

# Estudo da infecção por *Babesia bigemina* em bovinos de corte e em carrapatos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Pecuária Sudeste  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 12***

## **Estudo da infecção por *Babesia bigemina* em bovinos de corte e em carrapatos**

Márcia Cristina de Sena Oliveira<sup>1</sup>

Henrique Nunes de Oliveira<sup>2</sup>

Luciana Correia de Almeida Regitano<sup>1</sup>

Maurício Mello de Alencar<sup>1</sup>

Thalita Athiê Néo<sup>3</sup>

Ana Mary da Silva<sup>4</sup>

## **Embrapa Pecuária Sudeste**

Rod. Washington Luiz, km 234

Caixa Postal 339

Fone: (16) 3361-5611

Fax: (16) 3361-5754

Home page: [www.cppse.embrapa.br](http://www.cppse.embrapa.br)

E-mail: [sac@cppse.embrapa.br](mailto:sac@cppse.embrapa.br)

## **Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Alberto C. de Campos Bernardi

Secretário-Executivo: Edison Beno Pott

Membros: Carlos Eduardo da Silva Santos, Maria Cristina C. Brito,

Odo Primavesi, Sônia Borges de Alencar

Revisor de texto: Edison Beno Pott

Normalização bibliográfica: Sônia Borges de Alencar

Foto da capa: Márcia Cristina de Sena Oliveira

Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito

## **1ª edição on-line (2007)**

### **Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP Embrapa Pecuária Sudeste**

---

Márcia Cristina de Sena Oliveira

Estudo da infecção *Babesia bigemina* em bovinos de corte e carrapatos [Recurso eletrônico] / Márcia Cristina de Sena Oliveira [et al.]. — São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

Modo de Acesso: <<http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacaogratis/boletim-de-pesquisa-desenvolvimento/boletim12.pdf/view>>

Título da página da Web (Acesso em 27 de fevereiro de 2008)

26 p. — (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Pecuária Sudeste, 12).

ISSN 1981-2078

1. Gado de corte – Infecção - *Babesia bigemina* – Bovinos – Carrapatos. I. Oliveira, Márcia C. de Sena. II. Oliveira, Henrique Nunes. III. Regitano, Luciana Correia de Almeida. IV. Alencar, Maurício Mello de. V. Néó, Thalita Athiê. VI. Silva, Ana Mary. VII. Título. VIII. Série.

---

CDD 636.089969

© Embrapa 2007

# Sumário

<b>Introdução</b> .....	8
<b>Objetivos</b> .....	10
<b>Material e Métodos</b> .....	10
<b>Resultados</b> .....	15
<b>Discussão</b> .....	18
<b>Conclusão</b> .....	22
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	22

# Estudo da infecção por *Babesia bigemina* em bovinos de corte e em carrapatos

---

Márcia Cristina de Sena Oliveira<sup>1</sup>

Henrique Nunes de Oliveira<sup>2</sup>

Luciana Correia de Almeida Regitano<sup>1</sup>

Maurício Mello de Alencar<sup>1</sup>

Thalita Athiê Néó<sup>3</sup>

Ana Mary da Silva<sup>4</sup>

## Resumo

A infecção por *Babesia bigemina* foi estudada em bovinos de corte de quatro grupos genéticos e em fêmeas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Amostras de sangue dos bovinos e das fêmeas ingurgitadas de carrapatos foram colhidas de 15 vacas e de 15 bezerros de cada um dos seguintes grupos genéticos: Nelore (NE), ½ Angus + ½ Nelore (AN), ½ Canchim + ½ Nelore (CN), e ½ Simental + ½ Nelore (SN). Exames microscópicos dos esfregaços de sangue revelaram que merozoítas de *B. bigemina* (6/60 - 10%) foram detectados somente em amostras colhidas em bezerros e, do mesmo modo, esporocinetos de *Babesia* spp. (9/549 - 1,6%) foram detectados apenas em amostras de hemolinfa de carrapatos que se ingurgitaram nesses animais. Métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados para amplificar especificamente o DNA de *B. bigemina*. Os resultados mostraram 100% de infecção por esse protozoário em bezerros e em vacas, independentemente do

---

<sup>1</sup> Pesquisadores(as) da Embrapa Pecuária Sudeste.

<sup>2</sup> Professor da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Botucatu, SP.

<sup>3</sup> Aluna do Centro Universitário de Araraquara, Araraquara, SP; bolsista do PIBIC do CNPq.

<sup>4</sup> Aluna da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

grupo genético. Infecção nos carrapatos foi detectada por nested PCR (nPCR) e pôde-se verificar novamente que a frequência de *B. bigemina* foi maior ( $P < 0,01$ ) em fêmeas de carrapatos colhidas dos bezerros (134/549 - 24,4%) do que naquelas colhidas de vacas (52/553 - 9,4%). A frequência de *B. bigemina* foi similar nos carrapatos colhidos dos animais dos quatro grupos genéticos ( $P > 0,05$ ). A taxa de eclosão das larvas foi significativamente inferior ( $P < 0,01$ ) naquelas oriundas de teleóginas com reação positiva para *B. bigemina* (53,5%) do que naquelas com reação negativa (65,9%). Não houve diferença na taxa de eclosão das larvas oriundas de fêmeas colhidas nos quatro grupos genéticos.

Termos para indexação: *Babesioses*, bovinos, grupo genético.

# Study of *Babesia bigemina* infection in beef cattle and ticks.

---

## Abstract

*Babesia bigemina* infections were investigated in four genetic groups of beef cattle and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged female ticks. Blood samples and engorged female ticks were collected from 15 cows and 15 calves of each of the following genetic groups: Nelore (NE), ½ Angus + ½ Nelore (NA), ½ Canchim + ½ Nelore (CN) and ½ Simmental + ½ Nelore (SN). Microscopic examination of blood smears and tick hemolymph revealed that merozoites of *B. bigemina* (6/60 - 10%) as well as kinetes of *Babesia* spp. (9/549 - 1,6%) were only detected in samples (blood and ticks, respectively) collected from calves. Polymerase chain reaction (PCR) based methods using primers for specific detection of *B. bigemina* revealed 100% of infection in both calves and cows, regardless the genetic group. Tick infection was detected by nested PCR amplifications showing that the frequency of *B. bigemina* was higher ( $P < 0.01$ ) in female ticks collected from calves (134/549 - 24,4%) than in those collected from cows (52/553 - 9,4%). The frequency of *B. bigemina* was similar in ticks collected from animals of the four genetic groups ( $P > 0.05$ ). The larval hatching rates were significantly lower for engorged females ticks with positive reaction for *B. bigemina* (53.5%) than those with negative reaction (65.9%). There was no difference between larval hatching rate of females ticks collected from the four genetic groups.

Indexing terms: *Babesiosis*, bovine, genetic group.

## Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e os agentes da tristeza parasitária bovina (*Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*) são considerados fatores limitantes para o desenvolvimento adequado da pecuária na América Latina (Nari, 1995). No Brasil, o carrapato *R. (B.) microplus* encontra-se amplamente difundido (Lima et al., 2000) e sua erradicação é improvável. Soma-se a isso o fato de que métodos efetivos de imunização contra os agentes da tristeza parasitária bovina não estão ainda disponíveis e seu desenvolvimento depende de altos investimentos em pesquisa (Palmer & McElwain, 1995). Os grandes prejuízos gerados pelas infestações por carrapatos e o crescente aumento da resistência aos acaricidas têm levado à utilização de bovinos mais resistentes a parasitoses, como alternativa para a redução de prejuízos. A maior resistência dos animais *Bos indicus* ao carrapato tem sido relatada (Jonsson, 2006). Em experimentos em que se usaram infestações artificiais com larvas de *R. (B.) microplus*, observaram-se taxas de recuperação de fêmeas adultas de carrapato significativamente inferiores nas raças indianas, quando comparadas às de *Bos taurus* (Jonsson, 2006). Com relação às babesioses, Bock et al. (1997, 1999) verificaram que os animais *Bos indicus* também apresentaram maior resistência inata quando comparados aos *Bos taurus*, em desafios feitos com cepas de campo de *B. bovis* e *B. bigemina*.



A estabilidade endêmica (Mahoney & Ross, 1972) é um conceito epidemiológico amplamente conhecido. Os sistemas de criação classificados como endêmicos estáveis se caracterizam por apresentar taxa de transmissão de babesias suficiente para que haja infecção da grande maioria dos bezerros antes da perda da imunidade passiva. Os animais são constantemente inoculados e com isso desenvolvem forte imunidade a esses parasitas. A ruptura desse processo leva à condição de instabilidade, quando os animais deixam de ser inoculados e a redução de imunidade predispõe a graves surtos da doença.

Guglielmone et al. (1989) verificaram que o percentual de fêmeas de *R. (B.) microplus* que se infectam ao se alimentar em *Bos indicus* é significativamente inferior ao de carrapatos que se alimentaram em *Bos taurus*. Se a criação de bovinos mais resistentes poderia levar à redução significativa na taxa de inoculação de *babésias*, a ponto de converter uma situação de estabilidade endêmica em instabilidade, é uma hipótese levantada por Guglielmone (1995). Atualmente, o conhecimento da epidemiologia das babesioses e a interação entre os hospedeiros e os vetores têm papel fundamental na adoção de medidas de controle mais adequadas, que poderão reduzir os prejuízos causados por essas parasitoses.

Em estudos prévios, com animais mestiços leiteiros, foi possível verificar que na região de São Carlos, SP, há estabilidade endêmica das babesioses (Oliveira et al., 2005; Oliveira-Sequeira et al., 2005); os bezerros se infectam ainda

nos primeiros meses de vida. Em continuação a esses estudos epidemiológicos, o presente trabalho foi desenvolvido a fim de avaliar as possíveis implicações da utilização de bovinos de corte de diferentes genótipos na epidemiologia das babesioses.

## Objetivos

1) Determinar a prevalência de *B. bigemina* em bovinos de corte de duas faixas etárias, puros *Bos indicus* e cruzados, e em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* colhidas desses animais.

2) Verificar a influência do grupo genético do hospedeiro bovino no desenvolvimento da progênie dos carrapatos.

## Material e métodos

### Animais

Amostras de sangue e de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* foram colhidas em 120 bovinos de corte, de quatro grupos genéticos, compostos de quinze vacas com idades acima de três anos e de quinze bezerros com idades entre oito e doze meses. Um grupo era de animais puros *Bos indicus* da raça Nelore (NE) e os outros três eram de animais cruzados:  $\frac{1}{2}$  Angus +  $\frac{1}{2}$  Nelore (AN),  $\frac{1}{2}$  Canchim +  $\frac{1}{2}$  Nelore (CN) e  $\frac{1}{2}$  Simental +  $\frac{1}{2}$  Nelore (SN). Esses animais pertenciam ao rebanho experimental da Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos, SP. Essa unidade de pesquisa está localizada em região tropical de altitude, sob as coordenadas geográficas de 22°01'

sul e 47°53' oeste. Os animais foram mantidos em pastagens naturalmente infestadas pelo carrapato *R. (B.) microplus*. Antes de iniciar a colheita das amostras, os animais permaneceram sem tratamento carrapaticida por 40 dias, a fim de viabilizar a obtenção de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* e de evitar o efeito negativo do medicamento sobre a progênie dos carrapatos.

### **Colheita das amostras**

Amostras de sangue e de carrapatos foram colhidas em fevereiro e em março de 2004. De cada animal experimental foi colhida uma amostra de sangue da jugular, para extração de DNA. Para confecção de esfregaços, foram colhidas amostras de sangue dos capilares auriculares. Ao mesmo tempo, foram colhidas as fêmeas de carrapatos com tamanho padrão (= 4,5 mm; Warthon & Utech, 1970), até o máximo de dez carrapatos por animal.

### **Processamento das amostras de sangue**

Os esfregaços sangüíneos foram corados com Giemsa para pesquisa de merozoítas de *B. bigemina* e para determinação da parasitemia, utilizando-se microscópio óptico, com aumento de 1000X. A parasitemia foi expressa em termos de porcentagem de eritrócitos parasitados. O DNA das amostras de sangue foi extraído de uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$ , utilizando-se o *kit* GFX™ (*Genomic blood DNA purification kit - GE Health Care*), de acordo com as instruções do fabricante, para o volume final de 100  $\mu\text{L}$ .

### **Processamento das amostras de *R. (B.) microplus***

As fêmeas de *R. (B.) microplus* foram incubadas individualmente em estufas em temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e 85% – 86% de umidade relativa, para a postura. No décimo oitavo dia de incubação, de cada fêmea de carrapato foi colhida uma amostra de hemolinfa em lâmina de vidro (Burgdorfer, 1970). Os esporocinetos de *B. bigemina* foram contados em quinze campos microscópicos e as contagens foram expressas em termos de média do número de esporocinetos por campo. Após a colheita de hemolinfa, as fêmeas foram colocadas individualmente em microtubos e mantidas em *freezer* a  $-80^\circ\text{C}$ , até o momento da extração de DNA.

As massas de ovos produzidas entre o sexto e o décimo quinto dia de postura (Mahoney & Mirre, 1971) foram utilizadas para a determinação da taxa de eclosão das larvas dos carrapatos. As alíquotas de ovos foram preparadas com o auxílio de uma espátula e contadas em microscópio estereoscópico, de modo a conter cerca de 100 ovos. As alíquotas originárias de cada fêmea foram colocadas individualmente em envelopes de papel de seda e identificadas. Essas amostras foram incubadas em estufa por 40 dias a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e 85% – 86% de umidade relativa. Após a incubação, os envelopes foram mergulhados em álcool 70° e as larvas e os ovos foram contados com o auxílio de microscópio estereoscópico. A taxa de eclosão das larvas foi calculada e expressa em termos da porcentagem de ovos que originaram larvas.

Para extração de DNA dos carrapatos, cada amostra congelada foi macerada individualmente em um microtubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 10  $\mu$ L de tampão lisosima (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA e 5% de triton X-100, com pH 8,5). Foram adicionados 20  $\mu$ L de solução de proteinase K (20 mg/mL) e o material foi então incubado a 56°C por 15h. Após a incubação, a extração de DNA foi feita usando o *kit* GFX™.

### Reação em cadeia da polimerase (PCR) e *nested* PCR (nPCR) das amostras de sangue e dos carrapatos

O DNA de *B. bigemina* foi amplificado por PCR e/ou nPCR, empregando-se os *primers* internos e externos desenhados por Figueroa et al. (1993):

Seqüência	Primer	Oligonucleotídeos (5' - 3')
Externa (PCR)	BiIA	CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC
	BiIB	CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG
Interna (nPCR)	BiIAN	CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC
	BiIBN	CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG

Todas as amostras de DNA extraídas de carrapatos foram submetidas à amplificação pela nPCR, enquanto somente as amostras de sangue com reação negativa na PCR foram submetidas a essa segunda amplificação. A PCR foi feita em volume de 25  $\mu$ L, contendo 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl,

1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 U de Taq-DNA-polimerase (Amersham Bioscience), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (Amersham Bioscience), 10 pmoles de cada *primer* e 5  $\mu$ L de DNA de cada amostra. Na nPCR foram utilizados 2  $\mu$ L de cada produto de DNA amplificado na PCR e os reagentes já mencionados, na mesma concentração. A sensibilidade e a especificidade dos *primers*, bem como as condições para a realização das reações, foram determinadas em estudos prévios (Oliveira et al., 2005, Oliveira-Sequeira et al., 2005). O controle positivo das reações foi feito utilizando DNA extraído de amostra pura de *B. bigemina* (cedida pelos Drs. Raul Henrique Kessler e Cláudio Roberto Madruga, da Embrapa Gado de Corte). Os produtos de PCR e de nPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador ultravioleta. O tamanho dos produtos amplificados foi estimado pela inclusão de um padrão de pares de bases (100 pb ladder, Amersham Bioscience). Amostras que apresentaram bandas visíveis com cerca de 278 (PCR) ou 170 (nPCR) pares de bases foram consideradas positivas para *B. bigemina*. O seqüenciamento de *amplicons* de cinco amostras escolhidas ao acaso revelou correspondência com as seqüências depositadas no *Genebank* sob o número S45366 (*Apel-Aval restriction fragment of B. bigemina*).

### **Análise estatística**

Os testes de qui-quadrado e exato de Fisher foram utilizados para analisar a frequência de infecções por *B. bigemina* (nos bovinos e nos carrapatos), em função da idade e do grupo genético. Para o estudo da eclosão das larvas foi utilizado um modelo de análise de variância que incluiu os efeitos de grupo genético e de idade (bezerro e vaca) do hospedeiro e de infecção do carrapato por babésia (positivo e negativo). Todas as análises foram feitas empregando o sistema de análises estatísticas SAS (SAS, 1996).

### **Resultados**

Foram detectados merozoítas de *B. bigemina* somente em amostras de sangue colhidas em bezerros, sendo quatro animais NE (4/15) e dois AN (2/15). Todos apresentaram parasitemia menor do que 0,1%.

Os dados referentes à parasitemia detectada nos exames de PCR ou de nPCR para *B. bigemina* são apresentados na Tabela 1.

A realização da PCR e da nPCR indicou que todos os animais estavam infectados por *B. bigemina*. A PCR detectou infecção em 51 (85%) dos bezerros (12 NE, 14 CN, 11 AN e 14 SN). Dentre as vacas, a PCR detectou infecção em apenas 9 (15%) dos animais (três NE, três CN, um AN e dois SN).

**Tabela 1.** Detecção de DNA de *Babesia bigemina* pelas técnicas de PCR e nPCR em amostras de sangue de vacas e de bezerros, de acordo com os grupos genéticos\*.

	DNA de <i>B. bigemina</i>							
	NE		AN		CN		SN	
	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	NPCR
Bezerros	12	3	11	4	14	1	14	1
Vacas	3	12	1	14	3	12	2	13
Total	15	15	12	18	17	13	16	14

\* PCR = reação em cadeia da polimerase; nPCR = *nested* PCR; NE = Nelore; AN = Angus x Nelore; CN = Canchim x Nelore; SN = Simental x Nelore.

Esporocinetos de *Babesia* spp. foram encontrados apenas em fêmeas de carrapatos que se alimentaram em bezerros (9/549 - 1,6%), sendo quatro em animais NE, um em CN, um em AN e três em SN. A média do número de esporocinetos por campo microscópico foi de 1,7 (variando entre 0,13 e 3,3).

As taxas de infecção por *B. bigemina*, detectadas por meio de nPCR em fêmeas adultas de *R. (B.) microplus* colhidas em vacas e em bezerros dos quatro grupos genéticos, são apresentadas na Tabela 2.



**Tabela 2.** Frequência de infecção por *Babesia bigemina* em fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* colhidas em bezerros (n = 549) e em vacas (n = 553) de quatro grupos genéticos\*.

	Grupos Genéticos				Total
	NE	AN	CN	SN	
Bezerros	36/134 <sup>a</sup> (26,8%)	33/125 <sup>a</sup> (23,5%)	33/140 <sup>a</sup> (23,5%)	32/150 <sup>a</sup> (21,3%)	134/549 <sup>a</sup> (24,4%)
Vacas	13/120 <sup>b</sup> (10,8%)	13/133 <sup>b</sup> (9,7%)	14/150 <sup>b</sup> (9,3%)	12/150 <sup>b</sup> (8,0%)	52/553 <sup>b</sup> (9,4%)
Total	49/254 (19,2%)	46/258 (17,8%)	47/290 (16,2%)	44/300 (14,6%)	186/1102 (16,8%)

\* Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa ( $P < 0,01$ ); NE = Nelore, AN = Angus x Nelore, CN = Canchim x Nelore, SN = Simental x Nelore.

De um total de 549 amostras de DNA de fêmeas adultas de carrapato que se alimentaram em bezerros, 134 (24,4%) foram positivas para *B. bigemina* na nPCR. Das fêmeas de carrapato que se alimentaram em vacas, apenas 9,4% foram positivas ao exame de nPCR. As análises estatísticas mostraram associação significativa entre a taxa de infecção e a idade por grupo genético do hospedeiro. Pode-se verificar que as diferenças observadas entre a taxa de infecção por *B. bigemina* em

fêmeas adultas que se alimentaram em vacas e em bezerros foram significativas ( $P < 0,01$ ). As análises não mostraram diferença entre os grupos genéticos.

A taxa de eclosão das larvas de *R. (B.) microplus* originárias de carrapatos com reação positiva ou com reação negativa para *B. bigemina* foi de 53,5% e de 65,9%, respectivamente. Essa diferença foi significativa ( $P < 0,01$ ). As análises não mostraram diferença na taxa de eclosão de larvas oriundas de fêmeas colhidas nos animais dos quatro grupos genéticos.

## Discussão

O fator determinante para a ocorrência de merozoítas de *B. bigemina* no sangue foi a idade dos animais. Na região onde foi desenvolvido este estudo, a ocorrência de babesiose havia sido anteriormente caracterizada como de estabilidade endêmica (Oliveira et al., 2005; Oliveira-Sequeira et al., 2005). De acordo com Mahoney & Ross (1972), em regiões com babesiose endêmica, a incidência de parasitemia por idade nos animais varia de inexistente no nascimento a máxima entre os seis meses e os dois anos de idade, quando declina fortemente. Os bezerros analisados no presente experimento apresentavam cerca de doze meses de idade na época da colheita de sangue e, devido à infecção precoce a que foram constantemente submetidos desde o nascimento (Oliveira et al., 2005), já apresentavam forte resistência à doença clínica. Além disso, deve-se considerar que em todos os bezerros foi detectada

parasitemia muito baixa (menor do que 0,1%) e apenas *B. bigemina*, o protozoário que causa anemia hemolítica menos grave (Mahoney & Ross, 1972, Kakoma & Melhorn, 1994) estava presente nos exames diretos.

A ocorrência de babesiose clínica em bezerros tem sido freqüentemente descrita em diversas regiões do Brasil, porém neste experimento os bezerros foram mantidos desde o nascimento em pastos infestados, o que propiciou o desenvolvimento de sólida imunidade. Mesmo assim a detecção de parasitemia baixa em alguns bezerros, mostra que esses animais sofreram infecção primária e se estabeleceram como portadores, o que é comum em sistemas em que a babesiose é endêmica (Callow, 1968).

As análises das amostras de DNA extraídos de sangue mostraram novamente que todos os animais estavam infectados por *B. bigemina*: a maior parte dos bezerros foi diagnosticada como positiva à PCR e a maioria das vacas à nPCR. Assim, novamente os bovinos mais jovens apresentaram quantidade relativamente maior de *B. bigemina* no sangue, quando comparados aos adultos, independentemente do grupo genético do animal.

A alta taxa de infecção por *B. bigemina* e a maior freqüência de bezerros com reação positiva na PCR também foram descritas em trabalhos anteriores conduzidos na mesma região (Oliveira et al., 2005; Oliveira-Sequeira et al., 2005), porém com animais recém-nascidos, mestiços de raças leiteiras. Estes resultados indicam que, embora a técnica de amplificação

de DNA dos protozoários empregada não possa ser utilizada para quantificar a parasitemia, pode-se concluir que os animais positivos na primeira reação apresentaram maior disponibilidade de DNA de *B. bigemina* no sangue e que uma sólida imunidade é conseguida com o aumento da idade dos animais, quando a parasitemia passa a ser mantida em patamar extremamente baixo.

Nos exames diretos de hemolinfa das teleóginas detectaram-se infecções por babésias apenas em carrapatos colhidos em bezerros. Novamente, não houve associação entre infecção dos carrapatos e grupo genético animal, mas sim como idade, já que nenhum carrapato colhido nas vacas apresentou esporocinetos detectáveis pelo exame direto. Segundo Guglielmo et al., (1996), não é possível a determinação da espécie de *Babesia* por meio do estudo morfológico dos esporocinetos presentes na hemolinfa de carrapatos. Desse modo, não se pode afirmar que todas as formas de babésias encontradas nos ácaros sejam de *B. bigemina*. Devido ao pequeno número de carrapatos infectados e sabendo-se que a média de esporocinetos nesses ácaros pode ser afetada de maneira drástica pela distribuição agregada do protozoário (Guglielmo et al., 1997), os dados assim obtidos não podem ser utilizados para a definição da distribuição de *B. bigemina* no vetor.

A análise das amostras de DNA dos carrapatos por meio de nPCR detectou número maior de ácaros infectados por *B. bigemina*, tanto em vacas como em bezerros de todos os grupos

genéticos, sendo novamente verificada a forte associação entre idade dos bovinos e taxa de infecção dos carrapatos. Estudos epidemiológicos conduzidos em vários países (Mahoney & Ross, 1972; Guglielme et al., 1988; Melendez & Forlano, 1996; Oliveira et al., 2005) mostraram que a parasitemia do hospedeiro afeta a infecção dos vetores. Também neste trabalho foi verificada a forte associação entre a detecção da infecção por *B. bigemina* pela PCR (primeira reação) nos bovinos e a taxa de infecção nos carrapatos colhidos nesses animais.

Neste experimento, a taxa de eclosão das larvas de *R. (B.) microplus* foi estudada individualmente em cada fêmea adulta, com a finalidade de verificar se o grupo genético dos hospedeiros influencia o desenvolvimento da progênie dos carrapatos. Os resultados obtidos mostraram que a raça não afetou de maneira homogênea a taxa de eclosão das larvas dos carrapatos. O fator que influenciou significativamente a taxa de eclosão das larvas foi a infecção por *B. bigemina*. Foi verificado que carrapatos expostos pela primeira vez a babésias sofrem alta taxa de mortalidade (Riek, 1964, 1966; Guglielme et al., 1985; Cafrune et al., 1993) e a progênie de fêmeas com alta taxa de infecção na hemolinfa apresenta menor taxa de eclosão de larvas (Oliveira et al., 2005). Entretanto, em infecções naturais o *R. (B.) microplus* parece não ser afetado pelas babésias, fenômeno conhecido por tolerância adaptativa (Cafrune et al., 1993; Guglielme et al., 1996; Cen-Aguilar et al., 1998). O fato de as raças zebuínas apresentarem maior

resistência ao carrapato tem sido verificado, porém a influência dessa resistência sobre a progênie dos carrapatos parece ser afetada por vários fatores, o que torna difícil a sua interpretação (Barriga et al., 1995).

## Conclusões

A utilização de bovinos das raças estudadas não é capaz de mudar a forma de ocorrência das babesioses de endemias estáveis em endemias instáveis, fato que poderia levar a riscos de surtos da doença. A utilização desses grupos genéticos também não influenciou diretamente a progênie dos carrapatos; o único fator observado que teve efeito sobre a progênie de carrapatos foi a presença de infecção por *B. bigemina*.

## Referências bibliográficas

BARRIGA, O. O.; SILVA, S. S.; AZEVEDO, J. S. C. Relationships and influences between *Boophilus microplus* characteristics in tick-naive or repeatedly infested cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 56, p. 225-238, 1995.

BOCK, R. E.; DE VOS, A. J.; KINGSTON, T. G.; McLELLAN, D. J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 5, p. 337-340, 1997.

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

BURGDORFER, W. Hemolymph test. A technique for detection of Rickettsiae in ticks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 6, p. 1010-1014, 1970.

CAFRUNE, M. M.; AGUIRRE, D. H.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Oviposition in *Boophilus microplus* infected artificially with *B. bovis* and *B. bigemina*. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 68, p. 196-8, 1993.

CALLOW, L. L. The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. **Parasitology**, v. 58, p. 663-670, 1968.

CEN-AGUILAR, J. F.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; DOMÍNGUEZ-ALPIZAR, J. L.; WAGNER, G. G. Studies on the effect of infection by *Babesia* sp. on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in Mexican Tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 78, p. 253-7, 1998.

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

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

GUGLIELMONE, A. A.; GAIDO, A. B.; AGUIRRE, D. H.; CAFRUNE, M. M. Some quantitative aspects of natural babesial infection in the haemolymph of *Boophilus microplus* engorged female ticks. **Parasite**, v. 4, p. 337-41, 1997.

GUGLIELMONE, A. A.; GAIDO, A. B.; MANGOLD, A. J. Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p 15-20, 1996.

GUGLIELMONE, A. A.; GAIDO, A. B.; MANGOLD, A. J.; AGUIRRE, D. H. El diagnóstico de micro-organismos en la hemolinfa de la *garrapata Boophilus microplus* y su aplicación en la epizootiología de la babesiosis bovina. In: REUNIÓN DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE VETERINARIOS DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO, 3., 1988, Balcarce. **Memoria...** Balcarce: AAVLD, 1988. p.18-19.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; AGUIRRE, D. H.; GAIDO, A. B.; DE OLSEN, A. A. The effect of infection by *Babesia* sp. on some biological parameters of engorged females of *Boophilus microplus*. **Folia Parasitologica**, v. 36, p. 1-6. 1989.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; BERMUDEZ, A. C.; HADANI, A. Detección de merozoitos grandes (vermiculos) de *Babesia* en teleoginas de *Boophilus microplus* alimentadas sobre terneros com distintos niveles de parasitemia de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* (= *Babesia argentina*). **Revista Ibérica de Parasitología**, v. 45, n. 4, p. 303-11, 1985.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1-10, 2006.

KAKOMA, I.; MEHLHORN, H. *Babesia* of domestic animals. In: KREIER, J. P. (Ed). **Parasitic protozoa**. San Diego: Academic Press, 1994. p.141-216.

LIMA, W. S.; RIBEIRO, M. F; GUIMARÃES, M. P. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 32, p.375-380, 2000.

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G. B. Bovine babesiasis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 309-17, 1971.



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

MELENDEZ, R. D.; FORLANO, M. Incidence and intensity of *Babesia* spp. sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* from a dairy herd in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 791, p. 148-56, 1996.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 153-65, 1995.

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

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

PALMER, G. H.; McELWAIN, T. F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 153-65, 1995.

RIEK, R. F. The cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 15, p. 802-21, 1964.

RIEK, R. F. The cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa : Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 17, p. 247-254, 1966.

SAS. **SAS/STAT**. User's Guide, version 6.11. 4. ed. v. 2. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 842 p.

WARTHON, R. H.; UTECH, K. B. W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. **Journal Australian Entomology Society**, v. 9, p. 171–182, 1970.