



ISSN 1677-8618
Agosto, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 46

Aspectos epidemiológicos da babesiose bovina na Amazônia sul ocidental: avaliação molecular

Luciana Gatto Brito
Márcia Cristina de Sena Oliveira
Francelino Goulart da Silva Netto
Francisco Aloísio Cavalcante
Gislaine Cristina Rodrigues de Souza
José Eduardo Gisbert Bezerra
Andréia Moreno
Crisvaldo Cássio Silva Souza

Porto Velho, RO
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO

Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409

www.cpafrro.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Cléber de Freitas Fernandes*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Abadio Hermes Vieira

André Rostand Ramalho

Luciana Gatto Brito

Michelliny de Matos Bentes Gama

Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira

Normalização: *Daniela P. Maciel*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão: 2007. Tiragem: 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

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

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia.

Aspectos epidemiológicos da babesiose bovina na amazônia sul
ocidental: avaliação molecular/ Luciana Gatto Brito ... [et
al].-- Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2007.
23 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa
Rondonia, 1677-8618 ; 49)

1. Epidemiologia Molecular. I. Oliveira, Márcia Cristina de
Sena. II. Silva Netto, Francelino Goulart. III. Cavalcante,
Francisco Aloísio. IV. Souza, Gislaine Cristina Rodrigues de. V.
Bezerra, José Eduardo Gisbert. VI. Moreno, Andréia. VII.
Souza, Crisvaldo Cássio Silva. VIII. Título. IX. Série.

CDD(21.ed.) 636.089

© Embrapa – 2007

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e métodos	10
Obtenção de amostras	10
Extração de DNA	13
Reação em cadeia da polimerase (PCR) e nested PCR	13
Eletroforese	14
Epidemiologia	14
Resultados	14
Rondônia	14
Acre	16
Discussão	17
Conclusões	19
Referências	20

Aspectos epidemiológicos da babesiose bovina na Amazônia sul ocidental: avaliação molecular

Luciana Gatto Brito¹
Márcia Cristina de Sena Oliveira²
Francelino Goulart da Silva Netto³
Francisco Aloísio Cavalcante⁴
Gislaine Cristina Rodrigues de Souza⁵
José Eduardo Gisbert Bezerra⁶
Andréia Moreno⁷
Crisvaldo Cássio Silva Souza⁷

Resumo

A babesiose bovina, causada pelos protozoários intraeritrocíticos *Babesia bovis* e *B. bigemina* tem como principal vetor *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo este o único vetor biológico da família Babesiidae no Brasil. A babesiose caracteriza-se por febre, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinúria e fraqueza, onde alguns casos podem evoluir para a morte, estando a gravidade da enfermidade diretamente relacionada à reação do hospedeiro frente à infecção. As perdas ocasionadas pela babesiose bovina são atribuídas ao menor ganho de peso dos animais, decréscimo na produção de leite, infertilidade de touros, abortos e mortalidade, além das babesioses representarem um obstáculo à introdução de animais provenientes de áreas livres desses parasitas. O presente estudo buscou determinar a prevalência de *B. bovis* e *B. bigemina* em amostras de sangue provenientes de rebanhos bovinos criados em oito microrregiões de Rondônia e quatro microrregiões do Acre por meio da utilização de técnicas diagnósticas pela amplificação de fragmentos de DNA específicos a cada uma das espécies. Verificou-se uma taxa de prevalência para *B. bovis* de 9,00% e de 3,09% para *B. bigemina* nas amostras provenientes de Rondônia e de 7,20% para *B. bovis* e de 0,89% para *B. bigemina* nas amostras provenientes do Acre. As taxas de prevalência em todas as microrregiões analisadas caracterizam os Estados de Rondônia e Acre como áreas de instabilidade endêmica para *B. bovis* e *B. bigemina*, porém tal situação parece não ser a prevalecente nos rebanhos bovinos criados na Amazônia Sul Ocidental dada a abundância do carrapato dos bovinos durante todo o ano, os quais são responsáveis pela manutenção da parasitemia por *B. bovis* e *B. bigemina* nos rebanhos.

¹ Méd. Vet. D.Sc, Embrapa Rondônia, Caixa Postal 406, 78900-970, Porto Velho-RO. E-mail: luciana@cpafro.embrapa.br.

² Méd. Vet. D.Sc, Pesquisador Embrapa Pecuária Sudeste, Caixa postal 339, 13560-970, São Carlos- SP. E-mail: márcia@cppse.embrapa.br.

³ Méd. Vet. M.Sc, Embrapa Rondônia. E-mail: goulart@cpafro.embrapa.br.

⁴ Méd. Vet. M.Sc, Embrapa Acre. Email: aloisio@cpafac.embrapa.br.

⁵ Bolsista PIBIC CNPq/ Embrapa Rondônia, acadêmica de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Rondônia. E-mail: souza.gislainecristina@gmail.com.

⁶ Bolsista PIBIC CNPq/ Embrapa Rondônia, acadêmico de Medicina Veterinária, Faculdades Integradas Aparício Carvalho. E-mail: eduardo_gisbert@hotmail.com.

⁷ Acadêmico de Ciências Biológicas da Faculdade São Lucas.

Epidemiologic aspects of the bovine babesiosis in the south occidental Amazonia: molecular evaluation

Abstract

The bovine babesiosis caused for intraerythrocytic protozoans *Babesia bovis* and *B. bigemina* has as most important vector the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* as unique biological vector of the Babesiidae family in Brazil. The babesiosis diseases are characterized for fever, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinuria and flaccid, in some cases it can progress for the death, the severity of the disease is directly related with the host reaction to the infection. The economic losses in the cattle caused by babesiosis are attributed to decrease in the animal weight and in the milk production, infertility of bulls, abortions and mortality. The babesiosis represents an obstacle to introduction animals from free areas for these parasites. The objective of the present study is to determine the prevalence of *B. bovis* and *B. bigemina* in samples of blood from bovine herds created in eight micro regions of Rondônia state and four micro regions of the Acre state through the use of molecular techniques in the diagnosis for amplification by PCR of specific DNA fragment. The prevalence rate for *B. bovis* was 7,70% and 5,33% for *B. bigemina* in the samples proceeding from Rondônia state and 5,34% for *B. bovis* and of 1,18% for *B. bigemina* in the samples proceeding from the Acre state. The prevalence rates had differed between the analyzed micro regions characterizing the states of Rondônia and Acre as instability endemic areas for *B. bovis* and *B. bigemina*, but this situation isn't reflect the prevalent situation in cattle created in the South Occidental Amazonia through the abundance of cattle tick during all year, which are responsible for parasitemia preservation for *B. bovis* and *B. bigemina* in the cattle herds.

Introdução

O Brasil é um país com grande vocação à pecuária, tendo na atualidade o setor produtivo animal potencial imensurável e de grande importância econômico-social. Buscando maximizar o aproveitamento econômico da cadeia produtiva animal e potencializar o desenvolvimento pecuário sustentável, torna-se necessário a utilização de tecnologias na área de sanidade animal, voltadas especialmente para estudos epidemiológicos e de controle das enfermidades infecciosas e parasitárias que acometem os animais de produção.

Dentre as enfermidades parasitárias se destacam as pertencentes ao complexo denominado Tristeza Parasitária Bovina (TPB), que no Brasil é causado por dois protozoários do gênero *Babesia* – *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* – e pela rickettsia *Anaplasma marginale*. Ambas as espécies de protozoários são transmitidas exclusivamente pelo carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, enquanto que *A. marginale* pode também ser transmitido por moscas hematófagas (KOGAN et al., 2003).

Na pecuária bovina brasileira as perdas econômicas associadas aos agentes causais da TPB são significativas e estimadas em cerca de 500 milhões de dólares anuais, segundo estimativas do Ministério da Agricultura e corrigidas por Grisi et al. (2002).

B. bovis e *B. bigemina* são espécies que ocorrem simultaneamente em várias regiões do mundo acompanhando a presença dos vetores que se concentram entre os paralelos 32 °S e 40 °N do equador, sendo encontradas em várias regiões da África, Ásia, Europa, América do Sul e Central, ilhas do Caribe e do Pacífico (KUTLER, 1988) onde promovem grandes perdas econômicas, principalmente, em sistemas pecuários bovinos de raças taurinas e seus cruzamentos (BOCK et al., 2004).

A ocorrência da babesiose bovina está intimamente relacionada à distribuição do carrapato, *R. (B.) microplus*, que tem como hospedeiro o bovino e é considerado o único vetor biológico e responsável pela difusão desses protozoários nos rebanhos (BOCK et al., 2004). A transmissão mecânica por insetos hematófagos não ocorre na babesiose, enquanto que a transmissão transplacentária ou por via lactogênica nos bovinos, são consideradas isentas de importância epidemiológica (KAKOMA; MELHORN, 1994).

Das oito espécies do gênero *Babesia* capazes de infectar bovinos (UILENBERG, 2006), *B. bovis* e *B. bigemina* são identificadas como agente etiológico da parasitemia no Brasil (VIDOTTO et al., 1995; GUGLIELMONE, 1995).

A infecção dos carrapatos por *Babesia* spp. ocorre durante a hematofagia das teleóginas em animais acometidos pela parasitose. Após a ingestão de eritrócitos parasitados, os merozoítos sofrem alterações morfo-fisiológicas adaptativas se preparando para o início do ciclo sexuado (FRIEDHOFF, 1988).

As babesias apresentam o padrão básico de reprodução dos protozoários do Filo Apicomplexa que inclui a alternância de fases assexuadas e sexuadas em uma mesma geração (Hodgson, 1992). Assim sendo, estes parasitas apresentam ciclo de desenvolvimento que se inicia quando as formas infectantes, ou esporozoítas, presentes nas glândulas salivares do carrapato, são inoculadas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado (HODGSON, 1992).

Os bovinos, hospedeiros intermediários de *Babesia* spp, se infectam pela inoculação de esporozoítas presentes na glândula salivar dos carrapatos no ato do repasto sanguíneo. A

inoculação de *B. bovis* ocorre quando o carrapato está na fase de larva e a de *B. bigemina* ocorre quando o carrapato encontra-se na fase de ninfa. A infecção do hospedeiro vertebrado por *B. bovis* se dá de dois a três dias após a fixação das larvas do carrapato, enquanto que *B. bigemina* é transmitida de oito a dez dias após a fixação, quando os ixodídeos já se encontram na fase de ninfa (RIEK, 1964, 1966). De um modo geral, o período pré-patente de *B. bovis* varia de 6 a 12 dias e de *B. bigemina* de 12 a 18 dias após a fixação dos carrapatos.

As raças bovinas se comportam de modo diverso frente às infestações por carrapatos: raças européias são mais susceptíveis, enquanto que as raças zebuínas apresentam maior resistência genética à infestação por *R. (B.) microplus* (GOMES, 1998; JONSSON et al., 2000). Essa característica genética é transmitida às gerações, guardando uma proporção com relação ao grau de sangue advindo de cruzamentos, desta forma, animais da primeira geração (F1) resultante de cruzamento entre taurino e zebuino ainda são bastante sensíveis ao carrapato e às doenças por ele transmitidas (SARTOR et al., 1992; BOCK et al., 1999b). Existem evidências de que a raça dos bovinos também interfere na gravidade das infecções por hemoparasitas transmitidos por carrapatos (GUGLIELMONE, 1992; BOCK et al., 1999a; JONSSON et al., 2000), sendo as raças zebuínas mais resistentes do que as taurinas (MADRUGA et al., 1984; UILENBERG, 1995; BOCK et al., 1997).

Dado o elevado percentual de animais destinados à produção de carne nos Estados de Rondônia e Acre, sendo a quase totalidade deste rebanho zebuino ou com elevado grau de sangue zebuino, principalmente da raça Nelore, faz com que estes rebanhos sejam compostos por animais com alta resistência genética a infestação por *R. (B.) microplus*. Rondônia é um dos principais produtores de carne bovina na Amazônia Legal, com uma distribuição percentual do rebanho de corte de 70,23% do total de bovinos criados no estado (SEAPES, 2006). A participação das microrregiões que compõem o Estado na distribuição percentual dos rebanhos de corte se apresenta de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Participação das microrregiões na composição do rebanho de corte de Rondônia.

Microrregiões	Participação
Ji-Paraná	28,80%
Cacoal	22,77%
Ariquemes	11,45%
Vilhena	10,64%
Colorado do Oeste	10,59%
Porto Velho	7,51%
Alvorada D'Oeste	6,51%
Guajará-Mirim	1,73%
Total	

Fonte: IBGE – Pesquisa Pecuária Municipal (2006.)

A susceptibilidade dos animais zebuínos às babesioses tem sido questionada existindo controvérsias entre autores. Para alguns, a resistência à *Babesia* spp. poderia estar relacionada à ineficiente transmissão dos protozoários pelo vetor, em decorrência da maior resistência dos zebuínos ao carrapato, já que nesses animais a maioria dos carrapatos morre precocemente (GOMES et al., 1989; SARTOR et al., 1992). Contudo, o que se observa é que bovinos zebuínos também se infectam, porém, apresentam enfermidade subclínica após a infecção primária por *Babesia* spp. (BOCK et al., 1997).

Com relação à idade, animais jovens são considerados naturalmente mais resistentes, já que com frequência apresentam infecções subclínicas (BROWN et al., 2006). No entanto, Madruga et al. (1984) verificaram que no período entre 28 e 56 dias após o nascimento, para *B. bigemina* e entre 84 e 112 dias para *B. bovis*, os índices de anticorpos são baixos,

umentando a probabilidade dos animais desenvolverem a babesiose de forma aguda. Segundo Mahoney e Mirre (1977), os efeitos da infecção por *Babesia* spp. são minimizados pela exposição dos bovinos aos hemoprotozoários desde os primeiros meses de vida, quando os anticorpos colostrais ainda encontram-se elevados.

Segundo Kuttler (1988), países em desenvolvimento são áreas endêmicas para as babesioses e infestações por carrapatos *R. (B.) microplus*, uma vez que a maioria desses países encontra-se entre os paralelos 32 °S e 40 °N do Equador, onde estão situadas em várias regiões da Ásia, América do Sul e Central. Esforços desses países em importar animais de maior potencial genético para a produção pecuária são prejudicados pela presença endêmica da babesiose bovina. As perdas de animais oriundos de áreas livres da doença podem ser muito grandes se não forem adotadas medidas como quimioterapia, imunização dos bovinos ou uso de carrapaticidas, já que procedimentos efetivos de controle das babesioses bovinas não estão ainda disponíveis (PALMER; MCELWAIN, 1995).

No que diz respeito aos hospedeiros vertebrados, o diagnóstico das babesioses em bovinos clinicamente afetados é baseado nos sintomas característicos da enfermidade, na história do rebanho e na presença dos carrapatos vetores (KUTLER, 1981). O exame direto dos parasitas no sangue dos animais infectados é rotineiramente empregado para a determinação da espécie envolvida em casos clínicos. O método mais utilizado é o exame de esfregaços de sangue periférico corados com solução de Giemsa.

Embora de grande simplicidade, a técnica de exame direto de esfregaço sangüíneo não é suficientemente sensível para detectar os animais que se estabeleceram como portadores após sofrer um quadro clínico de babesiose. Do ponto de vista epidemiológico, a identificação dos animais portadores é fundamental, pois durante o estado de portador a flutuação que ocorre na parasitemia é suficiente para permitir a infecção de muitas fêmeas de carrapatos (CALLOW, 1968).

As áreas de estabilidade enzoótica para a babesiose são caracterizadas por Mahoney e Ross (1972) pelo equilíbrio existente entre a imunidade do hospedeiro vertebrado e a ocorrência da doença nos animais, onde 75% dos animais com idade acima de nove meses são portadores do hemoparasita. Em áreas de estabilidade endêmica para a babesiose bovina os carrapatos são abundantes e o padrão epidemiológico demonstra alta porcentagem de bovinos infectados com rara ocorrência de enfermidade clínica. Esta relação é mantida graças a imunidade passiva, evidenciada através da detecção de anticorpos específicos, fornecida pelo colostro e a taxa de infecção dos bezerros, os quais são dotados de resistência inata até cerca de nove meses de idade. Durante este período, a maioria dos animais adquire a infecção, denominada de primo-infecção precoce e que ocorre durante a fase de maior resistência do animal à babesiose, quando os animais não apresentam sintomatologia clínica aparente da doença. A imunidade resultante da primo-infecção precoce uma vez estabelecida é mantida no rebanho adulto mediante seguidas re-infecções provenientes das populações de *R. (B.) microplus*, os quais infestam os animais durante boa parte do ano, fazendo com que se tenha baixa mortalidade de animais adultos em rebanhos criados em áreas de estabilidade enzoótica para a parasitose.

Diversos autores investigaram a prevalência das babesioses, no Brasil, empregando técnicas para diagnóstico imunológico. No Estado de Mato Grosso do Sul, prevalências de 19,04% para *B. bovis* e 12,89% para *B. bigemina* foram observadas em vacas zebuínas (Madruga et al., 1983); em Minas Gerais, as prevalências detectadas foram de 79,04% para *B. bigemina* e 82,53 para *B. bovis*, em animais adultos (PATARROYO et al., 1987). No Estado de São Paulo, Barci et al. (1993) detectaram taxas de infecção de 94,0% para *B. bigemina* e 88% para *B. bovis* ao examinar amostras de soros de animais criados no Vale do Paraíba. O percentual de

positividade para *B. bigemina*, no Estado de Goiás foi de 97,5% (LINHARES et al., 1992), e no Estado de Pernambuco, de 87,9% (ALVES, 1987).

Nos inquéritos sorológicos em que se empregou o teste de ELISA, foram detectadas prevalências de anticorpos contra *B. bigemina* em 69,74% dos bovinos no Norte Fluminense (SOUZA et al., 2000) e de 87,7% a 98,9%, no Pantanal do Mato Grosso do Sul (MADRUGA et al., 2001).

Apesar da elevada sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos, uma das principais limitações é que eles apenas indicam a exposição ao agente, não informando sobre o estágio da infecção (WAGNER et al., 1992).

Os avanços obtidos no campo da biologia molecular tornaram possível o desenvolvimento de novas técnicas para diagnóstico de parasitas por meio da detecção de seu DNA que, ao contrário de substâncias como proteínas, permanece inalterado em todos os estágios do ciclo biológico (BARKER, 1990). A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis e Faloona (1987) possibilitou o desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais sensíveis e específicas.

Smeenk et al. (2000), no Zimbábue, utilizaram a técnica de PCR para detectar o DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos e carrapatos vetores. Foram detectados 35% de animais positivos (33/94) para *B. bigemina* e 47% (27/58) para *B. bovis*. A prevalência de *B. bigemina* foi significativamente maior em animais jovens.

A identificação da situação epidemiológica da babesiose na Amazônia Sul Ocidental brasileira, onde estão inseridos os Estados de Rondônia e do Acre, é de fundamental importância para identificar a situação epidemiológica em que se encontram os rebanhos bovinos com relação à babesiose. O conhecimento da epidemiologia dos agentes causais da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) em cada região geográfica é indispensável para a aplicação de medidas de prevenção e controle que possam interromper o ciclo epidêmico de forma a garantir a sanidade dos animais, reduzindo assim os prejuízos referentes à perda de produtividade dos rebanhos pela morbidade da parasitemia ou mortalidade dos animais.

Material e métodos

Obtenção de amostras

Rondônia

O estudo foi desenvolvido com amostras de coágulo sanguíneo cedidas pela Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia (IDARON), as quais eram provenientes de bovinos com idade entre quatro e 12 meses criados em sete regiões fisiográficas do Estado de Rondônia.

O Estado de Rondônia é dividido, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em duas mesorregiões: Madeira-Guaporé e Leste Rondoniense (IBGE, 2006). Na mesorregião de Madeira-Guaporé estão incluídas as microrregiões de Guajará-Mirim e Porto Velho, enquanto que na mesorregião do Leste Rondoniense estão compreendidas as demais microrregiões estudadas.

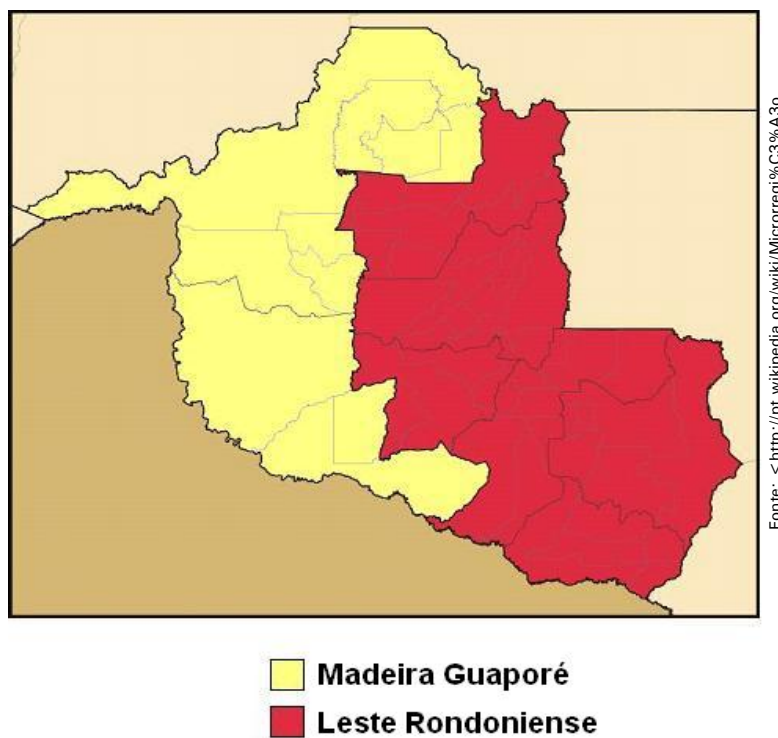


Fig. 1: Mesorregiões que compõem o Estado de Rondônia.

As microrregiões que compõem o Estado de Rondônia (Fig. 2) possuíam no ano de 2004, ano de coleta das amostras utilizadas no estudo, uma população bovina na faixa etária de quatro a 12 meses estimada em 861.953 animais criados em uma área total de 238.512,8 km² (Rondônia, 2005). As microrregiões amostradas, assim como o número de amostras coletadas para a análise da prevalência da babesiose bovina em Rondônia são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Microrregiões analisadas para determinação da prevalência de *Babesia bovis* e *B. bigemina* em Rondônia.

Microrregião	Municípios componentes	Número de amostras
Alvorada do Oeste	Alvorada do Oeste, Nova Brasilândia, São Miguel do Guaporé e Seringueiras	120
Ariquemes	Alto Paraíso, Ariquemes, Cacaúlândia, Machadinho do Oeste, Monte Negro, Rio Crespo e Vale do Anari	115
Cacoal	Alta Floresta do Oeste, Alto Alegre dos Parecis, Castanheiras, Cacoal, Espigão do Oeste, Ministro Andreazza, Novo Horizonte do Oeste, Rolim de Moura, Rio Crespo e Santa Luzia do Oeste	323
Guajará-Mirim	Costa Marques, Guajará-Mirim e São Francisco do Guaporé	237
Ji-Paraná	Governador Jorge Teixeira, Jaru, Ji-Paraná, Mirante da Serra, Nova União, Ouro Preto do Oeste, Presidente Médici, Teixeiraópolis, Urupá e Vale do Paraíso	242
Porto Velho	Buritis, Campo Novo de Rondônia, Candeias do Jamari, Cujubim, Itapuã do Oeste, Nova Mamoré e Porto Velho	289
Vilhena	Chupinguaia, Parecis, Pimenta Bueno, Primavera de Rondônia, São Felipe do Oeste e Vilhena	62
Total de amostras		1.388

Em Rondônia, a amostragem foi realizada coletando-se um número maior ou igual a 0,1% da população de bovinos pertencentes à faixa etária de quatro a 12 meses nas sete microrregiões amostradas, conforme metodologia proposta por Souza et al. (2000).

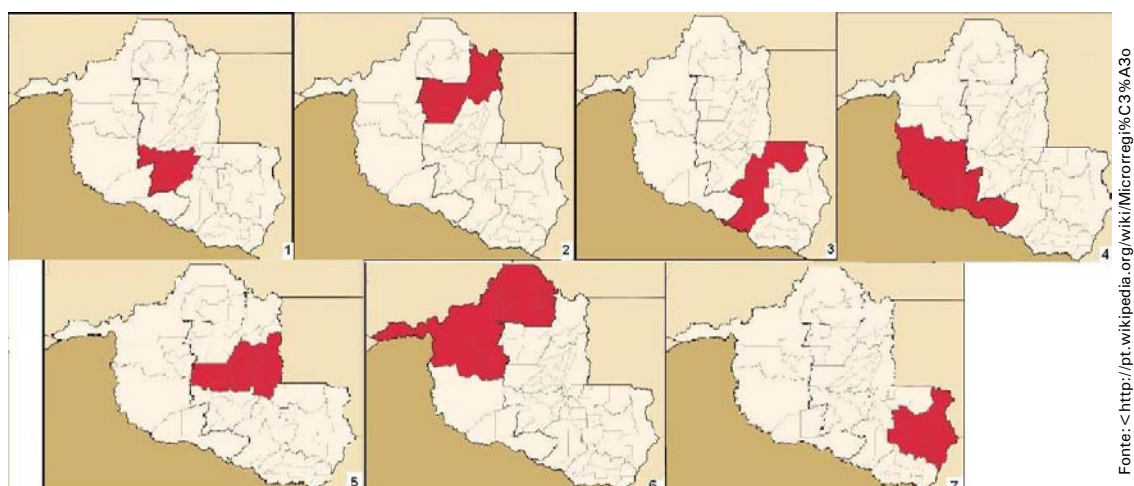


Fig. 2. Microrregiões do estado de Rondônia onde foram coletadas amostras de sangue bovino para a pesquisa de *Babesia bovis* e *B. bigemina*: (1) Alvorada do Oeste; (2) Ariquemes; (3) Cacoal; (4) Guajará Mirim; (5) Ji-Paraná; (6) Porto Velho; (7); Vilhena.

Acre

As amostras de sangue total procedentes de rebanhos bovinos do Acre foram coletadas pela Embrapa Acre exclusivamente para o estudo epidemiológico dos agentes causais da TPB durante os meses de fevereiro e março de 2006. As amostras de sangue total utilizadas para a extração de DNA genômico foram coletadas com anti-coagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 5% em 225 bovinos sadios de diferentes faixas etárias em quatro microrregiões do Estado.

O Acre é dividido segundo o IBGE em duas mesorregiões: Vale do Juruá onde estão incluídas as microrregiões de Cruzeiro do Sul e Tarauacá, e a mesorregião do Vale do Acre, onde estão compreendidas as microrregiões de Brasiléia e Rio Branco.

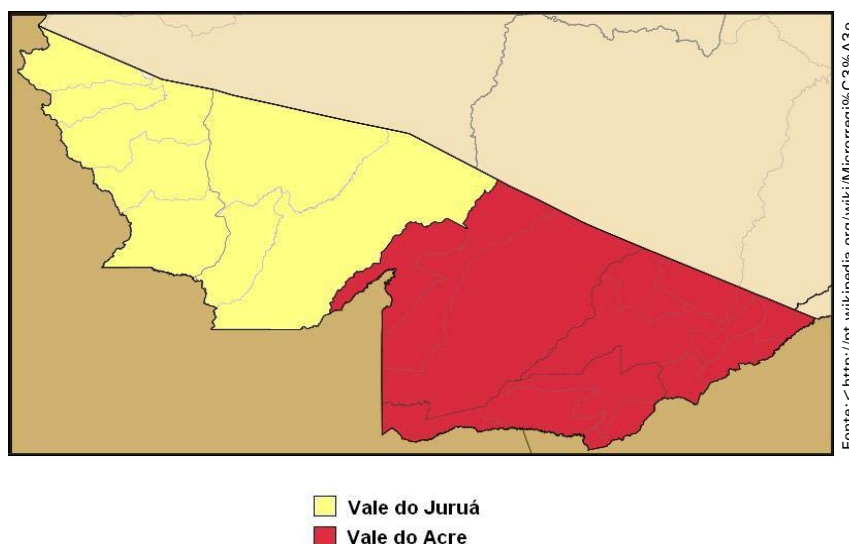


Fig. 3. Mesorregiões que compõem o Estado do Acre.

As microrregiões estudadas, assim como o número de amostras coletadas para a análise da prevalência da babesiose bovina no Acre são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Microrregiões analisadas para determinação da prevalência de *Babesia bovis* e *B. bigemina* no Acre.

Microrregião	Municípios componentes	Número de amostras
Cruzeiro do Sul	Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Marechal Thaumaturgo, Porto Walter e Rodrigues Alves	45
Rio Branco	Acrelândia, Bujari, Capixaba, Plácido de Castro, Porto Acre, Rio Branco e Senador Guiomard	90
Tarauacá	Feijó, Jordão e Tarauacá	35
Brasiléia	Assis Brasil, Brasiléia, Epitaciolândia e Xapuri	55
Total de amostras		225

No Acre foi não possível se realizar a amostragem coletando-se um número maior ou igual a 0,1% da população de bovinos criados na microrregião conforme metodologia preconizada por Souza et al. (2000).

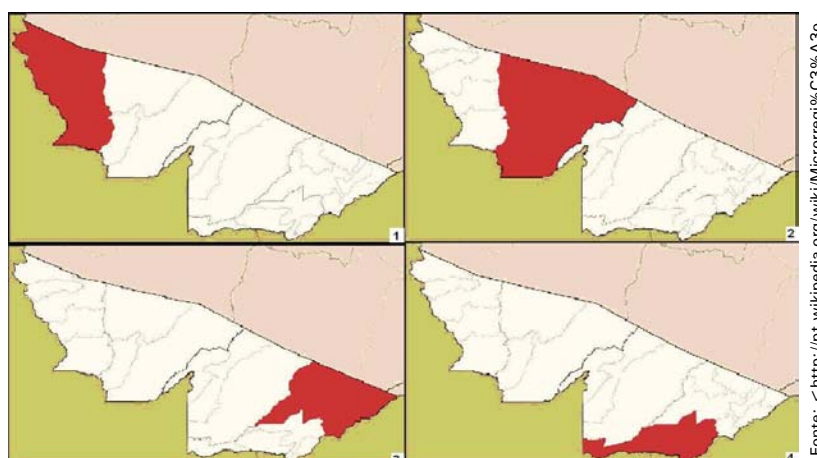


Fig. 4. Microrregiões do Estado do Acre onde foram coletadas amostras de sangue para a pesquisa de *Babesia bovis* e *B. bigemina*: (1) Cruzeiro do Sul; (2) Tarauacá; (3) Rio Branco; (4) Brasiléia.

Todas as técnicas moleculares empregadas para a realização do presente estudo foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Rondônia.

Extração de DNA

Procedeu-se a extração de DNA das amostras de coágulo conforme metodologia descrita por Brito et al. (2006). Para extração de DNA das amostras de sangue total utilizou-se o *kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification* (Amershan Pharmacia Biotech Inc. Limited, UK), seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras de DNA obtidas foram diluídas em 100 µL de tampão TE (TRIS-EDTA) e mantidas em freezer à -20°C para a pesquisa de *B. bovis* e *B. bigemina* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Reação em cadeia da polimerase (PCR) e nested PCR

As reações de PCR e nested-PCR (nPCR) foram realizadas utilizando as sequências iniciadoras (*primers*) descritas por Figueroa et al. (1993), cujas descrições são apresentadas no Quadro 1. Na otimização da técnica foram empregadas alíquotas de DNA extraídas de amostras de vacina viva atenuada, contendo exclusivamente *B. bovis* e *B. bigemina* cedidas pela Embrapa Gado de Corte, as quais também foram utilizadas como controle positivo nas baterias de amplificação.

Quadro 1. Seqüências iniciadoras externas (*primers*) para amplificação de DNA de *Babesia bovis* e *B. bigemina*.

Espécie	Seqüência	Olidonucleotídeos (5' - 3')	Produto Amplificado (pb*)
<i>Babesia bovis</i>	BoF	CAC GAG GAA GGA ACT ACC GAT GTT GA	350
	BoR	CCA AGG AGC TTC AAC GTA CGA GGT CA	
<i>Babesia bigemina</i>	BiIA	CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC	278
	BiIB	CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG	

*Pares de base.

As reações foram realizadas em tubos de propietileno de 0,2 mL empregando-se volume final de 12,5 µL, sendo 2,5 µL de DNA das amostras teste e 8,0 µL do kit comercial de amplificação PCR MasterMix (Promega®), que contém tampão de reação, DNApolimerase, oligonucleotídeos e 1 µL de cada *primer*. As condições para a amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos; seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto para os *primers* BoF e BoR e 64°C por um minuto para os *primers* BiIA e BiIB, extensão a 73°C por dois minutos e extensão final a 73°C por cinco minutos. Todas as PCRs foram realizadas em termociclador Master Cycler Gradient™ (Eppendorf®).

As baterias de amplificação eram compostas pelas amostras testes, uma amostra controle positivo de *B. bovis* ou *B. bigemina* e uma amostra controle negativo onde o DNA molde foi substituído por igual volume de água ultra-pura.

As amostras que não apresentaram produtos de amplificação após a PCR, foram submetidas à nPCR. Os *primers* internos utilizados nesta segunda PCR foram também descritos por Figueroa et al. (1993) (Quadro 2). As reações de nPCR foram realizadas utilizando-se 2,5 µL do produto da reação de PCR e 10 µL do tampão de reação com a mesma composição anteriormente descrita para as reações de PCR, porém com seqüências iniciadoras internas.

Quadro 2. Seqüências iniciadoras internas (*primers*) para amplificação de DNA de *Babesia bovis* e *B. bigemina*.

Espécie	Seqüência	Olidonucleotídeos (5' - 3')	Produto Amplificado (pb*)
<i>Babesia bovis</i>	BoFN	TCA ACA AGG TAC TCT ATA TGG CTA CC	290
	BoRN	CTA CCG AGC AGA ACC TTC TTC ACC AT	
<i>Babesia bigemina</i>	BiIAN	CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC	170
	BiIBN	CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG	

*Pares de base.

Os ciclos de amplificação de DNA foram os mesmos descritos anteriormente, com temperatura de anelamento dos *primers* de 70°C para *B. bigemina* e 65°C para *B. bovis*.

Como controle positivo das reações de nPCR foram utilizadas amostras de DNA controle da reação de PCR diluídas a 1:1000. A amostra negativa do teste foi a reação de PCR contendo apenas água bidestilada.

Eletroforese

Os produtos finais da PCR e da nPCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) utilizando-se tampão tris borato edta (TBE) 1X, após aplicou-se corrente de 80V/50mA por aproximadamente 80 minutos.

Os produtos amplificados de *B. bovis* e *B. bigemina* foram identificados por comparação com marcadores de peso molecular de 100 pares de bases (Ladder-Gibco BRL), em transluminador sob luz ultra-violeta e fotografados com câmera digital Canon acoplada a filtro UV e analisados com sistema de fotodocumentação LGC-030.

Epidemiologia

A avaliação epidemiológica foi realizada de acordo com estudos conduzidos por Coleman et al. (2001), onde os autores postulam que existem somente dois critérios para se determinar a estabilidade endêmica para uma patologia: (1) as doenças, pelo menos sobre o ponto de vista da faixa etária, são menos patogênicas em animais jovens do que em animais adultos, sendo que este critério pode ser descrito matematicamente como a taxa de variação (Δ) na probabilidade que a infecção causar doença (Δ) com relação a idade (Δ), sendo esta maior que zero, ou $\Delta/\Delta > 0$, sobre a faixa etária; e (2) infecções iniciais diminuem a probabilidade de infecções subseqüentes causarem doença, sendo este critério descrito matematicamente como a taxa de variação na probabilidade de se tornarem susceptíveis para a doença (S) com relação a idade (Δ) deve ser menor que zero, ou $\Delta S/\Delta < 0$, sobre uma faixa etária.

Resultados

Rondônia

Pela análise das 1.388 amostras de coágulo sanguíneo bovino proveniente das microrregiões estudadas no Estado de Rondônia, correspondentes a 0,16% do rebanho bovino do Estado na faixa etária entre quatro e 12 meses, observou-se que 125 (9,0%) das amostras testes foram positivas pela amplificação do DNA de *B. bovis* e 1.263 negativas, correspondendo a 91,0% do total de amostras analisadas (Fig. 5).

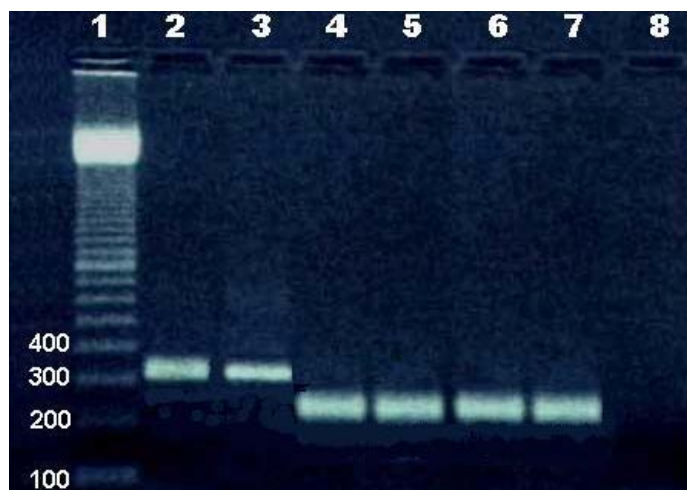


Fig. 5. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Babesia bovis* pelas técnicas de PCR (canaletas 1 e 2) e nPCR (calanetas 4 a 7); 1. Padrão de pares de base; 2. produto de amplificação de 350 pb de amostra teste; 3. produto de amplificação com 350 pb proveniente do controle positivo (vacina); 4. produto de amplificação com 290 pb proveniente de amostra teste da mesorregião do Madeira Guaporé, Rondônia; 5. produto de amplificação com 290 pb proveniente de amostra teste da mesorregião do Leste Rondoniense, Rondônia; 6. produto de amplificação com 290 pb proveniente de amostra teste da mesorregião do Vale do Acre, Acre; 7. produto de amplificação com 290 pb proveniente do controle positivo (vacina); 8. dímeros provenientes do controle negativo da reação não evidenciando contaminação da reação.

A prevalência de *B. bovis* nos rebanhos de Rondônia é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Prevalência de *Babesia bovis* nos rebanhos bovinos amostrados nas microrregiões de Rondônia.

Microrregiões de Rondônia	Amostras: total	Amostras positivas	Amostras negativas	Prevalência de <i>Babesia bovis</i> no rebanho (%)
Alvorada do Oeste	120	18	102	15,00
Ariquemes	115	14	101	12,17
Cacoal	323	30	193	9,28
Guajará-Mirim	237	24	213	10,12
Ji-Paraná	242	24	218	9,91
Porto Velho	289	15	274	5,19
Vilhena	62	0	62	0,00
Total	1.388	125	1.263	9,00

A mesorregião Madeira Guaporé apresentou uma prevalência de 7,41% do rebanho amostrado infectado por *B. bovis*. As amostras analisadas nesta mesorregião correspondem a 37,89% do total. Na mesorregião Leste Rondoniense a prevalência foi de 6,19% de infecção, e correspondem a 62,10% das amostras avaliadas em todo o Estado de Rondônia, representadas pelas microrregiões de Alvorada do Oeste, Ariquemes, Cacoal, Ji-Paraná e Vilhena.

A taxa de infecção de 9,00% de *B. bovis* observada nos rebanhos bovinos criados nas microrregiões de Rondônia, indicam que essas regiões fisiográficas encontram-se em situação de instabilidade enzoótica para este parasita, segundo os critérios utilizados por Mahoney e Ross (1972) e Coleman et al. (2001) para classificar a situação epidemiológica das doenças que acometem populações.

Com relação a prevalência de *B. bigemina*, verificou-se que 43 (3,09%) das amostras testes foram positivas pela amplificação do DNA de *B. bigemina* e 1.345 negativas, correspondendo a 96,91% do total de amostras (Fig. 6).

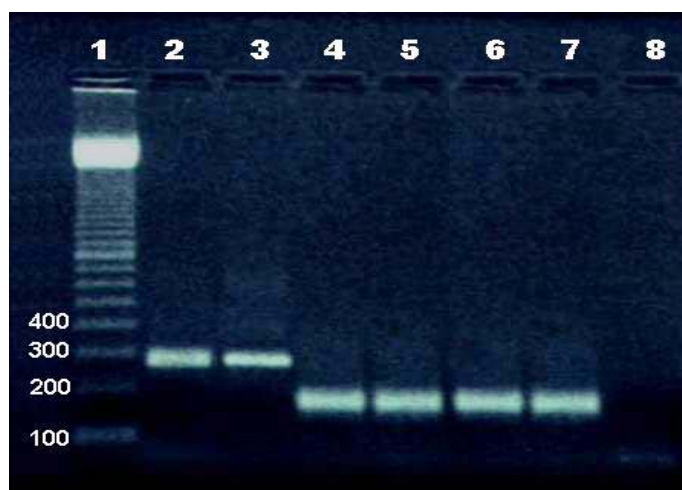


Fig. 6. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Babesia bigemina* pelas técnicas de PCR (canaletas 1 e 2) e nPCR (calanetas 4 a 7); 1. Padrão de pares de base; 2. produto de amplificação de 278 pb de amostra teste; 3. produto de amplificação com 278 pb proveniente do controle positivo (vacina); 4. produto de amplificação com 170 pb proveniente de amostra teste da mesorregião do Madeira Guaporé, Rondônia; 5. produto de amplificação com 170 pb proveniente de amostra teste da mesorregião do Leste Rondoniense, Rondônia; 6. produto de amplificação com 170 pb proveniente de amostra teste da mesorregião do Vale do Acre, Acre; 7. produto de amplificação com 170 pb proveniente do controle positivo (vacina); 8. dímeros provenientes do controle negativo da reação não evidenciando contaminação da reação.

A prevalência de *B. bigemina* nos rebanhos de Rondônia é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Prevalência de *Babesia bigemina* nos rebanhos bovinos amostrados nas microrregiões de Rondônia.

Microrregiões de Rondônia	Amostras: total	Amostras positivas	Amostras negativas	Prevalência de <i>Babesia bigemina</i> no rebanho (%)
Alvorada do Oeste	120	3	117	2,50%
Ariquemes	115	0	115	0,00%
Cacoal	323	5	318	1,54%
Guajará-Mirim	237	2	235	0,84%
Ji-Paraná	242	5	237	2,06%
Porto Velho	289	25	264	8,65%
Vilhena	62	3	59	4,83%
Total	1.388	43	1.345	3,09%

A mesorregião Madeira Guaporé apresentou uma prevalência de 6,33% do rebanho amostrado infectado por *B.bigemina*. As amostras analisadas nesta mesorregião correspondem a 37,89% do total. Na mesorregião Leste Rondoniense a prevalência foi de 1,66% de infecção, e correspondem a 62,10% das amostras avaliadas em todo o estado de Rondônia, representadas pelas microrregiões de Alvorada do Oeste, Ariquemes, Cacoal, Ji-Paraná e Vilhena.

A taxa de infecção de 3,09% para *B.bigemina* nos rebanhos bovinos criados nas microrregiões de Rondônia, indicam que essas regiões fisiográficas encontram-se em situação de instabilidade enzoótica para este parasita, segundo os critérios utilizados por Mahoney e Ross (1972) e Coleman et al. (2001) para classificar a situação epidemiológica das doenças capazes de causar patologias em populações.

Acre

Os estudos preliminares em 225 amostras sangüneas proporcionaram o diagnóstico de 16 amostras positivas pela amplificação do DNA de *B.bovis* (Fig. 5) e 208 amostras negativas, correspondendo a uma prevalência de 7,11% de *B. bovis* nos rebanhos amostrados. A prevalência de *B. bovis* nos rebanhos do Acre é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Prevalência de *Babesia bovis* nas microrregiões do Acre.

Microrregiões do Acre	Amostras: total	Amostras positivas	Amostras negativas	Prevalência de <i>B.bovis</i> no rebanho (%)
Brasiléia	55	1	54	1,81%
Cruzeiro do Sul	45	1	44	2,22%
Rio Branco	90	13	77	14,4%
Tarauacá	35	1	34	2,85%
Total	225	16	208	7,11%

A mesorregião Vale do Juruá apresentou uma prevalência de 2,53% do rebanho amostrado infectado por *B.bovis*. As amostras analisadas nesta mesorregião correspondem a 35,27% do total, sendo representada pelas microrregiões de Cruzeiro do Sul e Tarauacá. Na mesorregião Vale do Acre, onde encontram-se as microrregiões de Brasiléia e Rio Branco, a prevalência de *B. bovis* foi de 9,65%no rebanho amostrado.

A taxa de infecção de 7,11% para *B.bovis* nos rebanhos bovinos criados nas microrregiões do Acre, indicam que essas regiões fisiográficas também encontram-se em situação de instabilidade enzoótica para este parasita, segundo os critérios utilizados por Mahoney e Ross (1972) e Coleman et al. (2001) para classificar a situação epidemiológica das doenças capazes de causar doenças em populações.

A prevalência de *B. bigemina* por microrregiões é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Prevalência de *Babesia bigemina* nas microrregiões do Acre.

Microrregiões do Acre	Amostras: total	Amostras positivas	Amostras negativas	Prevalência de <i>Babesia bigemina</i> no rebanho (%)
Brasiléia	55	1	54	1,81%
Cruzeiro do Sul	45	0	45	0%
Rio Branco	90	0	90	0%
Tarauacá	35	1	34	2,85%
Total	225	2	223	0,89%

A mesorregião Vale do Juruá apresentou uma prevalência de 1,26% do rebanho amostrado infectado por *B. bigemina*. As amostras analisadas nesta mesorregião correspondem a 35,27% do total, sendo representadas pelas microrregiões de Cruzeiro do Sul e Tarauacá. Na mesorregião Vale do Acre, onde encontram-se as microrregiões de Brasiléia e Rio Branco, a prevalência de *B. bigemina* foi de 0,69% no rebanho amostrado (Tabela 8).

A taxa de infecção de 0,89% para *B. bigemina* nos rebanhos bovinos criados nas microrregiões do Acre, indicam que essas regiões fisiográficas também encontram-se em situação de instabilidade enzoótica para este parasita, segundo os critérios utilizados por Mahoney e Ross (1972) e Coleman et al. (2001) para classificar a situação epidemiológica das doenças capazes de causar doenças em populações.

Discussão

As técnicas biomoleculares de diagnóstico têm constituído uma importante ferramenta na pesquisa epidemiológica, principalmente no estudo das infecções parasitárias, pois possibilitam identificar indivíduos portadores assintomáticos que apresentam grande importância na manutenção das endemias. A aplicação destas técnicas na infecção por *Babesia* spp. possibilita um incremento ao estado da arte da parasitemia, ampliando os conhecimentos sobre a dinâmica da infecção, a qual poderá ter uma abordagem voltada ao controle e profilaxia da enfermidade.

Nas regiões de ocorrência das babesioses bovinas, o comportamento dos animais jovens e adultos difere em vários aspectos. De modo geral, os bezerros são considerados mais resistentes às infecções, uma vez que a taxa de inoculação dos parasitas é suficiente para infectar os bezerros antes que a resistência promovida via colostro desapareça, o que se dá entre os seis e nove meses de idade (MAHONEY et al., 1981). Onde a endemia é estável para *Babesia* spp., casos clínicos são observados primordialmente nos bezerros, já que os animais adultos desenvolvem, pela prolongada exposição, sólida resistência aos protozoários.

Áreas onde a endemia é instável, surtos de babesioses acometem animais jovens e adultos, com conseqüências mais graves para animais adultos, uma vez que a taxa de inoculação depende do número de carrapatos presentes e de sua própria taxa de infecção, fatores que venham interferir na sobrevivência e na taxa de infecção de *R. (B.) microplus* pelos protozoários podem ser responsáveis pela redução da taxa de inoculação (GUGLIELMONE, 1995), tendo como conseqüência o aparecimento de uma situação de instabilidade enzoótica. Smith (1982) descreve que somente uma larva de *R. (B.) microplus* a cada 2.500, pode-se encontrar a presença de *Babesia* spp.

Segundo Guglielmono (1995), os fatores que dão origem a situação de instabilidade endêmica para *Babesia* spp. incluem: condições climáticas extremas para o desenvolvimento do vetor biológico e controle intensivo de carrapatos. Além disso, é esperado que em regiões favoráveis ao desenvolvimento de *R. (B.) microplus* e na ausência de controle deste vetor, situações de instabilidade podem acontecer em rebanhos com elevados níveis de resistência ao carrapato.

Vários autores consideram que a raça dos bovinos pode influenciar na ocorrência de doenças transmitidas por carrapato (BOCK et al., 1999b; JONSSON et al., 2000), onde pode-se destacar a elevada resistência de bovinos zebuínos à infestação por *R. (B.) microplus*.

A ocorrência do vetor biológico, *R. (B.) microplus* em todas as épocas do ano parasitando os animais nos Estados de Rondônia e Acre são uma forte evidência de que a babesiose bovina ocorre de forma endêmica estável nesses estados. Outro fato é que, de um modo geral, as manifestações clínicas de TPB são mais raras em animais zebuínos, como o Nelore e seus cruzamentos (BOCK et al., 1997), sendo essa resistência ainda mais evidente quando os animais nascem em áreas endêmicas para a TPB e não compartilham pastagens com animais de origem européia (MADRUGA et al., 1984; SOARES et al., 2000; SOUZA et al., 2000). Parecendo esta, ser a situação predominante nas microrregiões estudadas nos Estados de Rondônia e Acre.

A ocorrência de TPB, inclusive com óbitos na sua maioria de bezerros, não se mostra contrária a uma situação de endemia estável, pois de acordo com Coleman et al. (2001), a prior-infecção é mais grave em animais adultos que em animais jovens e, a infecção na fase inicial da vida diminui a probabilidade de infecções subseqüentes ou a probabilidade de que infecções subseqüentes resultem em enfermidade clínica. Portanto, o perfil dos rebanhos bovinos criados em Rondônia e no Acre é mais um indicativo de que a babesiose se mantém nestes estados sob a forma de endemia estável, a despeito da resistência dos animais aos carrapatos.

A respeito da resistência dos animais que compõem os rebanhos de Rondônia e do Acre aos carrapatos, os dados obtidos no presente estudo indicam que mesmo em áreas que apresentam condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento dos carrapatos, a resistência genética pode ser decisiva na dinâmica das infestações por *R. (B.) microplus*.

De acordo com Jonsson (2006), sob uma mesma condição de exposição às formas de vida livre, bovinos de raças zebuínas puras (*Bos indicus*) albergam apenas 10% a 20% dos carrapatos que parasitam os taurinos puros (*Bos taurus*).

Tendo em vista as considerações de Uilenberg (1995), de que a elevada resistência dos animais de origem zebuína, teoricamente, seria suficiente para reduzir a taxa de inoculação de *Babesia* spp. necessária à manutenção da estabilidade endêmica, amostras de soro bovino provenientes dos rebanhos criados nas microrregiões de Rondônia e Acre estudadas deverão ser coletadas para a pesquisa de anticorpos específicos contra *B. bovis* e *B. bigemina*, já que a probabilidade de ocorrência de surtos pode ser estimada, de forma indireta, pela proporção de bezerros infectados através da detecção dos níveis de anticorpos específicos na população (MAHONEY et al., 1973; FAO, 1984).

A maior resistência dos animais jovens, especialmente de bovinos de raças zebuínas à infecção por *B. bovis* (BOCK et al., 1997) é outra causa da baixa parasitemia diagnosticada

Apesar da alta sensibilidade e especificidade das técnicas baseadas na amplificação do DNA (PCR/nPCR), casos de falsos-negativos podem ocorrer, principalmente em consequência da presença de substâncias inibidoras da polimerase, presentes comumente em amostras de sangue e em materiais biológicos (HAYDEN, 1991). No presente estudo, a possibilidade de

ocorrência de falsos negativos foi prevenida pela utilização de uma coluna especial para extração das amostras de DNA, que propicia a obtenção de amostras com baixa contaminação por substâncias que possam inibir a reação de amplificação. Neste trabalho, os possíveis resultados falso-negativos devem ser atribuídos ao limiar de sensibilidade de cada técnica utilizada que se situa em torno de 0,00003% de eritrócitos parasitados nas reações de PCR e de 0,0000003% nas reações de nPCR, respectivamente.

A ocorrência de falso-negativos devido ao limiar de sensibilidade da técnica de amplificação de DNA foi observada pela quase totalidade das amostras positivas para *B. bovis* e *B. bigemina* necessitaram de uma segunda amplificação por nPCR.

Essas constatações indicam que as parasitemias por *Babesia* spp. ocorrem em níveis abaixo do limiar de sensibilidade da PCR, já que na maioria das amostras em que foram detectadas o DNA dos parasitas, a detecção foi realizada exclusivamente pela técnica de nPCR.

Devido à elevada sensibilidade das técnicas baseadas na amplificação do DNA, a ocorrência de falsos-positivos tem sido constatada e relacionada, principalmente, à contaminação por aerossóis de DNA amplificado (*amplicons*). Buscando evitar essa contaminação, medidas preventivas foram adotadas, como a execução de cada etapa da técnica em um ambiente distinto e exclusivo, a esterilização de materiais utilizados e estabelecimento de áreas isoladas dentro do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Rondônia, o que determinou na não ocorrência de falso-positivos, uma vez que nenhuma amostra controle negativo apresentou bandas de amplificação.

Conclusões

1. As microrregiões estudadas nos Estados de Rondônia e do Acre apresentam taxas de parasitemia que permitem classificá-las como áreas de endemia instável para *Babesia bovis* e *B. bigemina*.
2. A técnica de PCR utilizada para diagnóstico mostrou-se adequada para a detecção de *Babesia bovis* e *B. bigemina* em bovinos, podendo ser indicada para a utilização em investigações epidemiológicas da babesiose. A complementação com técnicas sorológicas para identificação de anticorpos específicos a estes hemoprotozoários se fazem necessárias para avaliação de rebanhos bovinos resistentes à infestação por *R. (B.) microplus*.
3. Estudos sorológicos para evidenciação de anticorpos específicos para *B. bovis* e *B. bigemina* tornam-se necessários para elucidar de forma conclusiva a situação epidemiológica das babesioses bovinas nos Estados de Rondônia e do Acre.

Referências

ALVES, L.C. **Prevalência de babesiose em gado leiteiro no município de Garanhuns, Estado de Pernambuco**. 1987, 124f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARCI, L.A.G.; MACHADO, R.Z.; OLIVEIRA, M.R.; OLIVEIRA, D.A.; ARAÚJO, R.S. Influência de fatores (espécie do parasita, idade e população de animais na soropositividade da babesiose bovina em rebanhos leiteiros da região de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba, São Paulo. IN: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 8. ,1993, Londrina. **Anais...** Paraná: 1993. p. 6.

- BARKER, R.H. DNA probe diagnosis of parasitic infections. **Exp. Parasitol.**, v. 70, p. 494-99, 1990.
- 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*. **Aust. Vet. J.**, v.75, n.5, p.337-40, 1997.
- BOCK, R.E.; JACKSON, I. DE VOS, A.J.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitol.**, v. 129, n. 2, p. 247-69, 2004.
- 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* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.**, v. 77, n.7, p.461-4, 1999b.
- BOCK, R.E.; KINGSTON, T.G.; DE VOS, A.J. Effect of breed on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.**, v. 77, n. 11, p. 748-51, 1999a.
- BRITO, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S; MOURA, M.M.F.; SILVA NETTO, F.G.; MARIM, A.D.; SOUZA, G.C.R.; SILVA, J.L. **Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos**. Porto Velho; Embrapa Rondônia, 2006, 13 p. (Embrapa Rondônia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 43).
- BROCKLESBY, D. W. Recent observations on piroplasmiasis of cattle in the United Kingdom. **Bull. L'off. Int. Épizoot.**, v. 86, p. 19-26, 1976.
- CALLOW, L.L. The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. **Parasitol.**, v. 58, p. 663-70, 1968.
- COLEMAN, P.G.; PERRY, B.D.; WOOLHOUSE, M.E.J. Endemic stability – a veterinary idea applied to human public health. **The Lancet**, v. 357, p. 1284-6.
- FAO. **Ticks and tick-borne diseases control. A practical field manual**. V., II, Rome, p. 301-621, 1984.
- FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; BUENING, G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Vet. Parasitol.**, v. 50, p. 69-81, 1993.
- FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia* in the tick. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Florida:[s.n.], 1988. p. 23-52.
- GOMES, A.; HONER, M.R.; SCHENK, M.A., CURVO, J.B.E.. Populations of cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Ibagé and Nellore x European crossbreds in Brazilian savanna. **Trop. An. Health Prod.**, v., 21, p. 20-24, 1989.
- GOMES, A. O *Boophilus microplus*. In: KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose bovina**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1998. p. 10-46.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.
- GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Vet. Parasitol.**, v. 57, p. 109-19, 1995.

- GUGLIELMONE, A.A. The level of infestation with the vector of cattle babesiosis in Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 133-7, 1992.
- HAYDEN, J.D.; HO, S.A.; HAWKEY, P.M.; TAYLOR, G.R.; QUIRKE, P. The promises and pitfalls of PCR. **Vet. Med. Microbiol.**, v. 2, p. 129-37, 1991.
- HODGSON, J. H. Biology and Transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 653, p. 42-51, 1992.
- IBGE. **Microrregiões geográficas dos estados de Rondônia e Acre**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=3&i=P>. Acesso em: 24 nov. 2006.
- JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Vet. Parasitol.**, v. 137, p. 1-10, 2006.
- JONSSON, N.N.; MATSCHOSS, A.L.; PEPPER, P.; GREEN, P.E.; ANSELL, J. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by cattle tick (*Boophilus microplus*), **Vet. Parasitol.**, v. 89, p. 297-305, 2000.
- KAKOMA, I.; MELHORN, H. Babesia of Domestic Animals. In: KREIER, J.P. (Ed). **Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press, 1994. p. 141-216.
- KOGAN, K.M.; de la FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A.A.; MELÉNDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* in cattle. **Clin. Micro. Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.
- KUTLER, K.L. Chemotherapy of Babesiosis: A review In: RISTIC, M.; KREIER, J.P. (Ed). **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 65-86.
- KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. (Ed). **Babesiosis of domestic animals and man**. Florida: CRC-Press, 1988. v. 1, p. 1-15.
- LINHARES, G.F.C.; MASSARD, C.L.; ARAÚJO, J.L.B.; ALVES, L.C. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babés, 1888) em bovinos da região Centro-Oeste do Brasil. **Arq. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 85-91, 1992.
- MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; FIGUEIREDO, G.R.; CURVO, J.B.E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 19, n. 9, p. 1163-8, 1984.
- MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; PUTT, N. Epidemiologia da anaplasmosse e babesiose em bovinos da região de cerrado do Estado de Mato Grosso do Sul: I- Prevalência. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 35, n. 5, p. 631-40, 1983.
- MADRUGA, C.R.; MARQUES, A.P.C.; ARAÚJO, F.R.; MIGUITA, M.; CARVALHO, C.M.E.; ARAÚJO, F.S.; UMAKI, A.C.S.; CROCCI, A.J.; QUEIRÓZ, R.A. Evaluation of an Elisa for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and it's application in an epidemiological survey in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 2, p. 72-76, 2001.
- MAHONEY, D.F.; WRIGHT, I.G.; MIRRE, G.B. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infections. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 67, p. 197-203, 1973.

MAHONEY, D.F.; MIRRE, G.B. The selection of larvae of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). **Res. Vet. Science**, v. 23, p. 126-7, 1977.

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

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v. 55, p. 335-350, 1987.

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

PATARROYO, J.H.; RIBEIRO, M.F.B.; SANTOS, J.L.; FARIA, J.E. Epidemiologia das babesioses bovinas no Estado de Minas Gerais I-Prevalência de anticorpos fluorescentes na Zona da Mata - MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 39, n. 3, p. 423-9, 1987.

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

RIEK, R.F. The cycle of *Babesia bigemina* (Smith & kilborne , 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Aust. J. Agric. Res.**, v.15, p.802-21, 1964.

SARTOR, I.F. FACCINI, J.L.H.; KUCHEMUCK, M.R.G.; CURI, P.R. Estudo comparativo da resistência ao carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARI) em bovinos das raças Gir, Holandesa e mestiços ½ Gir-Holandês. **Ver. Vet. e Zoot.**, v. 4, p. 25-33, 1992.

SMEENK, I.; KELLY, P.J.; WRAY, K.; MUSUKA, G.; TREES, A.J.; JONGEJAN, F. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 71, n. 1, p. 21-4, 2000.

SMITH, R. Epidemiologia de la anaplasmosis y la babesiosis bovinas. **IICA Public Científ.**, n. 1, p. 266-321, 1982.

SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C.R.; CUNHA, N.C.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 26-30, 2000.

UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. **Vet. Parasitol.**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 2006.

UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Vet. Parasitol.**, v. 57, n. 1-3, p. 19-41, 1995.

VIDOTTO, O.; McELWAIN, T.F.; MACHADO, R.Z.; PERRYMAN, L.E.; SUAREZ, C.E.; PALMER, G.H. *Babesia bigemina*: identification of B cell epitopes associated with parasitized erythrocytes. **Exp. Parasitol.**, v. 81, n. 4, p. 491-500, 1995.

WAGNER, G.; CRUZ, D.; HOLMAN, P.; WAGHELA, S.; PERRONE, J.; SHOMPOLE, S.; RURANGIRWA, R. Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, supl. III, p. 193-9, 1992.