Madruga et al., 2000; Trindade et al., 2010; Mosqueda et al., 2012; Costa et al., 2015). A técnica de iELISA, além de possibilitar a avaliação de um grande número de amostras em curto intervalo de tempo, utiliza leitura mecânica e rápida e fornece um resultado quantitativo, tornando o diagnóstico menos subjetivo (Böse et al., 1990; Soares, 2000). No entanto, o referido teste não permite que se tracem inferências sobre o curso da infecção. Além disso, o iELISA e os métodos sorológicos geralmente apresentam a desvantagem de se basearem na presença de anticorpos específicos, os quais podem levar semanas para aparecerem em um animal infectado, além de permanecerem presentes meses após os sinais clínicos desaparecerem (Böse et al., 1990; Wagner et al., 1992; Mosqueda et al., 2012).

2.6.3. Técnicas moleculares

A detecção de DNA a partir de métodos moleculares tem se mostrado útil quando os métodos imunológicos apresentam limitações. Nesse contexto, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tem sido amplamente aplicada no diagnóstico de hemoparasitoses, uma vez que apresenta sensibilidade muito maior que os demais métodos, permitindo confirmar a presença de DNA e discriminar a espécie do parasita, mesmo quando este está presente em níveis muito baixos no sangue (Böse et al., 1995; Almeria et al., 2001; Costa et al., 2015). A primeira descrição de PCR para *B. bovis* foi realizada por Fahrimal et al. (1992). Daí em diante houve a

adaptação da técnica pela nPCR, a qual é baseada em duas amplificações sucessivas onde o segundo par de oligonucleotídeos iniciadores destina-se a amplificar um alvo secundário no interior do primeiro produto amplificado. Tanto esse método quanto a PCR simples mostram um grau elevado de sensibilidade e especificidade, com a diferença que a “nested” PCR requer um tempo maior para a realização e se mostra mais sensível, uma vez que é composta por duas reações (Mosqueda et al., 2012).

Os principais marcadores utilizados para a detecção molecular de *B. bovis* a partir de PCR convencional incluem os genes que codificam proteínas das roptrias de merozoítos (BV80 e BvVA1), o gene mitocondrial que codifica a proteína citocromo B, o gene da β - tubulina, a família de genes que codificam os antígenos variáveis de superfície de merozoítos (MSA-1 e MSA-2), proteínas associadas às roptrias RAP-1, subunidade 18S do rRNA e proteínas do corpo esférico SBP, que são liberadas durante o processo de invasão pelo merozoíto e tem interação com a face citoplasmática do eritrócito (Lew et al., 1997; Bock et al., 1999; Salem et al., 1999; Borgonio et al., 2008; Silva et al., 2009; Aboulaila et al., 2010).

A qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa) é considerada de alta especificidade e sensibilidade, permitindo além da realização do diagnóstico da babesiose bovina, estimar o nível parasitêmico do animal a partir da amplificação de uma sequência específica de DNA (Bilhassi et al., 2014). A técnica tem sido amplamente utilizada para estudos de prevalência molecular, estudos genéticos quantitativos e de diagnósticos (Bulling et al., 2007; Silva et al., 2013; Giglioti, 2013; Bilhassi et al., 2014).

O marcador molecular mais utilizado atualmente em trabalhos para a detecção de *B. bovis* a partir da qPCR é o gene mitocondrial que codifica a proteína citocromo B (Buling, et al. 2007; Giglioti et al., 2018).

Kim et al. (2007) desenvolveram um protocolo de qPCR baseado no gene 18S rRNA usando sistema de detecção TaqMan e compararam o ensaio ao protocolo desenvolvido por Fahrimal et al. (1992) que utilizava uma nPCR baseada na detecção do gene citocromo B. Os resultados encontrados mostraram limite de detecção idênticos (2,5 parasitas por μ L de sangue infectado) para os dois ensaios.

Ramos et al. (2011) desenvolveram um protocolo de qPCR baseado na detecção quantitativa do gene *msa-2c* de *B. bovis*, o qual amplifica um fragmento de

97pb do referido gene, utilizando sistema de detecção SYBR Green (intercalante de DNA). Ao se comparar o referido ensaio com o protocolo tradicionalmente utilizado e baseado no gene do citocromo B, os autores constataram 88,8% de concordância entre os resultados, com índice Kappa de 0,75. Já na comparação entre a qPCR baseada no gene *msa-2c* e um ensaio imunoenzimático (ELISA) com antígeno semi-purificado de *B. bovis*, a concordância foi de 96,3% e índice Kappa de 0,91. Comprando-se os três testes, encontrou-se uma concordância de 85,8%. Os autores concluíram que a utilização do gene *msa-2c* no ensaio de qPCR mostra-se útil na detecção molecular de *B. bovis*.

2.7. Tratamento, controle e resistência

As opções de tratamento da babesiose bovina são ainda limitadas. O desenvolvimento lento de novas terapias parece ser gerado, principalmente, pela falta de compreensão do complexo mecanismo pelo qual a imunidade à infecção ocorre (Gohil et al., 2013). Sabe-se que a raça do animal, a idade, a distribuição de carrapatos e o conceito de estabilidade enzoótica são importantes fatores a serem considerados quando se pensa no controle da babesiose bovina (Suarez E Noh, 2011; Mosqueda et al., 2012).

A gravidade da infecção nos bovinos pode ser determinada por características específicas de cada animal. A resposta imunológica, por sua vez, está estritamente relacionada à infecção ativa ou à transferência passiva de anticorpos. Neste sentido, bovinos jovens mostram-se mais resistentes que os adultos devido à presença de anticorpos colostrais (Madruga et al., 1986). Nas áreas endêmicas, os bezerros recebem anticorpos colostrais aproximadamente até os três meses. A proteção pode persistir por até seis meses de idade para *B. bovis* e de três a quatro meses para *B. bigemina* (Radostits et al., 2008).

Diversas tentativas de desenvolvimento de vacinas contra o vetor *R. microplus* vêm sendo realizadas, sendo que alguns antígenos já demonstraram a capacidade de redução do número, peso e capacidade reprodutiva dos carrapatos. Na década de 1990, duas vacinas recombinantes começaram a ser comercializadas, a TickGARD® na Austrália e a GAVAC® em Cuba, ambas baseadas na glicoproteína

do intestino médio do carrapato *R. microplus* (Bm86) (Willadsen et al., 1995, Canales et al., 1997). A eficácia de ambas as vacinas comercialmente disponíveis mostravam-se substancialmente variáveis. Nos dias atuais, apenas a Gavac® continua a ser produzida e comercializada (Guerrero et al., 2012).

A Austrália se mostra a frente na produção e desenvolvimento de vacinas atenuadas. O *Tick Fever Centre* (TFC), em Queensland, produz vacinas vivas atenuadas que oferecem proteção contra *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*. Três amostras de *B. bovis* têm sido usadas para produzir a vacina viva atenuada através da passagem em série em bezerros esplenectomizados: amostra K (1980-1990), amostra T (1991-1992) e a atual amostra Dixie, introduzida no campo em 1993 (Callow et al., 1979; Bock e De Vos, 2001).

Idealmente, a pesquisa de vacinas contra carrapatos deve estar em paralelo com o desenvolvimento de vacinas contra o hemoparasita na fase assexuada, de modo que em longo prazo, uma abordagem pragmática para controlar tanto o vetor quanto o piroplasmídeo possa ser adotada. O uso simultâneo de acaricidas contra os carrapatos, programas de vacinação unidos a uma ampla compreensão acerca da endemia e instabilidade, além do uso de raças mais resistentes aos carrapatos, acabará por facilitar o controle da babesiose (Bock et al., 2004).

O êxito no tratamento da babesiose bovina depende principalmente do diagnóstico precoce, seguido pela pronta administração de drogas quimioterápicas. Atualmente, os agentes antiprotozoários aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb são os únicos tratamentos disponíveis para a babesiose bovina (Mosqueda et al., 2012). O diminazeno atua rapidamente contra *B. bovis* e *B. bigemina* em uma dose de 3,5 mg/kg intramuscularmente. Seu mecanismo de ação não é muito bem compreendido, mas sabe-se que interfere na glicólise anaeróbica e síntese de DNA e RNA dos parasitos; adicionalmente, pode interferir com a atividade das isoenzimas e da Ca^{2+} -ATPase (Peregrine, 1993). Trata-se de agente quimioterápico bem tolerado pelos animais e que protege os bovinos contra *B. bovis* e *B. bigemina* durante o período de 2 e 4 semanas, respectivamente (de Vos, 1979). Imidocarb, por sua vez, é utilizado por via subcutânea na dose de 1,2 mg/kg para tratamento da babesiose bovina. O emprego do referido medicamento na dose de 3 mg/kg fornece proteção contra *B. bovis* por 4 semanas e contra *B. bigemina* por pelo menos 2 meses (Mchardy, 1979). Apesar disso, a preocupação com os resíduos de

drogas na carne e no leite após o tratamento prolongado levou à retirada de seu uso em muitos países europeus (Zintl et al., 2003; De Waal e Combrink, 2006; Mosqueda et al., 2012).

É evidente que o desenvolvimento de novos quimioterápicos, específicos contra espécies de *Babesia*, combinados com um perfil de baixa toxicidade contra o hospedeiro, é altamente desejável. Novos agentes quimioterápicos em desenvolvimento vêm sendo estudados (Mosqueda et al., 2012). Num estudo recente realizado por Silva et al. (2018), demonstrou-se que o fármaco tulatromicina Draxxin[®] interfere com a replicação parasitária de *B. bovis*, *B. bigemina* e *T. equi* em culturas *in vitro* com IC50 estimado de $16,7 \pm 0,6$ nM; $6,2 \pm 0,2$ nM e $2,4 \pm 0,1$ nM, respectivamente, até 72h. O estudo sugere futuros testes *in vivo* a fim de investigar a eficácia da droga no tratamento para as enfermidades causadas por estes agentes.

No que se refere à relação com o vetor, já se sabe há algum tempo que animais *Bos taurus* são mais susceptíveis aos carrapatos do que animais *Bos indicus*. Desta maneira, quanto maior a proporção de *Bos indicus* no cruzamento, maior será a resistência do rebanho ao vetor (Lemos et al., 1985; Oliveira e Alencar, 1987; Oliveira et al., 1989; Oliveira e Alencar, 1990; Silva et al., 2007). Embora não se saiba ao certo a influência da raça sobre as infecções causadas por espécies de *Babesia*, acredita-se que, seguindo o mesmo padrão da resistência ao carrapato, animais zebuínos sejam mais resistentes à infecção do que os taurinos (Bock et al., 1997; Bock et al., 1999).

Bock et al. (1997), a fim de avaliar a resistência inata de animais *Bos taurus*, *Bos indicus* e cruzamentos frente à *Babesia* spp., inocularam amostras virulentas de *B. bovis* e *B. bigemina* em animais sorologicamente negativos. Os resultados mostraram que, enquanto os animais *Bos indicus* puros mostraram-se significativamente mais resistentes à infecção por *B. bovis*, novilhos *B. taurus* puros mostraram-se significativamente mais susceptíveis do que aqueles nos outros três grupos, com 80% dos animais necessitando tratamento. Infecções por *B. bigemina* produziram uma resposta leve em comparação com *B. bovis* e nenhum dos novilhos necessitou de tratamento.

Bilhassi et al. (2014) investigaram a influência da raça em um estudo no qual se comparou a infecção por *B. bovis* em animais Nelore, Angus e o cruzamento das

duas raças criados em área endêmica para babesiose no estado de São Paulo. A prevalência da infecção não mostrou diferença significativa, sendo de 96%, 100% e 98% para os três grupos genéticos, respectivamente. No entanto, ao verificarem os níveis parasitêmicos estimados pela qPCR, constatou-se que estes eram maiores nos animais Angus e nos cruzamentos do que nos animais Nelore.

A babesiose quase sempre gera sinais clínicos mais brandos em *Bos indicus* quando comparados àqueles verificados em *Bos taurus* (Lohr, 1973; Callow, 1984; Bock et al., 1997; Bock, Kingston e De Vos, 1999). Sugere-se que este fenômeno possa deve-se à relação evolutiva entre *Bos indicus*, o carrapato *B. microplus* e *Babesia* spp. (Dalglish, 1993). Além disso, o gado zebuino é caracterizado pela rusticidade, maior resistência aos parasitas e uma maior capacidade de termorregulação, resultante de uma maior taxa de dissipação de calor (Hansen, 2004). O gado taurino, por sua vez, apresenta baixa resistência a altas temperaturas e uma elevada susceptibilidade aos parasitas, além de ter pele mais espessa e recoberta por pelos mais longos, dificultando a eliminação do calor e consequente diminuição da temperatura.

A resistência conferida ao gado indiano também pode ser explicada pelo simples fato destes animais terem convivido milhares de anos com o carrapato *R. microplus*. Sendo assim, esta subespécie passou por um longo processo de seleção, pelo qual os animais mais sensíveis foram eliminados naturalmente do ambiente, tendo persistido somente aqueles geneticamente resistentes (Lemos, 1985). Além deste fator, alguns pesquisadores já descreveram os mecanismos de resistência dos bovinos ao carrapato, classificando-os como inato e adaptativo. Enquanto o mecanismo inato já existe no animal antes da infestação, aquele de caráter adaptativo ocorre a partir do primeiro contato deste com o ectoparasita e se reforça após sucessivas infestações (Riek, 1962; Roberts, 1968).

2.8. Diversidade genética

Os merozoítos de *B. bovis* apresentam, em sua superfície, ao menos cinco glicoproteínas pertencentes à família de antígenos variáveis de superfície do merozoíto (VMSA), implicados na invasão do hemoparasita ao eritrócito. Os

membros da família VMSA consistem em antígenos de superfície de merozoíto, os quais são definidos por uma região de sequência hidrofóbica amino-terminal, uma região central hidrofílica, e uma região conservada carboxi-terminal contendo glicosil-fosfatidilinositol (Jasmer et al., 1992; Hines et al., 1992; Florin-Christensen et al., 2002). A família de antígenos variáveis de superfície de merozoítos de *B. bovis* inclui o gene *msa-1* e o locus *msa-2*. Enquanto o *msa-1* é um gene de cópia única no genoma, *msa-2* compreende quatro genes dispostos em tandem, definidos como *msa-2a1*, *msa-2a2*, *msa-2b* e *msa-2c* (Florin-Christensen et al., 2002). Estes antígenos são altamente imunogênicos e contêm epítomos sensíveis à neutralização, e por esta razão têm sido considerados como candidatos ao desenvolvimento de vacinas contra *B. bovis*. No entanto, os antígenos de superfície são geneticamente diversificados entre os diferentes isolados de *B. bovis* (Hines et al., 1992). Esse fato tem sido apontado como principal dificuldade no desenvolvimento de metodologias de controle imunitário contra a infecção por *B. bovis* (Tattiyapong et al., 2016).

Estudos prévios identificaram diferenças genéticas associadas a variações antigênicas entre os antígenos de superfície de merozoítos (**Figura 2**). Neste contexto, os genes *msa* podem representar marcadores moleculares para estudo da diversidade genética de *B. bovis* (Timms et al., 1990; Genis et al., 2009; Altangerel et al., 2012). Assim, torna-se essencial a análise genotípica global de *B. bovis* com base nos antígenos de superfície (MSA-1, MSA-2b e MSA-2c), a fim de formular estratégias específicas eficazes de prevenção, incluindo a seleção de amostras vacinais (Altangerel et al., 2012).

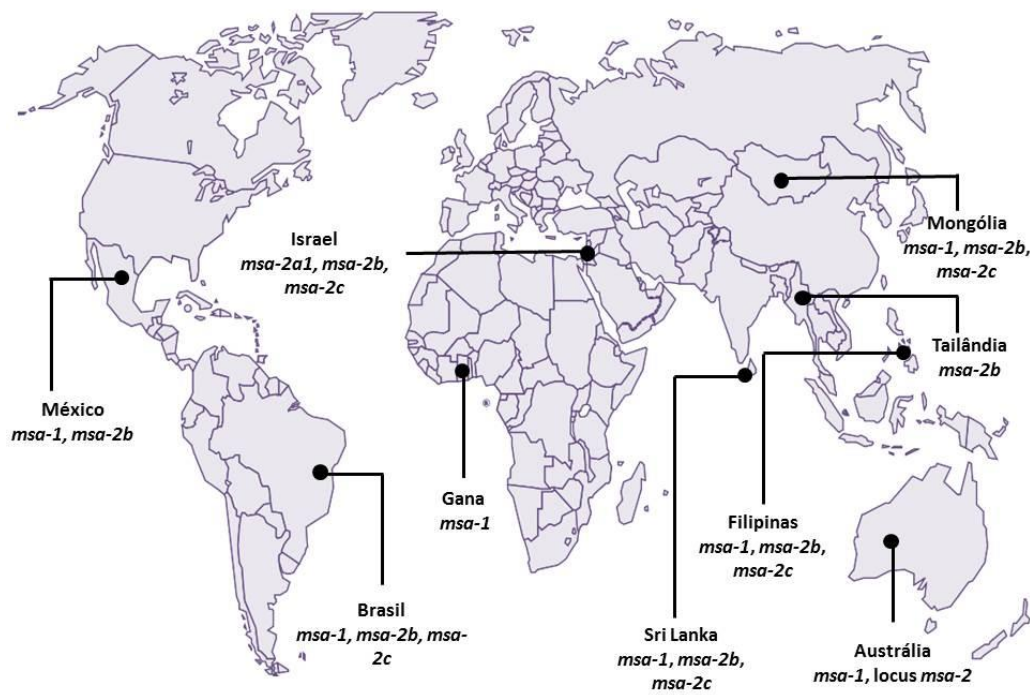


Figura 2. Estudos de diversidade genética baseados em genes que codificam antígenos de superfície de merozoítos de *Babesia bovis* ao redor do mundo. Autoria: Natalia Serra Mendes.

Berens et al. (2005) analisaram o *locus* completo de *msa-2* a partir de doze isolados australianos, incluindo dois isolados vacinais e oito candidatos a isolados vacinais, comparando-os com amostras americanas previamente caracterizadas. Os pesquisadores constataram diferenças tanto no número de genes dispostos no *locus msa-2* entre os isolados americanos e australianos quanto uma alta diversidade nas proteínas expressas por estes genes entre as diferentes regiões geográficas e também entre elas mesmas. Além disso, verificaram que a distribuição mais densa de polimorfismos ocorria em uma região hipervariável dentro do terço carboxi-terminal da molécula que é altamente rica em prolina. A variação no comprimento e conteúdo da região hipervariável é principalmente atribuída a diferenças na ordem e no número de repetições nucleotídicas degeneradas.

Em outro trabalho realizado na Austrália, Leroith et al. (2005) estudaram, a partir do gene *msa-1*, dois isolados vacinais australianos de *B. bovis* (amostras T e K) e 14 isolados oriundos de animais previamente imunizados com estas amostras

(oito animais com a amostra T e seis com a K). A partir da análise das sequências de aminoácidos deduzidas das amostras, verificou-se identidade variando de 19,8 a 46,7% entre a amostra T e os isolados de oito bovinos e 18,7 a 99% entre a amostra K e isolados de seis bovinos previamente imunizados. Os autores constataram ainda que, embora a variação da identidade das sequências de aminoácidos fosse bem elevada, as regiões de hidrofiliidade e hidrofobicidade se mostraram conservadas entre todas as sequências estudadas.

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

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

Altangerel et al. (2012) realizaram um estudo sobre a diversidade genética de *B. bovis* na Mongólia utilizando sequências amplificadas dos genes *msa-1*, *msa-2b*, e *msa-2c*. As sequências de cada um dos três genes foram homólogas entre os isolados da Mongólia, e posicionados em um único grupo filogenético. Em particular, um ramo separado da árvore filogenética do gene *msa-2b* foi formado somente pelos isolados da Mongólia.

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

Sivakumar et al. (2013) realizaram um estudo para determinar a diversidade genética de genes *msa* de *B. bovis* isolada de bovinos no Sri Lanka e compararam as sequências obtidas com as do isolado vacinal de *B. bovis* (amostra K). O estudo contou com a análise de 44 amostras de sangue de bovinos de diferentes regiões do Sri Lanka. As sequências nucleotídicas de *msa* (*msa-1*, *msa-2a1*, *msa-2a2*, *msa-2b* e *msa-2c*) se agruparam em diferentes clados do filograma e os valores mínimos de similaridade entre as sequências de aminoácidos deduzidas para estes genes foram 36,8%, 68,7%, 80,3%, 100%, e 68,3%, respectivamente. O referido estudo mostrou que a diversidade genética entre os genes *msa* de isolados de *B. bovis* do Sri Lanka é muito elevada, e que as sequências isoladas de campo divergiram geneticamente daquelas da vacina de *B. bovis* (amostra K).

Tattiyapong et al. (2014) investigaram a diversidade genética de *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* de *B. bovis* em 44 amostras de sangue de bovinos nas Filipinas. Nas análises filogenéticas, as sequências dos genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* geradas a partir de amostras de DNA positivas para *B. bovis* foram posicionadas em seis, três e quatro clados diferentes, respectivamente. Todas as sequências *msa-1* e a maioria das *msa-2b* foram encontradas em clados formados apenas por sequências nucleotídicas *msa* das Filipinas. Além disso, embora todas as sequências *msa-1* das Filipinas tenham mostrado similaridade com sequências *msa-1* australianas, as sequências *msa-2b* mostraram similaridade também com sequências *msa-2b* mexicanas. Os achados sugerem que a população de *B. bovis* das Filipinas é geneticamente diversificada.

Em Israel, Molad et al. (2014) encontraram alta diversidade genética de *B. bovis* a partir da amplificação e sequenciamento dos genes *msa-2a1*, *msa-2b* e *msa-2c* de amostras de DNA do referido parasita obtidas de sangue de bovinos e de carrapatos *Rhipicephalus annulatus*. A identidade entre as sequências variou de 55 a 100%, 63 a 100% e 71 a 100% para os genes *msa-2a1*, *msa-2b* e *msa-2c*, respectivamente. Na análise filogenética, as sequências obtidas se agruparam com sequências provenientes de outros países.

Nagano et al. (2013) amostraram 164 bovinos no estado da Bahia, 80 bovinos da cidade de Accra em Gana, além de utilizarem 24 amostras de sangue de bovinos sabidamente positivas provenientes de cidades localizadas no norte da Tailândia. O objetivo do trabalho foi investigar a diversidade genética de isolados de *B. bovis* dos

três locais amostrados e compará-los entre si utilizando o gene *msa-1* como marcador. As sequências *msa-1* de *B. bovis* de bovinos do Brasil apresentaram alta diversidade genética e foram posicionadas em três clados distintos no filograma. A análise de identidade entre as sequências de nucleotídeos obtidas no trabalho revelou valores variando de 57,5 a 99,4%, 99 a 100% e 60,3 a 100% para as amostras do Brasil, Tailândia e Gana, respectivamente, enquanto a identidade entre as sequências de aminoácidos deduzidas nos respectivos países variou de 59,4 a 99,7%, 98,4 a 100% e 58,7 a 100%, indicando alta diversidade genética, especialmente entre as sequências brasileiras.

Mais recentemente, Matos et al. (2017a,b) investigaram a diversidade de sequências de *B. bovis* em bezerros de leite nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, fazendo uso dos genes *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c* como marcadores. O referido trabalho avaliou três colheitas de amostras de sangue de 15 bezerras de leite procedentes de rebanhos localizados em Taiaçu, no estado de São Paulo e em Seropédica no estado do Rio de Janeiro. Os resultados mostraram a separação das sequências em diferentes clados nos filogramas baseados nos três genes, além de identidade variando de 68%, 80-100% e 97-98% com outras sequências previamente depositadas no *GenBank* para *msa-1*, *msa-2b* e *msa-2c*, respectivamente.

Os resultados de todos estes estudos prévios destacam a necessidade de mais estudos no mundo e no Brasil, a fim de gerar mais informações acerca da diversidade genética de *B. bovis* previamente à introdução de uma estratégia para o controle de *B. bovis* por meio de vacinas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência e a diversidade genética de *Babesia bovis* em bovinos de corte amostrados no Pantanal sul matogrossense.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a frequência de anticorpos IgG anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em amostras de soros de bovinos de corte na região sob estudo;
- Investigar a presença de DNA de *B. bovis* em amostras de sangue dos bovinos amostrados;
- Avaliar a diversidade genética de *B. bovis* na região estudada, a partir da construção de árvores filogenéticas e análise do número de haplótipos, com base nas sequências dos genes de antígenos variantes de superfície de merozoítos (*msa*).
- Avaliar a identidade entre as sequências de nucleotídeos obtidas das amostras utilizadas na filogenia.
- Analisar a entropia das sequências de aminoácidos geradas a partir das sequências de nucleotídeos utilizadas na filogenia.

4. Material e Métodos

4.1. Autorização da Pesquisa

Esta pesquisa está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (protocolo: 12375/15).

4.2. Animais amostrados e área de estudo

As colheitas de amostras de sangue de bovinos de corte foram realizadas em rebanhos de bovinos de corte *Bos indicus*, da raça Nelore, provenientes de cinco propriedades concentradas na Região Central do Pantanal Sul Matogrossense, distrito da Nhecolândia, distantes 30km entre si (18° 59' 15" S; 56° 37' 03") (**Figura 3**). Como não existe determinação de prevalência de *B. bovis* nesse estado, foi pressuposta uma prevalência esperada de 50%, conforme Stevenson, 2005. O tamanho da amostra foi determinado através do método de amostragem aleatória sistemática, onde o número mínimo de animais teve precisão absoluta de 5% e intervalo de confiança de 95%, como indicado pela fórmula abaixo:

$$n = z^2 (1 - Py) \times Py / d^2$$

Onde:

z = coeficiente de confiança ($z = 1,96$);

n = tamanho da amostra;

Py = prevalência esperada (50%);

d^2 = precisão absoluta desejada (5%);

Dessa forma, foram colhidas amostras de sangue de 400 animais, das categorias: vaca (> 6anos) e bezerros (7-12 meses).

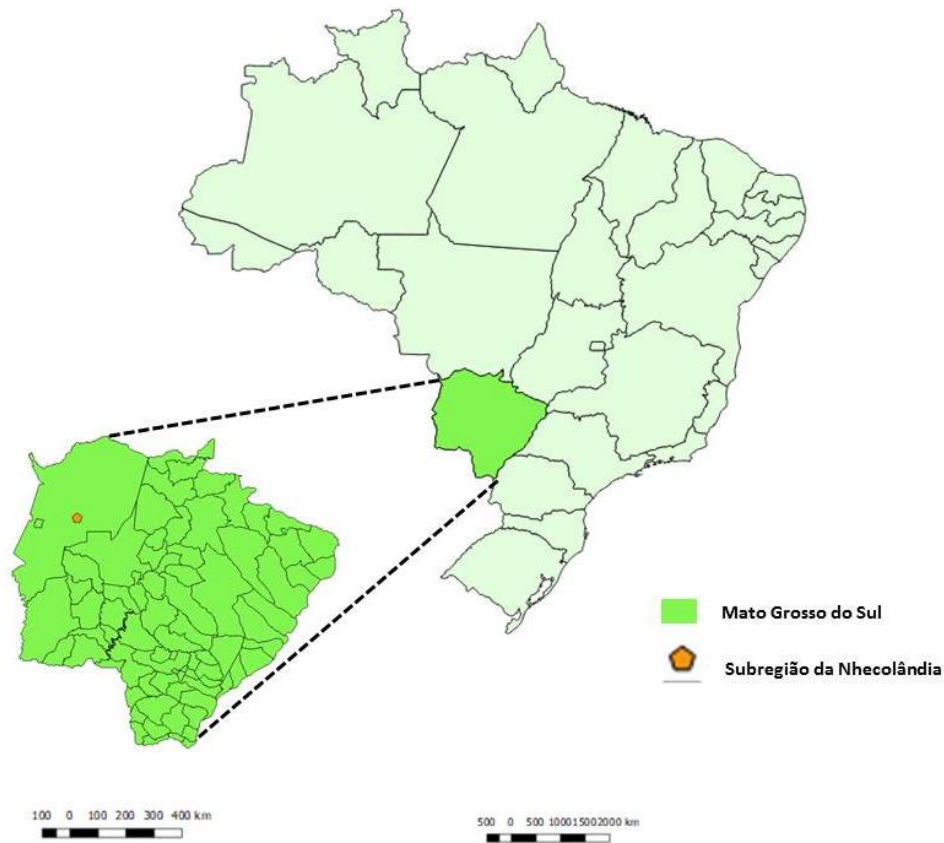


Figura 3. Localização da Nhicolândia, distrito de Corumbá, no Pantanal sul-matogrossense, onde foram realizadas as colheitas de amostras de sangue de bovinos de corte.

4.3. Colheita das amostras

As amostras de sangue dos 400 bovinos foram colhidas diretamente da veia jugular ou caudal. As amostras destinadas à extração de DNA e, portanto, utilizadas nos testes moleculares foram armazenadas em microtubos livres de DNA e RNA contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), enquanto as que se destinavam ao teste sorológico ELISA foram armazenadas em tubos sem EDTA,

para posterior obtenção do soro. Todas as amostras foram armazenadas a -70°C, até o momento da extração de DNA.

4.4. Diagnóstico Sorológico

4.4.1. Ensaio de Imunoadsorção Enzimático Indireto (iELISA) para detecção de anticorpos IgG anti- *Babesia bovis* e anti- *B. bigemina*

Com o intuito de detectar anticorpos da classe IgG anti-*B. bovis* presentes no soro dos bovinos amostrados, foi utilizado o teste ELISA indireto (iELISA), segundo protocolo estabelecido por Machado et al. (1997). Para tal, utilizou-se antígeno total (Imunodot Desenvolvimento, Indústria e Comércio de Imunógenos e Produtos de Diagnóstico Veterinários Jaboticabal, SP). O teste foi realizado utilizando-se concentração ótima do antígeno de 10µg/mL, diluído em tampão carbonato bicarbonato (0,05M pH 9,6). A diluição foi de 1:400 para os soros de referência positiva, negativa e soros-testes. As placas foram incubadas por 12 horas à 4°C e, posteriormente, feito o bloqueio com tampão carbonato-bicarbonato, adicionado de 5% de leite em pó desnatado (Molico[®], Nestlé, Brasil). As placas (Maxisorp[®]; Nunc, Thermo Scientific, Brasil) foram então incubadas por 90 minutos à 37°C, em câmara úmida. Após três lavagens com tampão PBS-Tween 20 (fosfato salina, pH 7,2 e Tween 20), foi adicionado à placa de ELISA o conjugado anti-IgG de bovino ligado à fosfatase alcalina na diluição de 1:30000, conforme recomendações do fabricante (Nº do catálogo A0705, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), com posterior incubação e lavagem. Por fim, adicionou-se p-nitrofenil fosfato (Sigma, St. Louis, MO), diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina (pH 9,8) (Sigma, St. Louis, MO), substrato da enzima fosfatase alcalina, sendo então as placas seladas com papel alumínio e incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente. A leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA (B.T. -100; Embrabio, São Paulo, Brasil), com filtro de 405nm. O ponto de corte do teste de ELISA correspondeu a duas vezes e meia o valor médio das densidades ópticas dos soros de referência negativos (Machado et al., 1997).

4.5. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.5.1. Extração de DNA das amostras de sangue de bovinos

O DNA das amostras de sangue dos bovinos foi extraído a partir do protocolo de extração de DNA descrito por Kuramae-Izioka (1997). Para tal, adicionaram-se 250 µL de cada amostra de sangue em microtubos livres de DNA e RNA. Em seguida, foram acrescentados 800 µL de tampão de lise, previamente aquecido em banho-maria a 65°C por 15 minutos, constituído de 160 mM de Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreídrico (Tris-HCl) pH 8,0, 60mM de ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), 20 mM de cloreto de sódio (NaCl), dodecil sulfato de sódio (DSS) a 0,5%, polivinilpirrolidona (PVP) a 1% e β-mercaptoetanol a 0,2%, procedendo-se à incubação em banho-seco a 65°C por 40 minutos. O conteúdo do microtubo foi homogeneizado em agitador tipo vórtex por 15 segundos, a cada 20 minutos.

Em seguida, foram adicionados 300 µL de acetato de potássio a 5M. Após esse procedimento, as amostras foram colocadas no gelo por 20 minutos, e depois centrifugadas por 10 minutos, a 10000 rpm e, uma temperatura de 10°C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em novos microtubos. Posteriormente, foram acrescentados 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1. As amostras foram novamente homogeneizadas por 20 segundos, seguidas por uma centrifugação a 10000 rpm a 10°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido, e novamente centrifugado por 10 minutos, a 10000 rpm e 10°C. O sobrenadante foi recolhido em novo microtubo e acrescentados 1000 µL de álcool absoluto; em seguida, armazenou-se a -20°C durante 12 horas. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, nas mesmas condições já mencionadas. Desta vez, foi descartado o sobrenadante e adicionados 800 µL de álcool 70%. As amostras foram novamente centrifugadas, sob as condições já descritas. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado colocado para secar em estufa a 37°C por um período de aproximadamente 2 horas. Por fim, foram adicionados 50µL de TE (Tris-HCl 10Mm, pH 8,2; EDTA 1Mm) para a eluição do DNA extraído.

As amostras de DNA foram devidamente identificadas, suas relações 260/280 e 260/230 e concentração mensuradas em espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo

Scientific), e em seguida foram armazenadas a -20°C para os posteriores ensaios de PCR.

4.5.2. Reação de Amplificação para o gene endógeno *gapdh* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

Para confirmar a presença de DNA amplificável nas amostras previamente extraídas, foi realizado um ensaio de PCR para o gene endógeno *gapdh*, seguindo o protocolo estabelecido por Birkenheuer et al. (2003). Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'- CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3') que flanqueiam uma região de aproximadamente 450 pb do referido gene. A reação de amplificação foi realizada utilizando um volume total final de 25 µL, com uma mistura contendo 5 µL da amostra de DNA sob teste, 0,2 µM de cada deoxinucleotídeo, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), tampão da Taq (PCR Buffer 10X- 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl) e água ultra-pura esterilizada q.s.p. A sequência térmica e tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, prosseguindo a uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos (Birkenheuer et al., 2003).

4.5.3. “Nested” PCR para detecção de *Babesia bovis* baseada no gene *sbp-2* (“proteína de corpo esférico 2”)

As amostras positivas na PCR convencional supracitada baseada no gene *gapdh* foram submetidas ao ensaio de “nested” PCR para *B. bovis* baseado no gene *sbp-2* (“proteína de corpo esférico 2”), seguindo protocolo previamente descrito por Aboulaila et al. (2010). A reação foi conduzida com um volume final de 25 µL, contendo 2 µL do DNA genômico sob teste, tampão (PCR Buffer 10X- 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 1,0 pm de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores), 0,2µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP's), 0,755 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados

Unidos) e água ultra-pura esterilizada (Promega) q.s.p. A segunda reação foi realizada com volume final de 25 µL, contendo 1 µL de DNA amplificado na primeira reação e as mesmas concentrações dos demais reagentes anteriormente descritas. As reações foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F (5'-CCGAATTCCTGGAAGTGGATCTCATGCAACC-3'), R (5'-ATCTCGAGTCACGAGCACTCTACGGCTTTGCAG-3') na primeira reação e F (5'-CGAATCTAGGCATATAAGGCAT-3'), R (5'-ATCCCCTCCTAAGGTTGGCTAC-3') na segunda reação (Aboulaila et al., 2010). As reações de amplificação foram realizadas de acordo com sequência térmica: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 64°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As mesmas condições foram utilizadas no segundo ciclo de amplificação, exceto pela temperatura de anelamento que foi alterada para 58°C. O fragmento amplificado na segunda reação apresenta o tamanho de aproximadamente 600 pb. Amostra de DNA de sangue bovino infectado por *B. bovis* (Machado et al., 1997) e água esterilizada ultra-pura foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

4.5.4. Reações de amplificação para *Babesia bovis* dirigidas aos genes *msa-2b* e *msa-2c* (“merozoite surface antigen”)

Para a caracterização molecular e o estudo da diversidade genética de *B. bovis*, as amostras de DNA dos bovinos positivas na PCR supracitada foram submetidas a ensaios de PCR convencionais dirigidos aos genes *msa-2b* e *msa-2c*, conforme descrito anteriormente por Tattiyapong et al. (2014). Em todos os ensaios de cPCR, um único oligonucleotídeo iniciador reverso foi utilizado para amplificar os dois genes (*msa-2b* e *msa-2c*). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, bem como o tamanho dos produtos (pb), estão apresentados na **Tabela 1**.

Resumidamente, a amplificação foi realizada utilizando um volume total de 25 µL, contendo 5 µL da amostra de DNA sob teste e uma mistura de reação de 20 µL composta por tampão da Taq (PCR Buffer 10X- 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂ (Life Technologies®), 0,8 mM da mistura dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 U Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), e água

ultrapura esterilizada (Promega[®], Madison, Wisconsin, EUA). As condições de tempo e ciclagem de temperatura foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 45 ciclos compostos por desnaturação a 94°C, por 30 segundos, anelamento a 56°C por 1 minuto para *msa-2b* e 58,1 °C por 1 minuto para *msa-2c*, extensão a 72°C, por 2 minutos, seguido de um ciclo de extensão final a 72°C, por 5 minutos. Amostra de DNA de sangue bovino infectado por *B. bovis* (Machado et al., 1997) e água esterilizada ultra- pura foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR para *msa-2b* e *msa-2c* e tamanho dos respectivos produtos.

Gene alvo	Nome	Sequência	Tamanho do produto (pb)
<i>msa-2b</i>	<i>msa-2b</i> F	5'-ATGATCGGGAAAATCTTCTTGTTAA-3'	780-843
<i>msa-2c</i>	<i>msa-2c</i> F	5'-ATGGTGTCTTTTAACATAATAACC-3'	792-798
	Oligonucleotídeo iniciador	5'-TTAAAATGCAGAGAGAACGAAGTAGC-	
	Reverso comum	3'	

Referência: Tattiyapong et al. (2014).

4.6. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo (0,625 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 44 M ácido bórico; 12,49mM EDTA). O processo foi realizado a 90V/150mA durante 50 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Chemi-Doc, Bio-Rad[®]).

4.7. Reações de Clonagem e Sequenciamento

4.7.1. Reação de ligação do produto amplificado com o vetor pGEM-T Easy

A clonagem dos produtos amplificados foi feita com o vetor pGEM- T Easy (Promega® Madison, USA), seguindo as recomendações do fabricante. As concentrações de DNA e o vetor a serem utilizadas na reação de ligação foram determinadas com o objetivo de se obter ao final uma relação inserto: vetor de 3:1, com base na fórmula descrita abaixo:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{kb do inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \frac{\text{Relação inserto : vetor}}{3} = \text{ng do inserto}$$

A reação de ligação do DNA de interesse com o vetor, de volume final 10 µL, consistiu em adicionar 40 ng do inserto (DNA da amostra), 5 µL de tampão da enzima, 50 ng do vetor pGEM- T Easy, 1µL da enzima T4 Ligase e água esterilizada ultra-pura q.s.p. As soluções foram misturadas e incubadas a 4° C por 18 horas para a obtenção do número máximo de transformantes. A **Figura 4** mostra uma esquematização do vetor pGEM-T Easy.

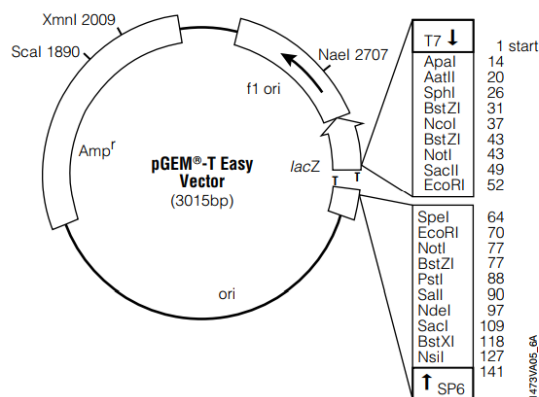


Figura 4. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos).

4.7.2. Transformação das células competentes de *Escherichia coli* DH5α

O produto da ligação descrita anteriormente foi utilizado para transformar células *E. coli* DH5α tornadas competentes quimicamente por tratamento com CaCl_2 ($10^9 - 10^{10}$ cfu/ng de DNA). Foram adicionados 10 µL da reação de ligação a 50 µL de células competentes e a mistura foi mantida por 30 minutos no gelo. O choque térmico das células foi realizado colocando os microtubos em banho-maria a 42°C por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 250 µL de meio líquido Lúria Bertani (Tryptona; Extrato de Levedura; NaCl; água destilada q.s.p.) e as células incubadas a 37°C durante uma hora e meia sob agitação a 200 rpm. Em seguida, 250 µL de meio já com as células transformadas foram adicionados às placas contendo meio sólido Lúria Bertani (Tryptona; Extrato de Levedura; NaCl; Ágar; água destilada q.s.p.) preparadas com 100 µg/mL de ampicilina, 40 µL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) (0,026%) e 20 µL IPTG (isopropil-b-D-galactosídeo) (0,82mM). As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas. As colônias de bactérias contendo os clones (colônias brancas) foram transferidas para tubos cônicos de centrifugação com capacidade para 15 mL, preenchidos com 5 mL de meio líquido LB e 100 µg/mL de ampicilina. Após incubação a 37°C e agitação a 200 rpm por até 20 horas foi realizada a extração do DNA plasmidial.

4.7.3. Minipreparação do DNA plasmidial (Método da lise alcalina)

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o método de lise alcalina (Sambrook et. al., 2001). As células transformadas de *E. coli* foram separadas do meio de crescimento a partir de repetidas centrifugações em microtubo a 12000 rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante sempre descartado. Ao precipitado foram adicionados 100 µL de tampão GET (50 mM de glicose; 10 mM de EDTA 0,5M pH 8,0; 25 mM de Tris HCl 1M pH 8,0 e água destilada q.s.p. 100 mL) a 4°C. O conteúdo do tubo foi homogeneizado para posterior adição de 200µL do tampão de lise alcalina, preparado com 1 mL de NaOH 1N, 500 µL de SDS 10% e água ultrapura esterilizada q.s.p. 5 mL. Essa mistura foi homogeneizada e colocada no gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de acetato de

potássio 3 M (4°C) seguido de mais uma incubação por 5 minutos no gelo. A mistura foi novamente centrifugada a 4°C e 12000 rpm por 10 minutos. Quatrocentos microlitros (400 µL) do sobrenadante foram transferidos a um novo microtubo e adicionado 1 mL de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada e levada a um “freezer” -80°C por 15 minutos. Em seguida, ocorreu uma nova centrifugação nas mesmas condições supracitadas. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 1mL de etanol 70%. Esta mistura foi homogeneizada até o precipitado descolar do fundo do tubo e então submetida à nova centrifugação, desta vez sob temperatura ambiente a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo deixado aberto para secagem por 30 minutos em banho seco a 45°C. Após a secagem foram adicionados 200 µL de RNase (200 µg/ mL) e o tubo deixado em banho-maria a 37°C por 2 horas.

Em seguida, foram adicionados 50µL de fenol equilibrado: clorofórmio (v/v). A mistura foi homogeneizada por 1 minuto em um agitador tipo vórtex. Posteriormente, as amostras foram novamente submetidas à centrifugação a 4°C e 14000 rpm por 10 minutos e 100 µL da fase superior incolor foi transferida a um novo microtubo, no qual foram adicionados 10 µL de acetato de sódio 3M e 200 µL de etanol absoluto. Esta mistura ficou no “freezer” -80°C por 15 minutos. Novamente procedeu-se à centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi desprezado. Um mililitro (1 mL) de etanol 70% foi adicionado e uma nova centrifugação realizada nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram por mais 30 minutos a 45°C em banho seco. A eluição foi feita em 30 µL de água ultrapura esterilizada e incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

4.8. Reação de amplificação do fragmento do DNA plasmidial contendo insertos dos genes *msa-2b* e *msa-2c*

O DNA plasmidial extraído dos clones foi submetido a um ensaio de cPCR dirigido a um fragmento plasmidial que flanqueia o sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pGEM T- easy e, portanto, inclui os insertos dos genes *msa-2b* e *msa-2c*. Para tal, foi utilizado o par de primers M13 forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e

M13 R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), descritos por Lau et al. (2010). A amplificação foi realizada utilizando um volume total de 25 µL, contendo 5 µL da amostra de DNA sob teste e uma mistura de reação de 20 µL composta por tampão da Taq (PCR Buffer 10X- 100nM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂ (Life Technologies®), 0,8 mM da mistura dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 U Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), e água ultrapura esterilizada (Promega®, Madison, Wisconsin, EUA). As condições de tempo e temperatura da reação foram de desnaturação inicial de 95°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 54°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e meio, seguidos de uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos. O fragmento amplificado compreendeu uma fração do próprio plasmídeo unido ao inserto dos genes *msa-2b* e *msa-2c*, e variou de 998 a 1100 pb.

4.9. Reações de Sequenciamento

4.9.1. Purificação dos amplicómeros

Os produtos amplificados a partir de ensaios de PCR foram purificados com “Sílica Bead DNA Gel Extraction Kit” (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.9.2. Quantificação de DNA dos amplicómeros

A quantificação do material purificado foi realizada em aparelho espectrofotômetro Nano Drop 2000c (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), por meio da leitura da absorbância de cada amostra.

4.9.3. Sequenciamento

Os produtos amplificados e purificados foram submetidos ao sequenciamento por método automatizado baseado na terminação em cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977). Os oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento foram os mesmos utilizados na cPCR de DNA plasmidial, M13 F e M13 R, que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEM T- easy, e amplifica um fragmento de até 1100 pb. O protocolo da reação de sequenciamento foi realizado com algumas modificações a partir daquele descrito pelo fabricante do

”Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin-Elmer Applied Biosystems). Utilizaram-se 3,5 µL do Tampão 2,5x (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂), 0,5 µL de *Big Dye*, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5 µL de água ultra pura e 1,5 µL de DNA, sendo esta quantidade estimada pela verificação de intensidade das bandas em gel de agarose a 2,0%. As amplificações foram realizadas inicialmente em termociclador (MJ Research-Inc) a 96°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento por 30 segundos a 54°C e extensão a 60°C por 4 minutos, sendo então mantidas a 4°C por tempo indeterminado.

O processo de lavagem das amostras foi realizado adicionando-se 80 µL Isopropanol 75% em cada amostra. A placa foi selada com alumínio e, após incubação por 15 minutos em local escuro à temperatura ambiente, foi centrifugada a 4.000 x g por 30 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de etanol 70% foram adicionados, e a placa novamente centrifugada, por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e a mesma quantidade de etanol 70% foi acrescida, repetindo o passo anterior. A placa foi centrifugada invertida (aceleração e desaceleração) e, em seguida, colocada na bomba de vácuo por 5 minutos para completa secagem das amostras. O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO- FCAV/UNESP).

4.10. Análise das sequências

4.10.1. Inferência filogenética

A trimagem dos dados de sequenciamento e a obtenção das sequências consenso foram elaboradas a partir do programa PhredPhrap (Ewing et al., 1998), que avalia os resultados gerados nos sequenciamentos, informando a qualidade de cada base sequenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das sequências. Foram consideradas as bases com qualidade Phred acima de 20. Posteriormente, a ferramenta de análise BLASTn foi utilizada com a finalidade de confrontar as sequências obtidas neste trabalho com outras pertencentes ao mesmo gene no banco de dados “GenBank” (Benson et al., 2002). As sequências consenso

salvas em modo “FASTA” foram alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene retiradas do banco de dados “GenBank”, utilizando o software MAFFT (Kato et al., 2002). Inferências filogenéticas sobre as sequências dos genes *msa-2b* e *msa-2c* foram obtidas a partir de análises de máxima verossimilhança utilizando o cluster blackbox RaxML BlackBox 7.6.3 (Stamatakis et al., 2008). As análises foram efetuadas via portal CIPRES (Miller et al., 2010). O “bootstrap” foi acessado com 1000 replicatas e o melhor modelo evolutivo foi selecionado baseado no Akaike Information Criterion (AIC) utilizando o software jModeltest 2.1.3 (Darriba et al. 2012). A edição das árvores filogenéticas assim como o enraizamento (via grupo externo) foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56-381 beta (Stover e Muller, 2010).

4.10.2. Análise de identidade entre sequências

A porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos dos clones de *msa-2b* e *msa-2c* obtidas no presente estudo foi obtida utilizando-se a ferramenta “Sequence identity matrix” no programa Bioedit v. 7.0.5.3. (Hall, 1999).

4.10.3. Entropia de aminoácidos

A análise de entropia foi utilizada a fim de verificar a variabilidade entre as sequências de aminoácidos. Para tal, as sequências de nucleotídeos dos clones de *msa-2b* e *msa-2c* foram convertidas em aminoácidos a partir do programa ExPASy (Gasteiger et al., 2003), alinhadas e em seguida submetidas à referida análise por meio da ferramenta “Entropy (H(x)) plot” via Bioedit v. 7.0.5.3. (Hall, 1999).

4.10.4. Diversidade de haplótipos

O alinhamento das sequências dos genes *msa-2b* e *msa-2c* obtidos no presente estudo foram utilizados para calcular a diversidade de nucleotídeos (π), nível de polimorfismo (diversidade de haplótipo – [dh]), número de haplótipos (h) e a média do número de diferenças nucleotídicas (K) utilizando o programa DnaSP v5 (Librado e Rozas, 2009). Adicionalmente, as sequências dos genes *msa-2b* e *msa-2c* foram submetidas à análise de TCS Network (Clement et al., 2000), a qual foi

inferida utilizando o programa Population Analysis with Reticulate Trees (popART) (Leigh e Bryant, 2015).

5. RESULTADOS

5.1. Frequência de anticorpos IgG anti- *B. bovis* e anti-*B. bigemina*

O teste sorológico iELISA mostrou 61,25% e 51,25% do total de animais soropositivos para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, sendo 50% e 34,5% do total de vacas e 72,5% e 68% do total de bezerros. Os pontos de corte foram calculados com base na média entre todas as placas avaliadas, correspondendo a (0,248) e (0,256) para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. No total, 26,5% (53/200) e 42% (84/200) das vacas se mostraram soropositivas e soronegativas, respectivamente, para ambos agentes. Enquanto 23,5% (47/200) e 8% (16/200) se mostraram soropositivas somente para *B. bovis* ou *B. bigemina*, respectivamente. Quanto aos bezerros, 61,5% (123/200) e 21% (42/200) se mostraram soropositivos e soronegativos, respectivamente, para ambos agentes. Enquanto 11% (22/200) e 6,5% (13/200) se mostraram soropositivos somente para *B. bovis* ou *B. bigemina*, respectivamente. A análise estatística pelo teste Qui Quadrado mostrou diferença significativa ($P < 0,05$) entre a frequência de bezerros e vacas soropositivos para os agentes sob estudo, demonstrando que bezerros apresentam maior soropositividade quando comparados às vacas.

5.2. Qualidade das amostras de DNA extraídas – PCR para o gene *gapdh* de mamíferos

A concentração média do DNA e as relações de absorbância (260/280 e 260/230 nm) das amostras de DNA foram de 25,14 ng/ μ L, (DP $\pm$ 10,14), 1,8 nm e 1,33 nm, (DP $\pm$ 0,12 e $\pm$ 0,56) respectivamente. Todas as amostras de DNA extraídas do sangue dos bovinos mostraram-se positivas na cPCR para o gene endógeno (*gapdh*). Na **Figura 5** é possível observar a eletroforese em gel agarose a 1,0% de produtos amplificados na cPCR baseada no referido gene (fragmento de aproximadamente 450 pb).

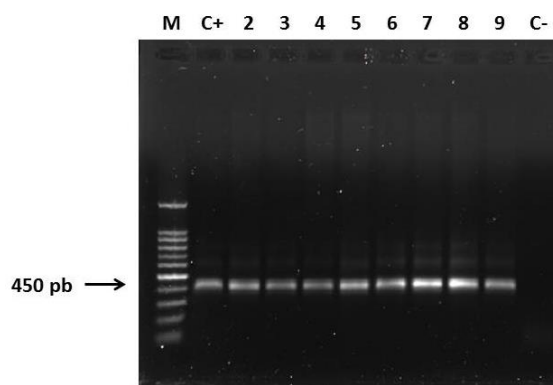


Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à cPCR para controle endógeno (gene *gapdh*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA extraído de bovino); canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada); canaletas 2-9: amostras de DNA de bovinos do presente estudo.

5.3. Triagem das amostras a partir de “nested” PCR baseada em um fragmento do gene *sbp- 2* de *Babesia bovis*

Das 400 amostras de sangue de bovino submetidas à triagem, 4,5% (18/400) mostraram-se positivas na cPCR direcionada ao gene *sbp- 2* (**Figura 6**), sendo que todas pertenciam à categoria de bezerros.

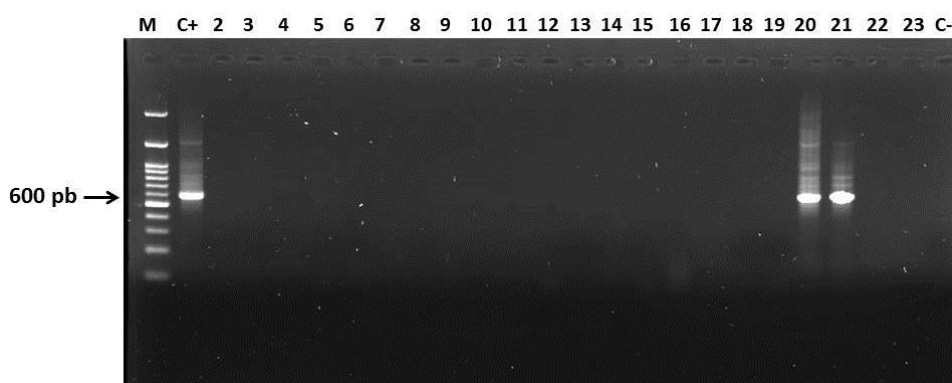


Figura 6. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à nPCR para *Babesia bovis* (gene *sbp-2*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de bovino positivo para *B. bovis*); canaletas 2-23: amostras de DNA de bovinos; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada).

5.4. Reações de amplificação para *Babesia bovis* baseadas no gene *msa-2b*

Das 18 amostras de sangue de bezerros positivas na reação de nPCR supracitada, 77,7% (14/18) mostraram-se positivas quando submetidas à amplificação do fragmento de *msa-2b* de *B. bovis* (**Figura 7**).

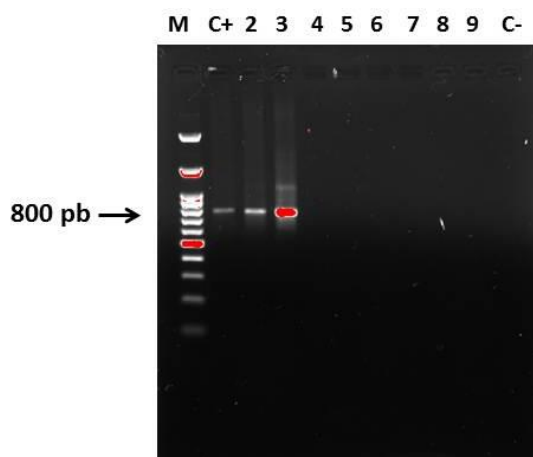


Figura 7. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Babesia bovis* (gene *msa-2b*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de sangue de bovino positivo para *B. bovis*); canaletas 2-9: amostras de DNA de bovinos; canaleta C-: controle negativo (água ultra- pura esterilizada).

5.5. Reação de amplificação para *Babesia bovis* baseada no gene *msa-2c*

Das 18 amostras de sangue de bezerros positivas na nPCR de triagem para *B. bovis* pelo gene *sbp-2*, 66,6% (12/18) mostraram-se positivas quando submetidas à amplificação do fragmento de *msa- 2c* (**Figura 8**).

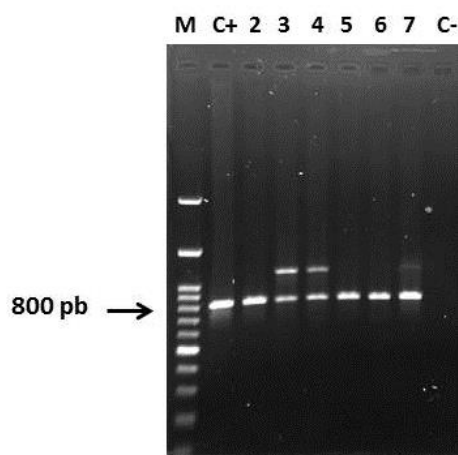


Figura 8. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para *Babesia bovis* (gene *msa-2c*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de bovino positivo para *B. bovis*); canaletas 2-7: amostras de DNA de bovinos positivas; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada).

5.6. Análise da identidade das sequências pelo BLASTn

Dentre as amostras positivas para *Babesia bovis* submetidas à clonagem gênica, clones dos genes *msa-2b* (14) e *msa-2c* (13) foram sequenciados e confrontados com outras sequências previamente depositadas no GenBank, por meio da ferramenta de análise Blastn. Todas as sequências analisadas (*msa-2b* e *msa-2c*) compartilharam identidade de 90 a 99% com outras sequências também detectadas em bovinos e pertencentes aos mesmos genes de *B. bovis*.

5.6.1. Análise das sequências de *msa-2b*

Todas as sequências do gene *msa-2b* obtidas no presente trabalho compartilharam identidade de 90 a 99% com outras sequências previamente depositadas no GenBank, com a cobertura “Query coverage” variando de 75 a 100%. De modo geral, as sequências mantiveram a porcentagem mais alta de identidade (99%) com sequências de *B. bovis* previamente detectadas no Vietnã, Sri Lanka, Argentina, Israel, Filipinas e México. A sequência 7 (clone 1 da amostra 189) foi a que mostrou os menores valores de identidade (90%) com algumas sequências

do Sri Lanka, Vietnã e México, sob os números de acesso AB787631, AB786922 e FJ422803, respectivamente.

As 14 sequências de *Babesia bovis* referentes ao gene *msa-2b* obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank sob os números de acesso MH475362 a MH475365, MK361205 a MK361214.

5.6.2. Análise das sequências de *msa-2c*

Todas as sequências do gene *msa-2c* obtidas no presente trabalho compartilharam identidade de 91 a 99% com sequências previamente depositadas no GenBank, com a cobertura “Query coverage” variando de 86 a 100%. De maneira geral, as sequências mantiveram a porcentagem mais alta de identidade (99%) com sequências de *B. bovis* previamente detectadas no Vietnã, Sri Lanka, Argentina, Israel, Filipinas, México e Turquia. A sequência (190 clone 2) foi a que mostrou os menores valores de identidade (91 e 92%) com duas sequências do Sri Lanka e uma sequência de Israel, sob os números de acesso AB787609, AB787608 e KJ156370, respectivamente.

As 13 sequências de *Babesia bovis* referentes ao gene *msa-2b* obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank sob os números de acesso MH751587 a MH751591, MK305090 a MK305092, MK353800 a MK353804.

5.7. Análise filogenética

5.7.1. Análise Filogenética do gene *msa-2b*

A análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança e modelo evolutivo GTR+G foi realizada com base em 14 sequências do gene *msa-2b* obtidas no presente estudo e 22 sequências do gene *msa-2b* de estudos prévios conduzidos no Brasil e outras partes do mundo. As sequências empregadas na filogenia foram obtidas a partir das amostras #4 (3 clones), #168 (3 clones), #189 (3 clones), #190 (3 clones) e #191 (2 clones). O cladograma revelou a presença de seis clados,

suportados por valores de “bootstrap” que variaram de 53 a 100%. As sequências de *B. bovis* detectadas no presente estudo se posicionaram em 4 clados (1, 2, 3 e 4) **(Figura 9)**. As sequências obtidas a partir da amostra #189 (189-clone 1, 189-clone 2 e 189-clone 3) se agruparam no clado 1, demonstrando proximidade filogenética. No entanto, enquanto os clones 1 e 2 se apresentam como grupo irmão, o clone 3 posicionou-se mais distante destes e mais próximo à sequência do isolado CA 109.2 detectada no Vietnã (LC004318). Ainda neste mesmo clado é possível observar clones pertencentes às amostras #168 e #190 (168-clone 1 e 190-clone 1), juntamente com sequências detectadas no Vietnã e Filipinas sob os números de acesso LC004328 e AB819788, respectivamente. Os segundos clones das amostras #168 e #190 (168-clone 2 e 190-clone 2) aparecem no segundo clado, agrupados com uma sequência proveniente do Vietnã, e ainda às sequências do Pantanal obtidas a partir da amostra #4 (4-clone 1, 4-clone 2 e 4-clone 3). A sequência 190-clone 3 obtida no presente estudo aparece no terceiro clado, como grupo irmão do isolado Tabasco, detectado no México. Este terceiro clado ainda é composto por sequências detectadas na Tailândia, México e uma sequência previamente detectada em Taiaçu, no estado de São Paulo. As sequências (191-clone 1, 191-clone 2 e 168-clone 3) do Pantanal aparecem no clado número 4 e se agruparam com sequências previamente detectadas nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (KX160815, KU522560), respectivamente, neste clado também são alocadas sequências do Sri Lanka e Tailândia. Os clados número 5 e 6 são formados apenas por duas sequências cada sendo, Tailândia (AB745712) e Vietnã (AB786821) no clado 5 e duas sequências detectadas na Austrália (DQ173953 e DQ173958).

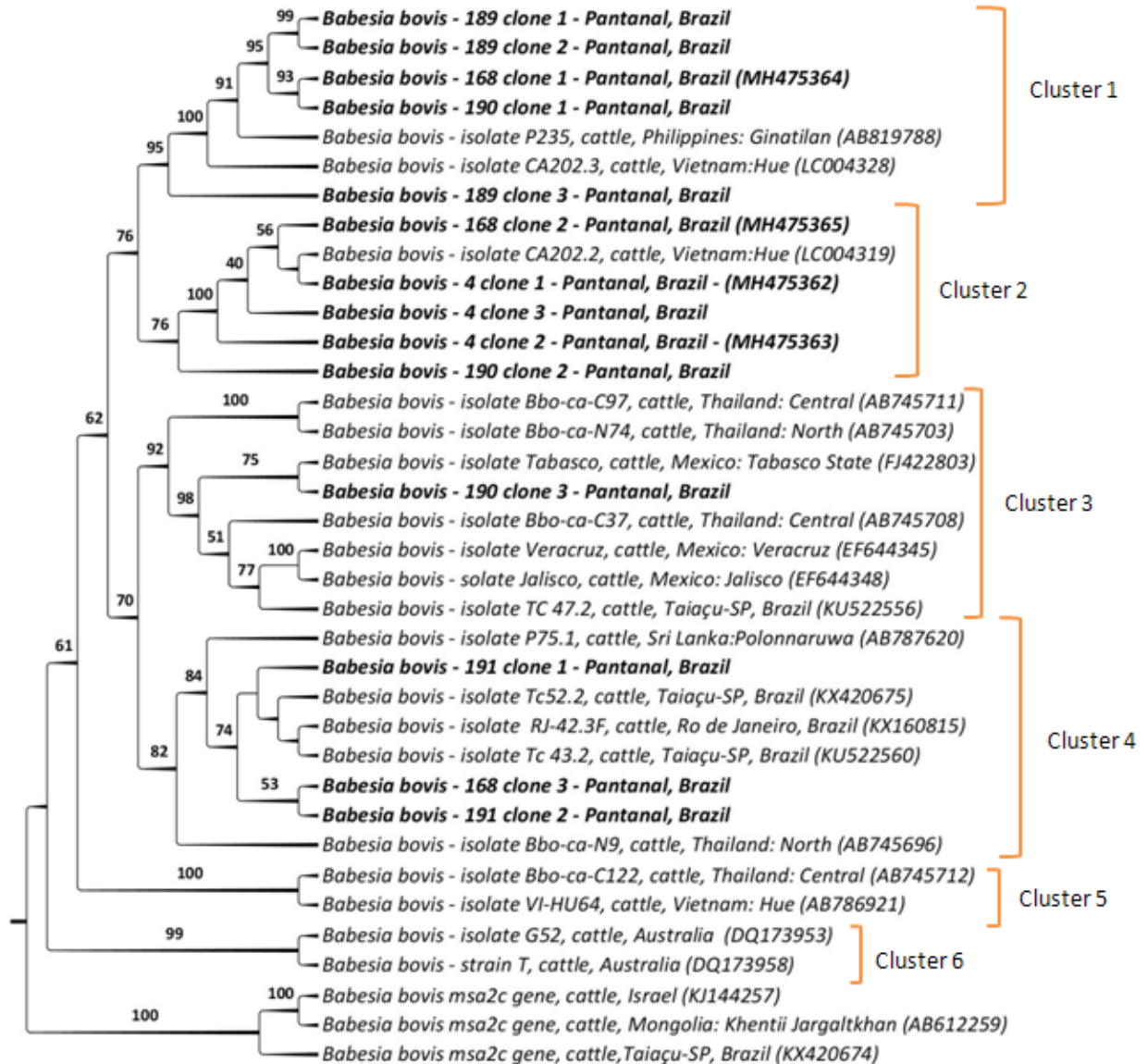


Figura 9. Análise filogenética das sequências do gene *msa-2b* de *B. bovis*. A árvore filogenética foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança e o modelo evolutivo GTR + G. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. Os números em cada nó são correspondentes aos valores de “bootstrap” acessados com 1000 réplicas. Três sequências do gene *msa-2c* de *B. bovis* foram utilizadas como grupo externo.

5.7.2. Análise Filogenética do gene *msa-2c*

A análise filogenética de Máxima Verossimilhança e modelo evolutivo TIM3 + G foi realizada com base em 13 sequências obtidas no presente estudo e 25 sequências do gene *msa-2c* de estudos prévios conduzidos no Brasil e outras partes do mundo. As sequências do presente estudo foram obtidas a partir das amostras #10 (3 clones), #138 (3 clones), #139 (3 clones), #168 (2 clones) e #179 (2 clones). O cladograma revelou a presença de 9 clados, suportados por valores de “bootstrap” que variaram de 43 a 100% (**Figura 10**). As sequências de *B. bovis* de bovinos de corte amostrados no Pantanal do Mato Grosso do Sul posicionaram-se em 6 clados (1, 2, 3, 4, 7 e 9). Dois clones da amostra #10 (10-clone 1 e 10-clone 2) se agruparam no primeiro clado, juntamente com sequências previamente detectadas no Vietnã, Filipinas e Israel. Os 3 clones da amostra #139 (139-clone 1, 139-clone 2 e 139 clone-3) se agruparam junto à uma sequência obtida da amostra #10 (10-clone 3), sendo as quatro agrupadas a sequências detectadas no Sri Lanka, Filipinas e México. As sequências 179-clone 1 e 179-clone 2 obtidas das amostras #179 formaram sozinhas os clados 9 e 3, respectivamente. As demais sequências (138-clone 1, 138-clone 2, 138-clone 3 e 168-clone 2) obtidas das amostras #138 e #168 se agruparam no clado 7 juntamente com sequências detectadas na Turquia e México (GU004533, KC515390, KC515389 e EF640958).

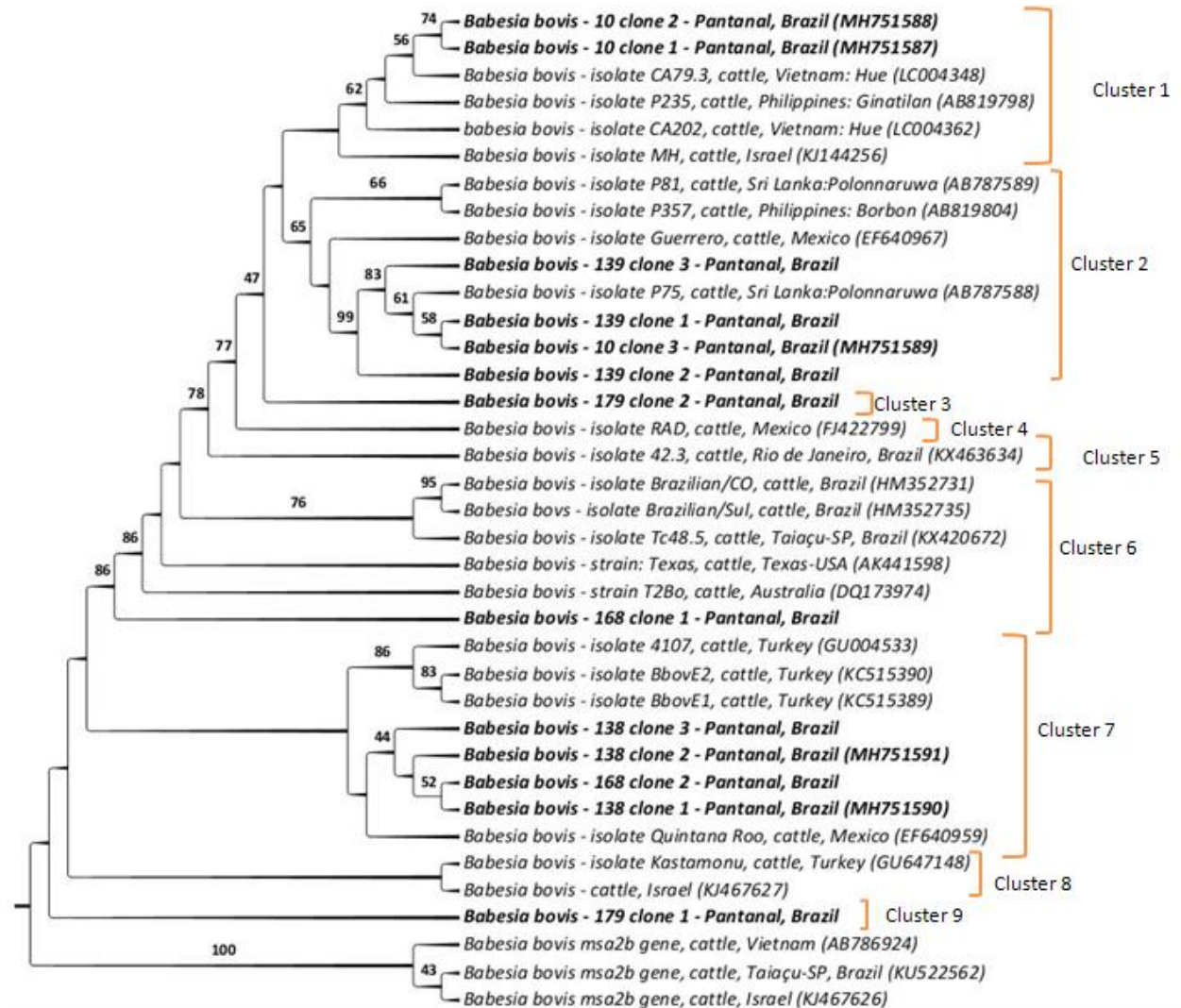


Figura 10. Análise filogenética das sequências do gene *msa-2c* de *B. bovis*. A árvore filogenética foi inferida usando o método Máxima Verossimilhança e o modelo evolutivo TIM3 + G. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em negrito. Os números em cada nó são correspondentes aos valores de “bootstrap” acessados com 1000 réplicas. Três sequências do gene *msa-2b* de *B. bovis* foram utilizadas como grupo externo.

5.8. Análise de identidade entre sequências

5.8.1. Identidade entre sequências de nucleotídeos de *msa-2b* de *Babesia bovis*

A identidade entre as sequências *msa-2b* de *B. bovis* obtidas a partir de amostras de sangue de bovinos de corte no Pantanal sul mato-grossense demonstrou uma variação de 58 a 98,2% (**Tabela 5**). A menor porcentagem de identidade (58%) correspondeu à comparação das sequências clone-1 e clone-3 da amostra #190 com a clone-3 da amostra #4. Por outro lado, a maior porcentagem de identidade (98,2%) foi referente a dois clones de uma mesma amostra (*clones 1 e 2 da amostra #189*). Analisando as sequências de *B. bovis* obtidas de um mesmo animal, ou seja, os clones de uma mesma amostra, foi possível observar que as maiores porcentagens de divergência entre clones foram detectadas nas sequências obtidas do gene *msa-2b*. A variação de divergência entre as sequências foi de 4,1 a 22,8%, 27,3 a 33,9%, 1,8 a 5%, 19,6 a 32,7% e 7,6 a 30,5% nos clones obtidos das amostras #4, #168, #189, #190 e #191, respectivamente. A maior divergência entre clones de *msa-2b* foi de 33,9% e se deu entre as sequências pertencentes aos clones 1 e 2 da amostra #168, enquanto que a menor divergência 1,8% foi observada entre os clones 1 e 2 da amostra #189.

Tabela 5. Matriz de identidade e divergência entre sequências de nucleotídeos *msa-2b* de *Babesia bovis* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal sul-matogrossense.

Divergência	Identidade														
	Amostra; clone	4; 1	4; 2	4; 3	168; 1	168; 2	168; 3	189; 1	189; 2	189; 3	190; 1	190; 2	190; 3	191; 1	191;2
	4; 1	ID	95,9%	79,1%	67%	83,5%	68,4%	64,8%	65,5%	66,5%	69,1%	77,6%	65,9%	69,9%	71,8%
	4; 2	4,1%	ID	77,2%	68,3%	81,1%	71,4%	63,2%	63,9%	65%	70,8%	79%	66%	70,5%	74,8%
	4; 3	20,9%	22,8%	ID	58,5%	80,7%	61,5%	61,9%	61,6%	62,5%	58%	68,1%	58%	62,3%	59,2%
	168;1	33%	31,7%	41,5%	ID	66,1%	72,7%	93,7%	94,8%	91,6%	96,3%	80%	72,2%	73,7%	69,4%
	168;2	16,5%	18,9%	19,3%	33,9%	ID	68,9%	69,7%	69,3%	70,9%	65,3%	83,2%	64,9%	70%	66,5%
	168;3	31,6%	28,6%	38,5%	27,3%	31,1%	ID	70,2%	68,8%	69,4%	70,4%	70,6%	78,4%	97,1%	93,6%
	189;1	35,2%	36,8%	38,1%	6,3%	30,3%	29,8%	ID	98,2%	96%	90,9%	74,7%	69,2%	70,6%	64,6%
	189;2	34,5%	36,1%	38,4%	8,2%	30,7%	31,2%	1,8%	ID	95%	92%	75,6%	68,3%	70,4%	65,3%
	189;3	33,5%	35%	37,5%	8,4%	29,1%	30,6%	4%	5%	ID	88,7%	76,8%	68,5%	70,1%	64,2%
	190;1	30,9%	29,2%	42%	3,7%	34,7%	29,6%	9,1%	8%	11,3%	ID	80,4%	69,5%	71%	71,9%
	190;2	22,4%	21%	31,9%	20%	16,8%	29,4%	25,3%	24,4%	23,2%	19,6%	ID	67,3%	71,4%	70,3%
	190;3	34,1%	34%	42%	27,8%	35,1%	21,6%	30,8%	31,7%	31,5%	30,5%	32,7%	ID	79,4%	73%
	191;1	30,1%	29,5%	37,7%	26,3%	30%	2,9%	29,4%	29,6%	29,9%	29%	28,6%	20,6%	ID	92,4%
	191;2	28,2%	25,5%	40,8%	30,6%	33,5%	6,4%	35,4%	35,8%	35,8%	28,1%	29,7%	27%	7,6%	ID

5.8.2. Identidade entre sequências de nucleotídeos *msa-2c* de *Babesia bovis*

A identidade entre as sequências de *msa-2c* obtidas no Pantanal sul mato-grossense, demonstrou uma variação de 75,1 a 99,8% (**Tabela 6**). Sendo que a menor porcentagem de identidade (75,1%) se refere à comparação das sequências (179 clone 2) com a (138 clone 3). Enquanto a maior porcentagem de identidade (99,8%), curiosamente, não se refere a dois clones de uma mesma amostra, tratam-se das sequências (139 clone 3) e (10 clone 3). A variação da divergência entre as sequências obtidas de clones de uma mesma amostra foi de 3 a 5,5%, 0,6 a 2,3%, 2 a 8,7%, 14,3% e 12,3% nos clones obtidos das amostras #10, #138, #139, #168 e #179, respectivamente. A maior divergência entre clones de *msa-2c* foi de 14,3%

entre os clones 1 e 2 da amostra #168, enquanto a menor divergência observada foi de 0,6% entre os clones 2 e 3 da amostra #138.

Tabela 6. Matriz de identidade entre sequências de nucleotídeo de *msa-2c* detectadas em bovinos amostrados no Pantanal sul- matogrossense.

		Identidade												
Divergencia	Amostra; clone	10; 1	10; 2	10; 3	138; 1	138; 2	138; 3	139; 1	139; 2	139; 3	168; 1	168; 2	179; 1	179; 2
	10;1	ID	97%	94,5%	91,8%	91,4%	91,2%	95,7%	91,4%	94,6%	91,2%	90,7%	81,2%	81,3%
	10;2	3%	ID	97,2%	92,5%	94,1%	93,9%	97,9%	91,1%	97,3%	91,5%	90,5%	81,2%	78,9%
	10;3	5,5%	2,8%	ID	93,5%	94,2%	94,8%	97,9%	91,2%	99,8%	92,1%	89,1%	79,1%	77,4%
	138;1	8,2%	7,5%	6,5%	ID	97,7%	97,9%	92%	85,4%	93,6%	93%	90,7%	82,3%	75,7%
	138;2	8,6%	5,9%	5,8%	2,3%	ID	99,4%	93,5%	86,8%	94,4%	92,2%	92,4%	84,5%	75,4%
	138;3	8,8%	6,1%	5,2%	2,1%	0,6%	ID	93,2%	86,5%	94,9%	92,7%	92,1%	84,1%	75,1%
	139;1	4,3%	2,1%	2,1%	8%	6,5%	6,8%	ID	92,1%	98%	90,6%	90,2%	80,7%	78,4%
	139;2	8,6%	8,9%	8,8%	14,6%	13,2%	13,5%	7,9%	ID	91,3%	84%	93,6%	87,4%	84,8%
	139;3	5,4%	2,7%	0,2%	6,4%	5,6%	5,1%	2%	8,7%	ID	92,2%	89,2%	79,8%	77,5%
	190;1	8,8%	8,5%	7,9%	7%	7,8%	7,3%	9,4%	16%	7,8%	ID	85,7%	78%	80,1%
	168;2	9,3%	9,5%	10,9%	9,3%	7,6%	7,9%	9,8%	6,4%	10,8%	14,3%	ID	89%	81%
	179;1	18,8%	18,8%	20,9%	17,7%	15,5%	15,9%	19,3%	12,6%	20,2%	22%	11%	ID	87,7%
	179;2	18,7%	21,1%	22,6%	24,3%	24,6%	24,9%	21,6%	15,2%	22,5%	19,9%	19%	12,3%	ID

5.8.3. Análise da Entropia de Aminoácidos

A análise de entropia de aminoácidos, realizadas a partir do alinhamento das sequências dos clones *msa-2b* e *msa-2c* estão apresentados nas **figuras 11 e 12**, respectivamente. No gráfico apresentado para o gene *msa-2b* é possível observar 78 picos de alta entropia distribuídos ao longo do gene, enquanto no gráfico apresentado para o gene *msa-2c* observa-se 44 picos de alta entropia distribuídos ao longo do gene. No presente estudo, o valor de entropia variou de 0,25 a 1,53 para *msa-2b* e de 0,27 a 1,09 para *msa-2c*.

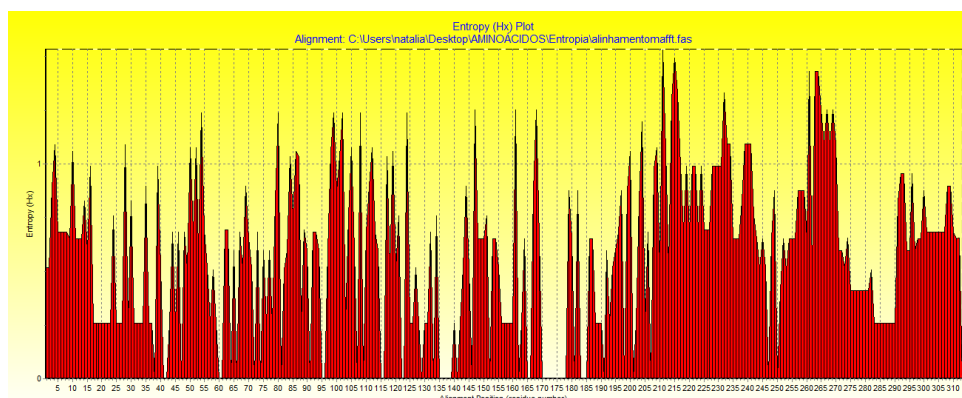


Figura 11. Gráfico de entropia de aminoácidos obtidos a partir das sequências do gene *msa-2b*.

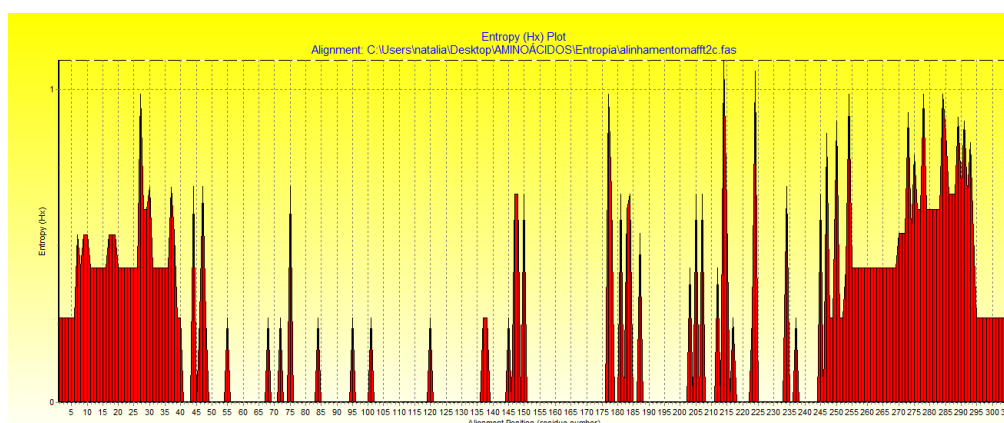


Figura 12. Gráfico de entropia de aminoácidos obtidos a partir das sequências do gene *msa-2c*.

5.8.4. Análise de haplótipos baseada nos genes *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* detectados no Pantanal sul matogrossense

Entre as 14 sequências do gene *msa-2b* analisadas, foram identificados 14 haplótipos apresentando $\pi = 0,1735$, $D_h = 1,000$ e $K = 100,1318$. Por outro lado, das 13 sequências do gene *msa-2c* analisadas, foram identificados 11 haplótipos apresentando $\pi = 0,03220$, $D_h = 0,9794$ e $K = 20,0256$ (**Tabela 7**). Somente os haplótipos número #5 e #7 foram formados por duas sequências, sendo o #5 formado pelos clones 2 e 3 da amostra #139, e o #7 formado pelos 2 e 3 da amostra #138.

Tabela 7. Polimorfismo e diversidade genética entre as sequências *msa-2b* e *msa-2c* de *B. bovis* detectada em bovinos amostrados no Pantanal.

Gene	(pb)	N	VS	GC%	h	Dh (média ± DP)	π (média ± DP)	K
<i>msa- 2b</i>	938	14	255	37,2	14	1,000 ± 0,027	0,1735 ± 0,0154	100,1318
<i>msa- 2c</i>	916	11	51	38,7	11	0,9794 ± 0,039	0,03220 ± 0,0028	20,0256

N, número de sequências analisadas; VS, número de sítios variáveis; GC, conteúdo G + C; h, número de haplótipos; Dh, diversidade de haplótipos; DP, desvio padrão; π , diversidade de nucleotídeos (por local); K, número de diferença de nucleotídeos.

5.8.5. Análise de haplótipos baseada nos genes *msa-2b* e *msa-2c* de *Babesia bovis* detectados no Brasil e no mundo

Quando alinhadas às sequências previamente detectadas no Brasil e no mundo, as sequências de *B. bovis* obtidas no Pantanal brasileiro se apresentaram altamente diversas.

A análise de haplótipos baseada em 33 sequências de *msa-2b* de *B. bovis* detectadas no mundo, incluindo as 14 sequências obtidas no presente estudo, mostrou a presença de 25 diferentes haplótipos, apresentando $\pi = 0,18027$, Dh= 0,9773 e K= 83,46 (**Tabela 8**). Somente os haplótipos #1, #8, #11, #14 e #20 foram compostos por mais de uma sequência, sendo o haplótipo #1 composto pelas sequências AB819788 e LC004328 detectadas nas Filipinas e Vietnã, o haplótipo #8 composto por 3 sequências detectadas no Pantanal (sendo estas, *clone 1* da amostra #4, *clone 2* da amostra #4 e *clone 2* da amostra #168), o haplótipo #11 composto pelas sequências DQ173958 e DQ173953 da Austrália, haplótipo #14 formado pelas sequências *clone 3* da amostra #190 e AB745708 do Pantanal e Tailândia, respectivamente, e o haplótipo #20 formado pelas sequências KX160815, KU522560, KX420675 e *clone 3* da amostra 168, oriundos de Taiaçu- SP e Pantanal-MS.

A análise de haplótipos baseada em 37 sequências de *msa-2c* de *B. bovis* detectadas no mundo, incluindo as 13 sequências obtidas no presente estudo, mostrou a presença de 31 diferentes haplótipos apresentando $\pi = 0,03294$, Dh= 0,9880 e K= 19,76. Quatro haplótipos foram compostos por mais de uma sequência.

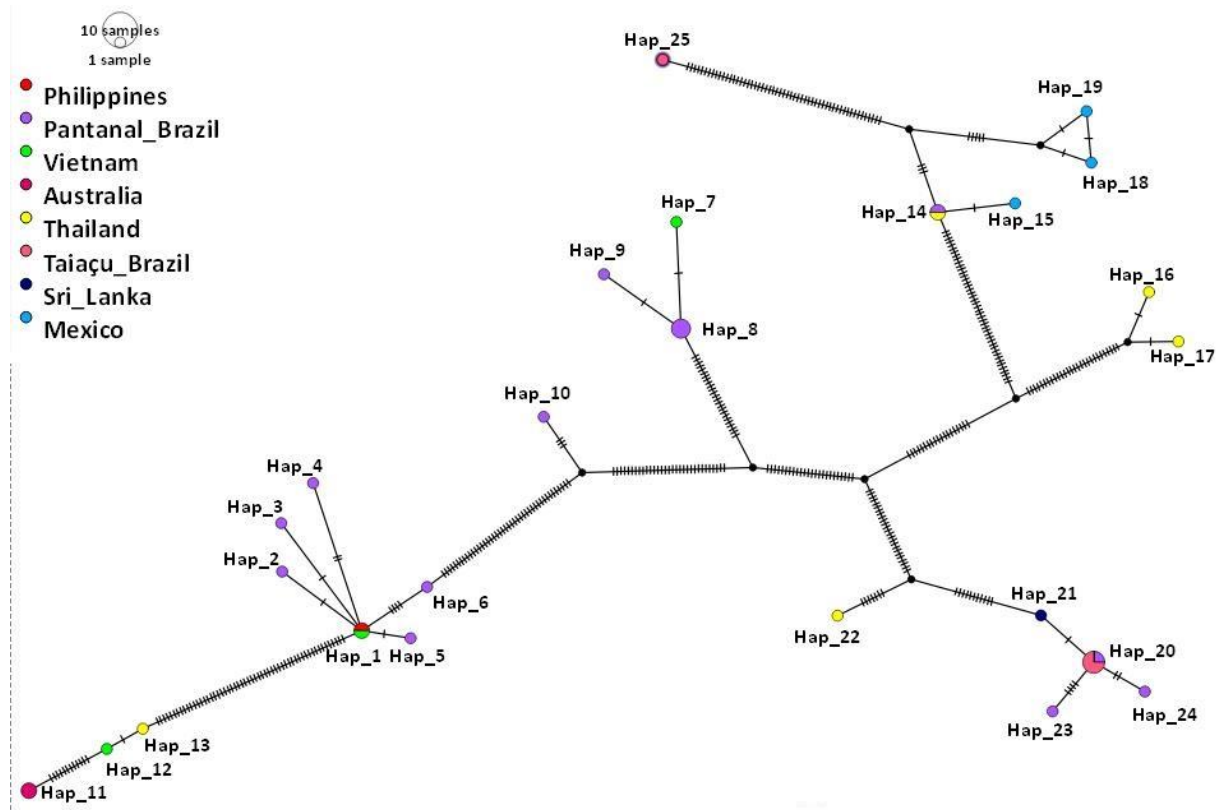
O haplótipo #1 compreendeu as sequências LC004362 e LC004348, detectadas no Vietnã. O haplótipo #9 compreendeu as sequências AK441598, KX420672 e HM352731, as quais foram detectadas no Texas (USA) Taiaçu (SP, Brasil) e Mato Grosso do Sul (Brasil), respectivamente. O haplótipo #16 foi composto pelas sequências AB787588 do Sri Lanka e duas sequências detectadas no Pantanal (*clone 2* da amostra #139 e *clone 3* da amostra #139), e o haplótipo #21 foi composto por duas sequências detectadas no Pantanal, *clones 2* e *3* da amostra #138.

As redes de haplótipos para ambos os genes obtidas a partir da ferramenta TCS Network podem ser observadas nas **Figuras 13 e 14**.

Tabela 8. Polimorfismo e diversidade genética entre as sequências *msa-2b* e *msa-2c* obtidas no Pantanal e as demais previamente descritas no Brasil e no mundo.

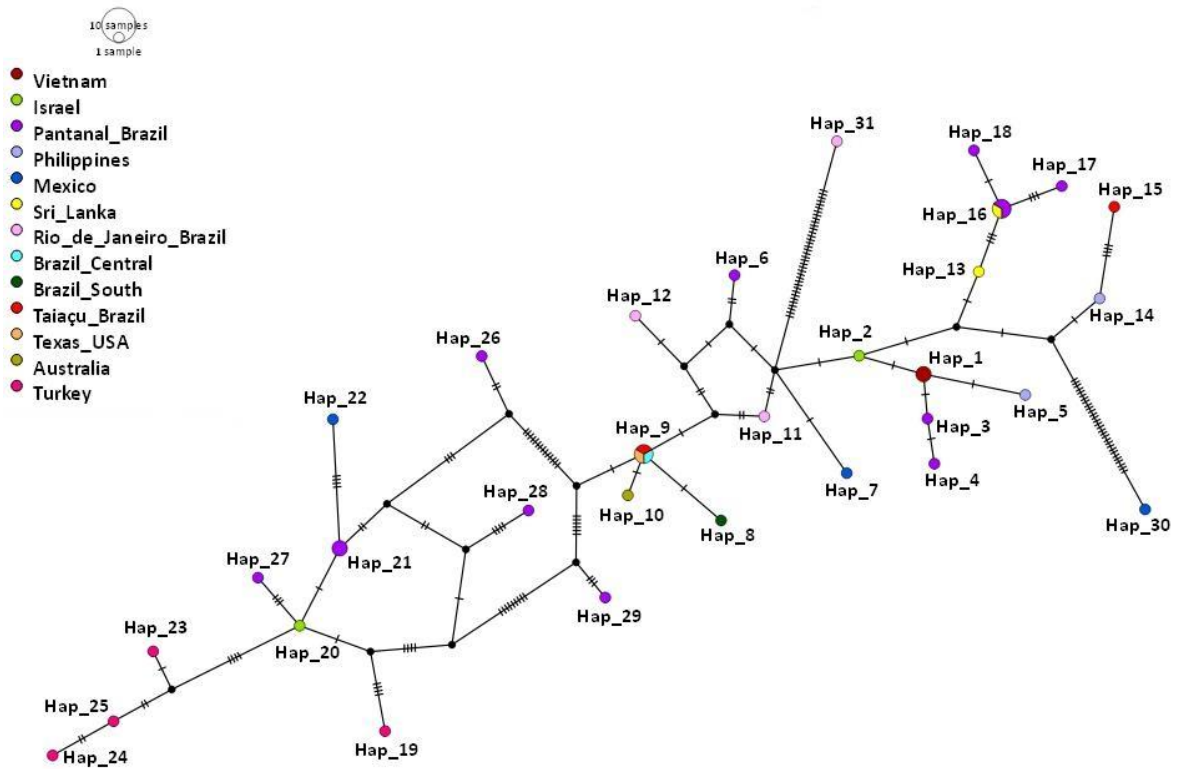
Sequências do Brasil e do mundo								
Gene	(pb)	N	VS	GC%	h	Dh (média ± DP)	π (média ± DP)	K
<i>msa- 2b</i>	979	33	244	36,9	25	0,9773 ± 0,015	0,18027 ± 0,0062	83,46
<i>msa- 2c</i>	1005	37	117	38,9	31	0,9880 ± 0,010	0,03294 ± 0,00377	19,76

N, número de sequências analisadas; VS, número de sítios variáveis; GC, conteúdo G + C; h, número de haplótipos; Dh, diversidade de haplótipos; DP, desvio padrão; π , diversidade de nucleotídeos (por local); K, número de diferença de nucleotídeos.



(Os pontos pretos na rede representam os vetores medianos; Tracejados entre um haplótipo e outro representam os eventos mutacionais).

Figura 13. TCS network dos haplótipos baseados no gene *msa-2b* de *Babesia bovis* de seqüências detectadas no Brasil e no mundo.



(Os pontos pretos na rede representam os vetores medianos; Tracejados entre um haplótipo e outro representam os eventos mutacionais).

Figura 14. TCS network dos haplótipos baseados no gene *msa-2c* de *Babesia bovis* de sequências detectadas no mundo.

6. Discussão

Os resultados obtidos no teste sorológico iELISA mostraram uma exposição moderada a *B. bovis* (61,25%) e *B. bigemina* (51,25%) dos bovinos amostrados na região da Nhecolândia, no Pantanal brasileiro. Resultados semelhantes (63,7%) foram encontrados por Barros et al. (2005) no município Uauá, na Bahia, nordeste do Brasil em bovinos de corte. Para *B. bigemina*, os resultados encontrados no Pantanal foram maiores do que os reportados por Costa et al. (2013) que mostraram 9,5% (45/509) de vacas de corte positivas nos ensaios de RIFI para *B. bigemina*, no estado da Paraíba e menores que os reportados por Trindade et al. (2010) que encontraram 90,5% (459/506) bezerros de corte positivos nos ensaios de iELISA para *B. bigemina* em Araguaína, no estado do Tocantins.

Nos trabalhos acima mencionados quanto à soroprevalência de *B. bovis*, as regiões de amostragem foram consideradas como sendo de instabilidade enzoótica segundo definição de Mahoney (1974), que estimou que se 75% dos bezerros entre 6 e 9 meses de idade de uma determinada localidade mostrarem-se soropositivos para *B. bovis*, a enfermidade clínica terá baixa incidência na região, a qual passa a ser caracterizada como uma área de estabilidade endêmica para *B. bovis* e *B. bigemina*. Tendo em vista que 72,5% e 68% dos bezerros amostrados no presente estudo mostraram-se soropositivos para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, a área estudada no Pantanal sul matogrossense poderia ser classificada como sendo enzooticamente instável. Entretanto, a região estudada no presente trabalho não corresponde a uma área onde os bovinos apresentam sinais clínicos decorrentes da babesiose bovina. Além disso, não podemos afirmar que os bezerros soropositivos para babesiose bovina tinham idade entre 6 e 9 meses.

Jonsson et al. (2012) consideram que o conceito de estabilidade endêmica aplicado à epidemiologia da babesiose bovina proposto por Mahoney (1974) possa não ser de grande utilidade para o planejamento e controle da enfermidade em campo, já que o manejo aplicado para manter uma taxa de infecção a cada ano em cada grupo bovino e com avaliação periódica da soroprevalência pode ser impraticável, além de ser facilmente afetado por alterações climáticas, modificações genótípicas do hospedeiro, entre outros fatores. Ademais, sugere-se ainda que os limiares propostos por Mahoney não devam ser utilizados em sistemas diferentes

sem dados de estudos específicos, já que este foi proposto em um estudo epidemiológico específico para um único sistema hospedeiro-carrapato-patógeno.

A análise estatística pelo teste Qui Quadrado mostrou diferença significativa ($P < 0,05$) entre a frequência de bezerros e vacas soropositivos para os agentes sob estudo, demonstrando que bezerros apresentam maior soropositividade quando comparados às vacas. Sugerimos que isso ocorra porque os bezerros ainda não possuem o sistema imune tão estabelecido quanto às vacas e estejam, por isso, mais expostos à infestação pelo carrapato vetor de *B. bovis*.

O presente estudo mostrou uma baixa ocorrência molecular de *B. bovis* em bovinos amostrados no Pantanal brasileiro. Dos 400 animais amostrados, 4,5% (18) mostraram-se positivos no ensaio molecular para *B. bovis* baseado no gene *sbp-2* (Proteína de corpo esférico 2). A porcentagem de animais positivos no presente estudo foi similar à reportada em rebanho de búfalos d'água, na Amazônia [3,6% (11/308)] (Silveira et al., 2016) e inferior à reportada em bovinos de leite [33,2% (67/202)] amostrados em Parnaíba, Piauí (Souza et al., 2013), ambas realizadas a partir de cPCR, baseada no gene 18S rRNA. Embora o método de nPCR utilizado seja considerado de alta sensibilidade (Mosqueda et al., 2012) para a detecção de *B. bovis*, a baixa ocorrência molecular encontrada no presente estudo pode ser atribuída à uma parasitemia muito abaixo do limiar de detecção da técnica utilizada. Além disso, cabe ressaltar que as amostras de sangue deste estudo foram colhidas das veias caudal e jugular dos bovinos. Sabe-se que *B. bovis* tem predileção por capilares viscerais e sistema nervoso (Florin-Christensen et al., 2014; Kakoma & Melhorn, 1994), o que diminui ainda mais a probabilidade de detecção do agente sob estudo. Ademais, o gado zebuino é caracterizado pela rusticidade e maior resistência aos ectoparasitas (Hansen, 2004). Embora não se saiba ao certo a influência da raça do bovino sobre a infecção causada por *B. bovis*, estudos prévios sugerem que, seguindo o mesmo padrão de resistência ao carrapato *R. microplus*, animais zebuínos sejam mais resistentes à infecção por este piroplasmídeo que os taurinos (Bock et al., 1997; Bock et al., 1999; Bilhassi et al., 2014).

No presente estudo, analisamos os genes que codificam as proteínas de superfície de merozoítos *msa-2b* e *msa-2c* em uma população de bovinos amostrada no Pantanal brasileiro, a fim de determinar a diversidade genética de *B.*

bovis nesta região. Nossos resultados mostraram que a população de *B. bovis* neste local é altamente diversa, contando com a presença de mais de um genótipo distinto no mesmo animal. Estudos prévios indicam o uso da família de genes MSA's como marcadores adequados de diversidade genética para *B. bovis* (Berens et al., 2005; LeRoith et al., 2005; Borgonio et al., 2008; Genis et al., 2008; Genis et al., 2009, Simking et al. 2013). Dez amostras apresentaram resultado discordante entre os ensaios de PCR de triagem e para os genes *msa-2b* e *msa-2c*, sendo que quatro e seis amostras positivas na triagem se mostraram negativas nos ensaios de PCR para *msa-2b* e *msa-2c*, respectivamente. O ensaio PCR de triagem usado para detectar DNA de *B. bovis* nas amostras foi baseado no gene *sbp-2* (Spherical body protein 2) (AbouLaila et al., 2010) que apresenta, no genoma de *B. bovis*, 12 cópias truncadas correspondendo à extremidade 5' e uma cópia completa (Brayton et al., 2007, AbouLaila et al., 2010). A amplificação do referido gene confere, portanto, maior sensibilidade quando comparado àqueles baseados nos genes que codificam as proteínas de superfície de merozoíto, que são de cópia única no genoma de *B. bovis*. Ademais, a técnica de nested PCR utilizada para o ensaio de triagem, a qual é baseada em duas amplificações sucessivas mostra um grau maior de sensibilidade e especificidade do que a cPCR para os genes de MSA's realizadas com somente uma reação.

Do total de 18 bezerros positivos na nPCR para *B. bovis*, 8 (44,4%) mostraram-se soronegativos pelo iELISA. Sugerimos que os bezerros positivos na nPCR e sorologicamente negativos possivelmente se encontravam na fase aguda da infecção por *B. bovis*, apresentando um nível de anticorpos IgG abaixo do limiar de detecção da técnica empregada. Em contrapartida, 134 (67%) bezerros e 101 (50,5%) vacas sororeagentes para *B. bovis* e negativos na nPCR estariam supostamente na fase crônica da babesiose, onde o número de hemoparasitas circulantes está abaixo do limiar de detecção pelo ensaio molecular. Além disso, deve-se considerar que amostras de sangue foram colhidas da veia caudal os animais. Conforme já mencionado, *B. bovis* apresenta tropismo por capilares viscerais. Esses resultados salientam a importância de aplicar mais de um método de detecção para um diagnóstico definitivo ou levantamento de dados epidemiológicos.

De modo geral, em ambas as análises filogenéticas, todas as sequências MSA's detectadas em gado de corte no Pantanal se distribuíram em diversos clados diferentes, assim como recentemente demonstrado por Matos et al. (2017) utilizando *msa-2b* como marcadores em amostras de bovinos de leite no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. As sequências detectadas no presente estudo agruparam-se com sequências de outros países, sugerindo que nenhum dos genótipos encontrados neste estudo é exclusivo do Brasil e que as sequências de *msa-2b* e *msa-2c* de *B. bovis* que circulam na região amostrada compartilham caracteres genéticos com todas as sequências previamente detectadas no mundo. O posicionamento filogenético heterogêneo das sequências detectadas no Pantanal é suportado pelas análises de identidade entre sequências, a qual mostrou uma variação de 1,8 a 33,9% e 0,6 a 14,3% de divergência entre os clones amostrados para *msa-2b* e *msa-2c*, respectivamente. Ademais, tal achado é corroborado pelo alto valor de diversidade de nucleotídeos por sítio, especialmente para o gene *msa-2b*, ($\pi=0,1735$).

Na filogenia para *msa-2b* pôde-se constatar que a maioria das sequências detectadas neste estudo se alocaram nos cluster #1 e #2, sugerindo um provável genótipo predominante, sendo que cada um destes clados foi composto por cinco sequências do Pantanal juntamente com sequências do Vietnã e Filipinas. Contrariamente, na filogenia para *msa-2c*, em 3 cluster (#3, #6 e #9) foram alocadas somente uma sequência detectada no Pantanal, as quais posicionaram-se sozinhas nos cluster #3 e #9. No clado #6, uma sequência detectada no Pantanal agrupou-se com sequências previamente detectadas no Brasil, Texas (EUA) e Austrália. Tais achados sinalizam que os genótipos circulantes entre estes países e a região estudada mostram proximidade filogenética. Embora *msa-2c* tenha sido considerado uma região gênica conservada quando comparada com as outras *msa* em estudos prévios conduzidos no Brasil (Ramos et al., 2012; Matos et al., 2017), alta diversidade genética foi relatada entre tais sequências de amostras de *B. bovis* na Austrália (Berens et al., 2005), Filipinas (Tattiyapong et al., 2014) e Israel (Molad et al., 2014), evidenciando que a diversidade genética entre as populações de *B. bovis* está sujeita à variação de acordo com as regiões geográficas.

Por outro lado, as sequências *msa-2b* australianas, as quais incluem o isolado vacinal T de *B. bovis*, foram alocadas no cluster #6, separadamente de todas as sequências detectadas no Pantanal, sugerindo que os genótipos de *msa-2b* previamente detectados na Austrália mostram relação filogenética mais distante quando comparados aos genótipos detectados no presente estudo, evidenciando um obstáculo na produção de uma única vacina que se aplique globalmente. Comparando a análise filogenética e a rede de haplótipos composta pelas mesmas sequências, pode-se observar que os clados da filogenia baseada no gene *msa-2b* foram compostos pelos seguintes haplótipos: cluster 1 – (haplótipos #1, #2, #3, #4, #5 e #6), cluster 2 – (haplótipos #7, #8, #9 e #10), cluster 3 – (haplótipos #14, #15, #16, #17, #18, #19 e #25), cluster 4 – (haplótipos #20, #21, #22, #23 e #24), cluster 5 – (haplótipos #12 e #13) e cluster 6 – (haplótipo #11). Em suma, o posicionamento espacial da rede haplotípica suporta os dados apresentados na filogenia, uma vez que é possível observar a proximidade dos mesmos grupos que aparentam proximidade filogenética, bem como constatar a dimensão dos eventos mutacionais que as separam. O grupo de sequências do Pantanal se distribuiu por toda a rede e mostraram-se distantes dos haplótipos #11, #12 e #13, os quais foram posicionados em clados com ausência de sequências do Pantanal no cladograma. Ainda é possível constatar que os haplótipos #2, #3, #4, #5 e #6, formados por sequências do presente estudo, possivelmente foram originados diretamente a partir do haplótipo #1 e apresentam entre si poucos eventos mutacionais. Todos os demais haplótipos constituídos por sequências do Pantanal tiveram origem a partir dos vetores medianos (apresentados na rede haplotípica como pontos pretos), os quais representam haplótipos intermediários que existiram na rota evolutiva originando os atuais, mas que não estão contemplados na amostragem.

Com relação ao gene *msa-2c*, os clados da filogenia foram compostos pelos seguintes haplótipos: cluster 1 – (haplótipos #1, #2, #3, #4 e #5), cluster 2 – (haplótipos #13, #14, #16, #17, #18 e #30), cluster 3 – (haplótipo #6), cluster 4 – (haplótipo #7), cluster 5 – (haplótipo #11), cluster 6 – (haplótipos #8, #9, #10 e #29), cluster 7 – (haplótipos #22, #23, #24, #25, #26 e #28), cluster 9 – (haplótipo 27). Similarmente ao observado para *msa-2b*, o posicionamento espacial na rede haplotípica corroborou os dados apresentados na filogenia, haja vista que foi

possível observar proximidade dos mesmos grupos que se relacionaram filogeneticamente, bem como permite inferir a dimensão dos eventos mutacionais que os separam. Entretanto, diferentemente do observado na rede de *msa-2b*, verificou-se uma ocorrência muito menor de eventos mutacionais separando as nossas sequências das previamente detectadas no Brasil e no mundo em *msa-2c*, uma vez que tais eventos ficaram quase que exclusivamente restritos aos haplótipos #30 e #31. O haplótipo #30 representa uma sequência detectada no México (EF640967), a qual foi posicionada no clado #2 da filogenia, juntamente com sequências do Pantanal. No entanto, ainda que no mesmo clado, o haplótipo #30 posicionou-se separadamente das sequências detectadas no presente estudo. Considerando a maior abundância de sequências *msa-2c* detectadas no México nas análises e que estas se encontraram bem distribuídas, tanto no cladograma quanto na rede, infere-se que também haja alta diversidade de genótipos na população de *B. bovis* circulantes em bovinos no México. Corroborando o posicionamento filogenético, os haplótipos *msa-2c* do Pantanal mostraram-se bem distribuídos por toda a rede. Entretanto, além de se constatarem menor número de eventos mutacionais entre as sequências *msa-2c* do Pantanal, maior número de haplótipos foram originados diretamente de outros amostrados, sem presença de vetores medianos, como fora verificado na rede haplotípica de *msa-2b*. Desta forma, infere-se que os haplótipos #3 e #4 possam ter sido originados do haplótipo #1, constituído por sequências de *B. bovis* do Vietnã. O haplótipo #27 parece ter sido originado do haplótipo #20, constituído por uma sequência de Israel. O haplótipo #16, composto por sequências do Pantanal e Sri Lanka, parece ter se dividido para originar, em uma direção, os haplótipos #17 e #18 provenientes do Pantanal, e, na outra direção, mais um haplótipo do Sri Lanka. Estes dados de alta distribuição espacial são ainda suportados pelas análises de polimorfismo e diversidade entre as sequências do Pantanal, que mostraram a presença de 14 haplótipos entre os 14 clones de *msa-2b*, com $D_h = 1$, e 11 haplótipos entre as 13 sequências de *msa-2c*, com $D_h = 0,9794$.

Adicionalmente, a análise das sequências de aminoácidos traduzidas a partir das sequências nucleotídicas originais ratificam o alto polimorfismo, mostrando 78 picos de entropia atingindo até 1,53 em *msa-2b*, e 44 picos atingindo até 1,09 em *msa-2c*. A alta diversidade genética dos genes de MSAs constatada nos diferentes

genótipos circulantes no Brasil e no mundo (Genis et al., 2009; Lau et al., 2010; Altangerel et al., 2012; Simking et al., 2013; Sivakumar et al., 2013; Tattiyapong et al., 2014; Molad et al., 2014; Nagano et al., 2013; Matos et al, 2017) pode estar relacionada à evasão de *B. bovis* da resposta imune do hospedeiro (Altangerel et al., 2014). A presença dessa heterogeneidade genética pode resultar em variações antigênicas entre as populações de *B. bovis*, limitando o uso de tais antígenos como vacinas recombinantes ou ainda podendo estar relacionada à falha de proteção dos isolados vacinais, como já apontado por Berens et al. (2005) e LeRoith et al. (2005).

Ressaltamos a importância de futuros estudos em outras regiões do Brasil a fim de analisar o efeito de tal diversidade genética no perfil imunológico do gado infectado, bem como acrescentar dados à literatura científica relacionada à diversidade genética de *B. bovis* no Brasil e no mundo.

7. Conclusões

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

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

8. Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Callow LL (1984) Piroplasms. In: **Animal Health in Australia**, Protozoal and Rickettsial Diseases Canberra: Australian Bureau of Animal Health 5: 121–160.

Callow LL, Rogers RJ, De Vos AJ (1993) Tick-borne diseases: cattle-pathology and serology. In: Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases 1–16.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Osaki SC, Vidotto O, Marana ERM, Vidotto MC, Yoshihara E, Pacheco RC, Igarashi M, Minho AP (2002) Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça Nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária** 11:77-83.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Santos HQ, Linhares GFC, Madruga CR (2001) Estudo da prevalência de anticorpos Anti-*babesia bovis* e Anti-*babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e Elisa. **Ciência Animal Brasileiro** 2:133–137

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Shaw MK (1995). Mobilization of intrasporozoite Ca²⁺ is essential for *Theileria parva* sporozoite invasion of bovine lymphocytes. **European Journal of Cell Biology** 68: 78–87.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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