

DINÂMICA DA INFECÇÃO NATURAL POR *Babesia bigemina* EM BEZERROS A PARTIR DO NASCIMENTO DETECTADO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA,¹ GUIDO FONTGALLAND COELHO LINHARES,² LUCI SAYORI MURATA,³ FRANCISCO ERNESTO BERNAL,⁴ FERNANDO ARARIPE TORRES⁵ E CLÁUDIO ROBERTO MADRUGA⁶

1. Professora, FAV-UnB, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Área Medicina Preventiva

2. Professor da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás

3. Professora, FAV-UnB, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária Área Medicina Preventiva

4. Professor, FAV-UnB, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária Área Medicina Preventiva

5. Professor, Instituto de Biologia – UnB

6. EMBRAPA – CNPGC

RESUMO

Com o objetivo de estudar por PCR a dinâmica da infecção natural da *Babesia bigemina* em bezerros criados em sistema extensivo, foram colhidas 266 amostras de sangue de um grupo de 37 bezerros, a partir do nascimento até aproximadamente 165 dias de vida, com intervalo médio de 19 dias entre as colheitas. Distribuíram-se as amostras de acordo com os grupos de diferentes faixas etárias (entre 0 e 15 dias, entre 16 e 30 dias e assim sucessivamente até 165 dias). Do total de 266 amostras, 116 (43,60%) mostra-

ram-se positivas para a PCR. A reação foi capaz de detectar a presença do parasito em todos os intervalos das colheitas e registrou-se o maior número de primo-infecções – 12 em 37 (32,43%) – no período de 31 a 45 dias. Dos 37 bezerros estudados, apenas um apresentou resultado da PCR positivo nos dois grupos de faixa etária inferior a 31 dias. Este animal apresentava dois dias de vida no momento da colheita, sugerindo um caso de transmissão transplacentária de *B. bigemina*.

PALAVRAS-CHAVES: *Babesia bigemina*, bovino, infecção, PCR.

ABSTRACT

DYNAMIC OF NATURAL INFECTION IN NEWBORN CALVES EXPOSED TO BY *Babesia bigemina* AS DETECTED BY POLIMERASE REACTION CHAIN

With the objective of using PCR to study the dynamic of natural infection caused by *Babesia bigemina* in calves livestock in extensive system, 266 samples of blood were collected from a group of 37 calves from birth to approximately 165 days old. The samples were collected with an average interval of 19 days and distributed according to age 0 to 15 days old, 16 to 30 days and successively until 165 days. Out of the total of the 266 samples, 116 (43.60%)

were PCR positive. The reaction detected the presence of the parasite in all the intervals of collection and most of the prime infection, 12 in 37 (32.43%) were detected in the period between 31 and 45 days. Out of the 37 calves analysed, only one presented a positive PCR result within the two groups aged under 31 days. This animal was two days old at the moment of the collection. This result suggest a case of transplacental transmission of *Babesia bigemina*.

KEY WORD: *Babesia bigemina*, bovine, infection, PCR.

INTRODUÇÃO

O emprego de tecnologia para o melhoramento genético e nutrição do rebanho bovino, assim como o uso de técnicas avançadas de manejo e o desenvolvimento de pastagens melhoradas têm contribuído para o crescimento da bovinocultura da região Centro-Oeste. No entanto, problemas sanitários, como doenças parasitárias – as hemoparasitoses –, permanecem como entraves que impedem a máxima produtividade. O desenvolvimento e a viabilização de métodos de diagnósticos precisos, confiáveis e de baixo custo são necessários visando a avanços nos programas de profilaxia e controle de doenças.

O clima da região Centro-Oeste é predominantemente tropical, com verão chuvoso e inverno seco, favorável ao ciclo biológico do carrapato – *Boophilus microplus* –, vetor da babesiose bovina nas Américas (LINHARES, 1992). As condições climáticas permitem o desenvolvimento de quatro gerações anuais, permitindo a infestação dos bovinos durante todo o ano, principalmente nos meses de agosto, setembro e outubro. Concomitantemente, nesse mesmo período ocorre o nascimento de grande quantidade de bezerros, cujo risco à enfermidade aguda é elevado (KESLLER et al., 1987).

A babesiose bovina é uma doença parasitária, e no Brasil tem como agentes etiológicos os hematozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina*, transmitidos pelo carrapato vetor *B. microplus*. Na forma clínica se observam febre, anemia, hemoglobinúria e a presença de hemoparasitos no sangue (LINHARES et al., 1992). Na América Latina, os prejuízos anuais em decorrência da babesiose bovina são de aproximadamente US\$ 513 milhões (MONTENEGRO-JAMES et al., 1992). Segundo LINHARES et al. (1992), no Brasil, a associação de *B. microplus* e as doenças transmitidas por esse ixodídeo chegam a prejuízos estimados acima de um bilhão de dólares anualmente. Assinale-se que trabalhos realizados em diferentes regiões do Brasil têm demonstrado que a babesiose bovina ocorre de forma endêmica (ALVES, 1987; PATARROYO et al., 1987; ARAÚJO et al., 1997; MADRUGA et al., 2000).

Da mesma forma, o Estado de Goiás pode ser caracterizado como uma área endêmica de elevada estabilidade, tanto para *B. bigemina* quanto para *B. bovis* (LINHARES et al., 1992). Portanto, apesar de serem mínimas as possibilidades de ocorrência de surtos epidêmicos nas populações de bovinos adultos nativos, as condições epidemiológicas são de alto risco para animais procedentes de áreas livres, tornando-se uma barreira aos programas de melhoramento genético. Somam-se a isso as conseqüências econômicas verificadas em função do elevado número de casos clínicos em bezerros na ocasião da primo-infecção, com perdas em decorrência da diminuição do ganho de peso ou mortalidade. Conforme MADRUGA et al. (1984), em trabalho realizado no Centro-Oeste, o momento crítico da doença ocorre entre 30 e 120 dias após o nascimento, correspondendo ao período no qual os animais perdem a imunidade passiva e estão sendo expostos ao carrapato em condições naturais.

Apesar dos avanços nos métodos de diagnóstico nos últimos anos, KESLLER et al. (1987) relataram a falta de tecnologia mais eficiente. Segundo os autores, o método de diagnóstico por meio da pesquisa do parasito em esfregaços sanguíneos corados, procedimento convencional adotado pelos médicos veterinários em regiões de ocorrência, limita-se ao acompanhamento de casos clínicos. Entretanto, há vários estudos desenvolvidos e aperfeiçoados na área de imunodiagnóstico, com técnicas sorológicas tais como fixação de complemento, teste da congutinação rápida, imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta e imunoadsorção enzimática (ELISA). Essas técnicas são amplamente utilizadas, principalmente para levantamento epidemiológico de rebanhos, como pode ser observado nos trabalhos realizados por RODRIGUEZ et al. (1988), ARAÚJO et al. (1997), REDDY et al. (1997), VIDOTTO et al. (1997), MADRUGA et al. (2000).

Atualmente, com a aplicação da biologia molecular na detecção e caracterização de agentes patogênicos e, principalmente, com a introdução da técnica da reação em cadeia da polimerase

(PCR), alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos desde 1986 no sentido de adaptá-las ao diagnóstico de *B. bovis* e *B. bigemina* (FIGUEROA et al., 1992, BÖSE et al., 1995).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo monitorar o desenvolvimento da infecção natural por *B. bigemina* em bezerros a partir do nascimento, utilizando como método de diagnóstico a PCR. Para tanto, empregaram-se seqüências de oligonucleotídeos originalmente descritos por LINHARES et al. (2000), obtidos da seqüência de RNA ribossomal (SSrRNA) de *B. bigemina*. O estudo da dinâmica da infecção natural visou à detecção do momento crítico de suscetibilidade para bezerros criados em sistema extensivo, em condições naturais, em um área endêmica para *B. bigemina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo da infecção natural em bezerros

Grupo experimental

Neste estudo foram utilizados 37 bezerros mestiços (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*), recém-nascidos e mantidos em uma área sabidamente endêmica para *B. Bigemina*, segundo LINHARES et al. (1992), sob sistema de criação tradicional extensivo para corte no município de Turvânia, GO, no período de julho a dezembro de 2000. Os animais estavam sobre pastagem de *Brachiaria brizantha* e, segundo o CPTEC/INPE (Centro de Previsão de tempo e Estudos Climáticos do Instituto Nacional para Pesquisas Espaciais), em 2000, o volume médio de precipitação de chuvas foi de 120mm, com baixos volumes de precipitação nos meses de julho a setembro (~ 10mm) e maiores volumes nos meses de outubro a dezembro (~ 250mm). Em relação à temperatura, a média da região foi de 23°C, com temperatura mais baixa no mês de julho (~ 20°C) e mais altas nos meses de novembro a dezembro (~ 25°C).

Colheita e processamento do material

Realizou-se colheita de material regularmente no período de julho a dezembro de 2000,

com intervalo médio de aproximadamente dezoito dias, perfazendo-se um total de sete colheitas. As 266 amostras totais de sangue, obtidas dos 37 bezerros, colhidas em intervalos médios de dezoito dias, a partir do nascimento, foram separadas de acordo com a idade ficando, portanto, os grupos subdivididos em diferentes faixas etárias e os respectivos números de amostras da seguinte maneira: entre 0 e 15 dias (35 amostras), 16 e 30 dias (21 amostras), 31 e 45 dias (37 amostras), 46 e 60 dias (24 amostras), 61 e 75 dias (45 amostras), 76 e 90 dias (34 amostras), 91 e 105 dias (36 amostras), 106 e 120 dias (8 amostras), 121 e 135 dias (2 amostras), 136 e 150 dias (6 amostras) e finalmente entre 151 e 165 dias (18 amostras).

De cada animal coletaram-se, assepticamente, 10 mL de sangue, através de punção venojugular, empregando-se o sistema *vacutainer*¹ e acondicionaram-se as amostras em caixa de material isotérmico com gelo. No final do experimento, obteve-se um total de 266 amostras de sangue.

Identificação da *B. bigemina* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Origem do controle positivo para o PCR

As amostras de sangue positivas para *B. bigemina* utilizadas neste trabalho foram cedidas pela EMBRAPA – CNPGC – MS (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte – Mato Grosso do Sul). Elas foram preparadas a partir de amostra de sangue de bovino infectado com amostra pura de *B. bigemina*, em condições de isolamento, no momento de apresentação de níveis de parasitemia em torno 0,25%, conforme KESSLER et al. (1987).

Extração do DNA genômico de B. bigemina

Uma alíquota de cada amostra de sangue, colhida com anticoagulante durante o experimento, foi submetida ao processo de extração do DNA genômico, utilizando-se *kit* comercial,²

1. Venoject II – Terumo Medical Corporation Elkton®, MD – 21921 – m
2 AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH® - GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit – xy-072-00-03

seguinte-se o protocolo sugerido pelo fabricante, com padronização do volume da amostra para extração de 300µL de sangue total.

Oligonucleotídeos utilizados

Para a execução da reação em cadeia da

polimerase, empregaram-se os oligonucleotídeos GAU6 (*reverse*) e GAU7 (*forward*), previamente descritos por LINHARES et al. (2000) (Quadro 1), para a amplificação espécie-específica de um fragmento de 687 pb do gene que codifica para SSrRNA (*small subunit rRNA*) de *B. bigemina*.

QUADRO 1. Sequências de oligonucleotídeos para a amplificação específica de fragmento do gene SS rRNA de *B. bigemina* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Primer	Seqüência	Posição no seqüenciamento do gene	Especificidade
GAU6 (R [*])	5'- CCACGCTTGAAGCACAGGA-3'	1532-1515	<i>B. bigemina</i>
GAU7 (F [*])	5'- GTTGGGTCTTTTCGCTGGC-3'	848-866	<i>B. bigemina</i>

*R = *reverse primer*; *F = *forward primer*.

Fonte: LINHARES et al. (2000).

Sintetizaram-se previamente as seqüências dos oligonucleotídeos por uma companhia especializada,³ numa escala de síntese de 50 mMol, sob a forma liofilizada.

Os nucleotídeos liofilizados foram ressuspensos em água ultrapura (Milli-Q), ajustando-se a concentração da solução *stock* em 1µg/ 1µl. Ajustou-se a concentração da solução de trabalho para 20pMol, alíquotada em tubos do tipo *Eppendorf* de 1,5ml e armazenadas a -20° C.

Pré-experimento para avaliação da especificidade dos oligonucleotídeos *primers*

Inicialmente, para a verificação da especificidade dos iniciadores (*primers*) para *B. bigemina* utilizaram-se sete amostras de sangue de isolados do parasito (duas amostras oriundas do Estado de Goiás, uma amostra de cada um dos seguintes Estados: Mato Grosso do Sul, Rondônia, São Paulo, Rio Grande do Sul e Bahia), seis amostras de sangue contendo isolados de *B. bovis* (duas amostras oriundas de Goiás, duas amostras do Mato Grosso do Sul, uma amostra de São Paulo e uma da Bahia) e uma amostra de sangue contendo isolados de *Anaplasma marginale* oriunda do Mato Grosso do Sul. As amostras

foram testadas também contra o DNA de bovino livre de infecção. As amostras de sangue usadas neste pré-experimento apresentavam níveis de parasitemia variando entre 0,1% a 0,5%, o que se determinou por meio de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa.

Reação do PCR

Como medida de segurança, para prevenir qualquer tipo de contaminação, as diferentes fases de desenvolvimento da técnica do PCR foram executadas em quatro laboratórios, fisicamente separados, conforme LAUERMAN (1998), sendo um laboratório para a extração do DNA genômico das amostras, outro para a preparação da mistura de reação, outro para a inoculação do DNA e o quarto para a amplificação, eletroforese e documentação fotográfica.

Para o desenvolvimento da técnica, adotou-se protocolo de reação previamente descrito por LINHARES et al. (2000), conforme os seguintes parâmetros: para cada amostra foi preparada uma mistura (*master mix*) contendo 24,75µl de água altamente purificada (Mill-Q) em um tubo do tipo *Eppendorf* de 1,5 ml, adicionando-se 5µl de solução tampão (buffer 10X⁴, 1µl de

3. Life Technologies, GibcoBRL®

4. AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®-10X PCR Buffer

cada desoxirribonucleotídeo trifosfato⁵ (dNTP) na concentração de 10mM, 0,5µL de cada *primer* (*forward primer*: GAU7 5'-GTT GGG TCT TTT CGC TGG C-3' e *reverse primer*: GAU6 5'-CCA CGC TTG AAG CAC AGG A-3'), 0,25µL de *Taq* DNA polimerase⁶ (5 U/µL). O volume obtido (35µL) para cada amostra a ser testada foi então transferido para um tubo de PCR de 0,2mL⁷, no qual se inocularam 15µL de DNA genômico da amostra, perfazendo um volume total de 50µL. Para cada bateria de testes, incluíram-se uma amostra inoculada com DNA genômico de *B. bigemina*, como controle positivo, e uma amostra inoculada com água altamente purificada (sem DNA) como controle negativo para a reação. Os tubos de PCR foram então tampados e transferidos para um aparelho termociclador automático,⁸ previamente programado para os seguintes ciclos de temperatura: 94° C por dois minutos (etapa de desnaturação inicial), 39 ciclos sucessivos nas temperaturas de 94°C por trinta segundos (desnaturação das fitas de DNA), 55° C por trinta segundos (anelamento dos) e 72° C por um minuto (extensão das fitas de DNA) e, por último, apenas um ciclo a 72° C por cinco minutos, para otimizar a extensão final das fitas.

Em seguida, 12µL do produto do PCR (*amplicon*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose⁹ a 2,0% em solução de TAE 1x pH 8,3¹⁰ (LAUERMAN et al., 1995), em cuba de eletroforese,¹¹ com capacidade para 28 amostras. A distribuição das amostras no gel seguiu o modelo LAUERMAN et al. (1995), sendo que no primeiro poço foi colocado o marcador de DNA¹², no segundo o controle positivo, no último poço o controle negativo e, nos demais poços, os produtos de PCR das amostras em estudo. Realizou-se a eletroforese a 94 volts por cin-

quenta minutos. Posteriormente, corou-se o gel em solução de brometo de etídio a 0,25µg/mL durante vinte minutos e em seguida visualizou-se o produto amplificado em um transiluminador de ultravioleta,¹³ comparando-se o peso das bandas amplificadas (687bp) com as bandas do marcador de DNA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio da PCR para *B. bigemina*

Avaliação dos primers

A avaliação da reação do PCR empregando-se os GAU7 e GAU6¹⁴ para a amplificação específica de um fragmento de 687bp do gene que codifica a SSrRNA de *B. bigemina* apresentou resultados que demonstraram sua especificidade, discriminando este parasito de outros hemoparasitos endêmicos na região estudada (*B. bovis* e *Anaplasma marginale*), assim como o DNA do hospedeiro. De um total de 40 reações executadas (14 com DNA genômico de isolados de *B. bigemina*, 12 de *B. bovis* e 14 de *A. marginale*), o par utilizado demonstrou ser 100% específicos na amplificação do DNA de *B. bigemina* e não apresentou nenhuma reação cruzada com DNA de *B. bovis*, *A. marginale* ou DNA genômico da espécie bovina (Tabela 2 e Figura 1).

Esses resultados são semelhantes e confirmam aqueles reportados originalmente por LINHARES et al. (2000) para o mesmo par e protocolo.

O ensaio de PCR para *B. bigemina* e *B. bovis* tem sido utilizado com sucesso em diferentes protocolos, em que se empregam construídos a partir de diferentes genes, que se encontram referenciados na literatura, como segue: SpeI-AvaI fragmento de 0,3 kb, oriundo do gene pBbi16 (um derivado do gene pBR322 de *B. bigemina*, de 6,3-kb, subclonado no vetor pBluescript) (FIGUEROA et al., 1992); gene que codifica a *small-subunit* do rRNA (SSrRNA) de *B. bovis* (CALDER et al., 1993); gene que codifica uma proteína de superfície do merozoíto de *B. bo-*

13. marca HOEFER-AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®- modelo UV-25

14. LINHARES et al. (2000).

5. LIFE TECHNOLOGIES®-100mM dNTP Solution

6. AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®- Taq DNA polymerase recombinat

7. MβP PCR tubes – cat. 3412

8 Marca MJ. RESARCH INCORPORATION®- modelo PTC-100

9. LIFE TECHNOLOGIES®- Gel de Agarose

10. TAE 1X: 2ml de TAE 50X pH 8,3(121g de Tris Base, 28,6 ml de ácido glacial acético e 50 ml de EDTA à concentração de 0,5 molar) e 98 ml de água destilada. PH final de 8,3.

11. Marca LIFE TECHNOLOGIES®- modelo HORIZON 11-14

12. LIFE TECHNOLOGIES®- 100bp (pares de bases) DNA Ladder 1µg/µl

vis, de 60-kDa (SUAREZ et al., 1991; FIGUEIROA et al., 1993); gene BabR gene de *B. bovis* (MCLAUGHLIN et al., 1992); gene Bv80 de *B.*

bovis (BROWN et al., 1993), gene BvVA1 de *B. bovis* (DALRYMPLE et al., 1992; LEW et al., 1997)

TABELA 2. Resultados do ensaio de PCR usando a combinação dos GAU7 e GAU6 para a amplificação de fragmento de DNA (gene SSrRNA) de *Babesia bigemina*, com o respectivo amplicon

	DNA testado	Nº de amostras	PCR – positivo	Amplicon
GAU7/ GAU6	<i>B. bigemina</i>	14	14	687bp
GAU7/ GAU6	<i>B.bovis</i>	12	00	-
GAU7/ GAU6	<i>A. marginale</i>	14	00	-
Total		40	14	

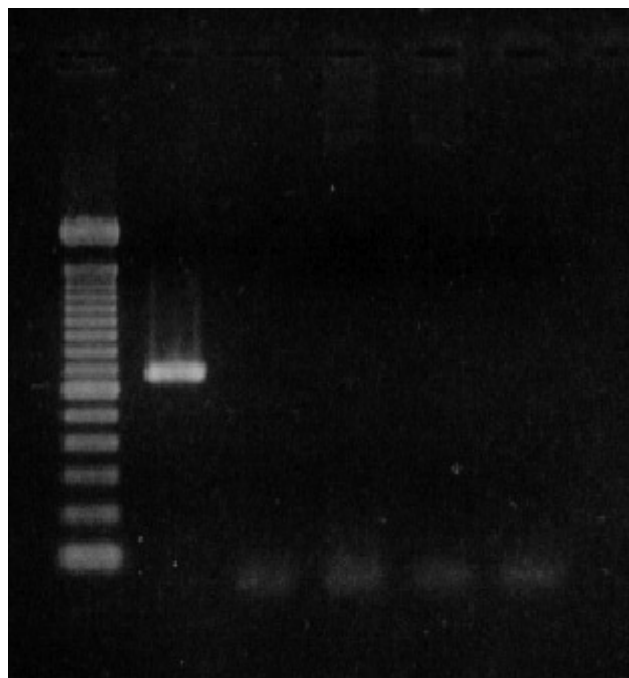


FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose 2% de 10µl de produto pela PCR na amplificação de fragmento do gene SSrRNA de *B. bigemina* com os GAU7/ GAU6. 1) marcador DNA 100bp; 2) amplicon de 687 bp de *B. bigemina*; 3) DNA de *B. bovis*; 4) DNA de *A. marginale*; 5) DNA genômico de bovino livre de infecção; 6) controle negativo.

Resultado da PCR para *Babesia bigemina*

O resultado da identificação de *B. bigemina*, nas 266 amostras de sangue, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), pode ser observado na Tabela 3. Ressalta-se que nenhum dos animais apresentou sinais clínicos de babesiose.

TABELA 3. Frequência das reações de PCR positivas para *B. bigemina* em amostras de sangue de bezerros de diferentes faixas etárias, do nascimento aos 165 dias de vida.

Idade (dias)	Nº de amostras	Reações positivas	Frequências (%)
0 a 15	35	1	2,80
16 a 30	21	1	4,76
31 a 45	37	14	37,80
46 a 60	24	15	62,50
61 a 75	45	24	53,33
76 a 90	34	20	58,24
91 a 105	36	19	52,77
106 a 120	8	5	62,50
121 a 135	2	1	50,0
136 a 150	6	4	66,60
151 a 165	18	12	66,60
Total	266	116	43,60

Os resultados do ensaio da PCR tabulados com o objetivo de registrar apenas o primeiro exame positivo para cada bezerro durante o experimento, como apresentado na Tabela 4, registraram a ocorrência de primo-infecções em porcentagens variadas em 32 dos 37 bezerros estudados, entre os grupos de faixas etárias de 0 a 15 dias até 136 a 150 dias, com exceção para animais de idade entre 16 e 30 dias e de 76 a 90 dias. Apesar de as primo-infecções terem sido verificadas durante quase todo o período, a maior frequência foi registrada em bezerros com idade entre 31 e 45 dias (Figura 2), correspondendo a uma frequência de 32,43% do total de animais estudados. Ao final do experimento, observou-

se que a PCR foi capaz de detectar DNA de *B. bigemina* em 32 animais que apresentaram, no mínimo, um teste positivo durante o período de colheita, correspondendo a 86,45 % do grupo de 37 bezerros.

Os resultados obtidos neste trabalho referentes à ocorrência de maior número de primo-infecções em bezerros com idade entre 31 e 45 dias de vida corroboram os relatados por MADRUGA et al. (1984) que, em estudo sobre infecção natural em bezerros criados em sistema extensivo na região de cerrado, verificaram decréscimo dos níveis de anticorpos maternos anti-*B. bigemina* entre 28 e 56 dias pós-nascimento. Portanto, a maior ocorrência de primo-infecções nessa faixa etária pode estar relacionada ao início da fase suscetível, que corresponde ao período de transição entre a perda da imunidade passiva e a aquisição da imunidade ativa. Entretanto, alguns autores, como JAMES (1988), consideraram que bezerros de áreas endêmicas perdem a imunidade materna por volta do terceiro mês de vida.

Dos 37 bezerros estudados, apenas um apresentou resultado pela PCR positivo nos dois grupos de faixa etária inferior a 31 dias (Tabela 4). Esse animal (Figura 3) apresentava dois dias de vida no momento da colheita, sugerindo um

caso de transmissão transplacentária de *B. bigemina*. Trata-se de tipo de transmissão que, apesar de ser considerada de baixa ocorrência, tem sido reportada para algumas espécies do gênero (CORREA, 1974; LOSOS, 1986; FRIEDHOFF, 1988).

TABELA 4. Frequência absoluta e relativa das primo-infecções detectadas pela PCR em 37 bezerros acompanhados do nascimento aos 165 dias de vida, criados em sistema extensivo no município de Turvânia, GO

Idade (dias)	Frequências dos resultados positivos	
	Absoluta	Relativa (%)
0 a 15	1	2,70
16 a 30	0	0,00
31 a 45	12	32,43
46 a 60	6	16,21
61 a 75	5	13,51
76 a 90	0	0,00
91 a 105	3	8,10
106 a 120	2	5,40
121 a 135	1	2,70
136 a 150	2	5,40
151 a 165	0	0,00
Total	32	86,45

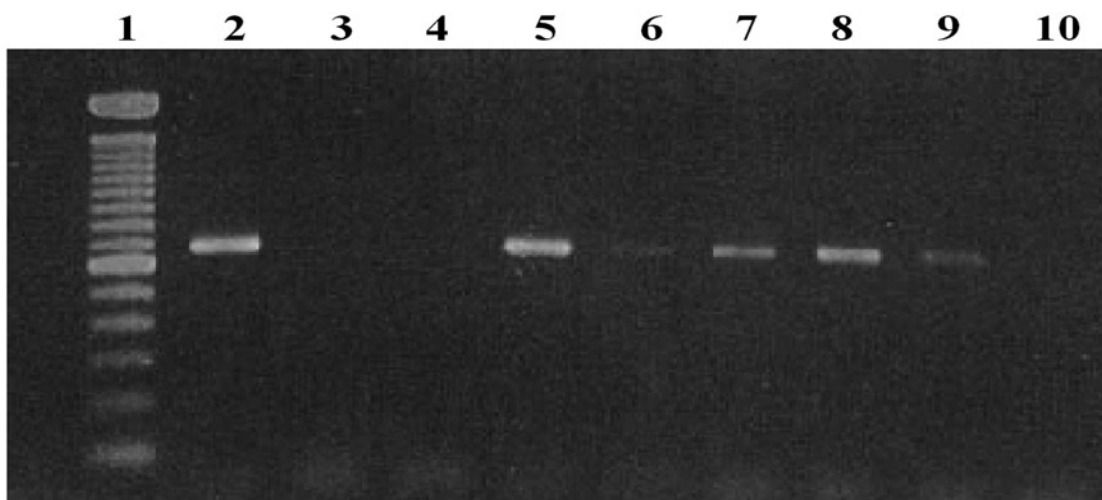


FIGURA 2. Produto da PCR obtido pela amplificação de fragmento do gene SSrRNA de *B. bigemina* do bezerro nº 5, em sete amostras de sangue colhidas a partir do nascimento: 1) marcador DNA 100 bp; 2) controle positivo de *B. bigemina*: amplicon de 687 bp; 3) primeira colheita – cinco dias de vida; 4) segunda colheita – 23 dias de vida; 5) amplicon de 687 bp de *B. bigemina* aos 32 dias de vida = primo-infecção; 6) amplicon de 687 bp de *B. bigemina* aos 60 dias de vida; 7) amplicon de 687 bp de *B. bigemina* aos 71 dias de vida; 8) amplicon de 687 bp de *B. bigemina* aos 81 dias de vida; 9) amplicon de 687bp de *B. bigemina* aos 96 dias de vida; 10) controle negativo.

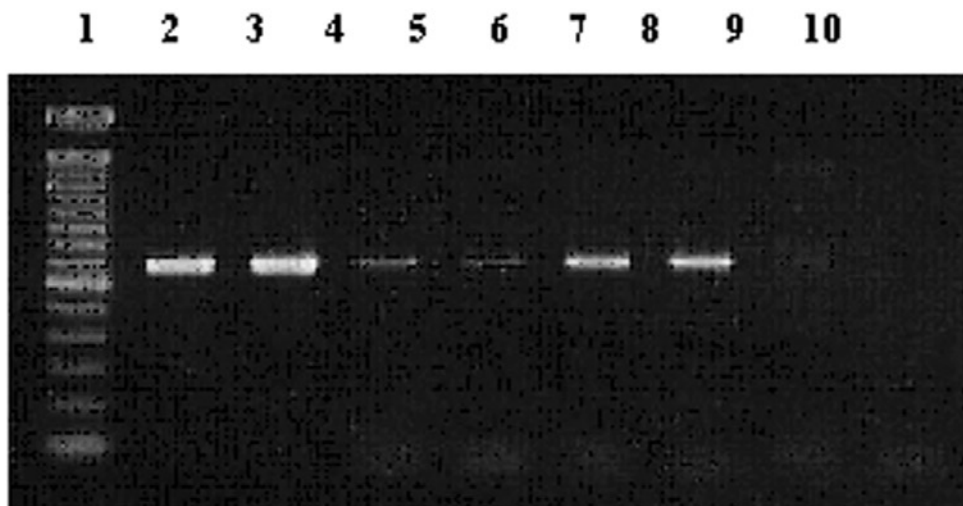


FIGURA 3. Produto da PCR obtido pela amplificação de fragmento do gene SSrRNA de *B. bigemina* em amostras de sangue do bezerro nº 39 colhidas a partir do nascimento: 1) marcador DNA 100 bp; 2) controle positivo de *B. bigemina* – amplicon de 687 bp; 3) amplicon de 687 bp de *B. bigemina* no segundo dia de vida; 4) amplicon de *B. bigemina* aos 31 dias de vida; 5) amplicon de *B. bigemina* aos 37 dias de vida; 6) amplicon de *B. bigemina* aos 51 dias de vida; 7) amplicon de *B. bigemina* aos 58 dias de vida; 9) controle negativo.

CONCLUSÕES

O protocolo e os avaliados neste estudo foram efetivos para a amplificação específica de um fragmento do gene que codifica a SSrRNA de *Babesia bigemina*, discriminando-a de forma precisa de *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale* e do DNA do hospedeiro. O ensaio pela PCR mostrou-se eficaz no estudo da dinâmica da infecção natural por *B. bigemina* em bezerros criados em sistema extensivo em área endêmica, detectando animais positivos em todas as faixas etárias. As primo-infecções verificadas pela PCR predominaram em bezerros com idade entre 31 e 45 dias, sendo este considerado o período crítico de maior suscetibilidade.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L.C. **Prevalência da babesiose em gado leiteiro no município de Garanhuns, Estado de Pernambuco.** 1987, 124 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, São Paulo, 1987.
- ANUALPEC – ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA. São Paulo: Argos Comunicação, 2006. 369 p.
- ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; ALMEIDA, M.A.O.; LEAL, C.R.B.; MIGUITA, M. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste da aglutinação rápida. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, p.111-115, 1997.
- BÖSE R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEDHOFF, K.T.; VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 61-74, 1995.
- BROWN, W.C.; ZHAO, S.; WOODS, V.M. Identification of two Th1 cell epitopes on the *Babesia bovis* – encoded 77 kDa merozoite protein (*Babesia* – 1) by use of truncated recombinant fusion proteins. **Infection Immunology**, v. 61, p. 236-244, 1993.
- CALDER, J.A.M.; REDDY, G.R.; CHIEVES, L.; COURTNEY, C.H.; LITTEL, R.; LIVENGOOD, J.R.; NORVAL,R.A.I.; SMITH, C.; DAME, J.B. Monitoring I infections in cattle by using PCR – Based tests. **Journal of Clinical Microbiology**, nov., p. 2748-2755, 1996.
- CORRÊA, W.M. Babesiose canina: transmissão transplacentária. **Biológico**, v. 40, n.11, p.321-322, 1974.
- CPTEC/ INPE – Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos do Instituto Nacional para Pesquisas Espaciais.

Condições climáticas sobre o Brasil durante novembro e início de dezembro de 2000. Disponível em: <http://www.cptec.inpe.br>. Acesso em: 29 jan. 2008.

DALRYMPLE, B.P.; JORGENSEN, W.K.; DE VOS, A.J.; WRIGHT, I.G. Analysis of the composition of samples of *Babesia bovis* and the influence of different environmental conditions on genetically distinct subpopulations. **International Journal of Parasitology**, v. 22, p. 731-737, 1992.

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

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JONHSON, 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.

FRIEDHOFF, K.T. **Transmission of *Babesia***. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. 1988. p. 24-45.

JAMES, M.A. Immunology of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**, 1988. p. 119-130.

KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; JESUS, E.F.; SEMPREBOM, D.V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n. 7, p. 747-752, 1987.

LAUERMAN, L.H. **Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Ed. AAVLD, 1998. 152 p.

LAUERMAN, L.H.; CHILINA, A.R.; CLOSSER, J.A.; JOHANSEN, D.; Avian Mycoplasma identification using Polymerase Chain Reaction amplicom and restriction fragment length polymorphism analysis. **Avian Diseases**, v. 3, p. 804-811, 1995.

LEW, A.E.; DALRYMPLE, B.P.; JESTON, P.J.; BOCK, R.E. PCR methods for the discrimination of *Babesia bovis* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 223-237, 1997.

LINHARES, G. F. C. ; SANTANA, A. P. ; LAUERMAN, L. H. ; MADRUGA, C. R. . Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 27-32, 2002.

LINHARES, G.F.C.; MASSARD, C.L.; ARAÚJO, J.L.B.; ALVES, L. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1983) e *Babesia bovis* (Babès, 1888) em bovinos na região Centro-Oeste do Brasil. **Arquivos da Universidade Federal Rural Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 85-91, 1992.

LOSOS, G.J. **Infectious tropical disease of domestic animals**. 1. ed. New York: Longman Scientific, 1986. 138 p.

McLAUGHLIN, G.L.; EDLIND, T.D.; IHLER, G.M. Detection of *Babesia bovis* using DNA hybridization. **Journal of Protozoology**, v. 33, p. 125-128, 1986.

MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; KESLLER, 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 cruzamento de nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 9, p. 1163-1168, 1984.

MADRUGA, C.R.; BRAGA, M.M.; OLIVEIRA, D.B.; MASSARD, C.L.; SOARES, C.O. Prevalência de anticorpos contra *Babesia bovis* (Babès, 1888) e *B. bigemina* (Smith e Kilborne, 1893) (Apicomplexa: Babesiidae) em bovinos de quatro municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 113-116, 2000.

MCLAUGHLIN, G.L.; MONTENEGRO-JAMES, S.; VODKIN, M.H.; HOWE, D.; TORO, M.; LEON, E. ARMIJOS, R.; KAKOMA, I.; GREENWOOD, B.M.; HASSAN-KING, M.; MARICH, J.; RUTH, J.; JAMES, M.A. Molecular approaches to Malaria and Babesiosis diagnosis. **Arquivos Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, suppl. III, p. 57-68, 1992.

MONTENEGRO-JAMES, S.; GUILLEN, A.T.; TORO, M.; DOT-ELISA para el diagnóstico serológico de Anaplasmosis y Babesiosis bovinas. **Revista Cubana de Ciência Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 14-24, 1992.

PATARROYO, J.H.; RIBEIRO, M.F.B.; SANTOS, J.L. Epidemiologia das babesioses bovinas no Estado de Minas Gerais I: prevalência de anticorpos fluorescentes na Zona da Mata, MG. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, p. 423-429, 1987.

REDDY, G.G.B.; MISIIRA, A.K.; RAO, J.R.; TEWARI, A.K. Comparison of indirect immunofluorescence (IIF) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in detecting *Babesia bigemina* infection in cattle. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 45, n. 1, p. 67-74, 1997.

RODRIGUES, O.N.; ESPAINE, L.; RODRIGUES, P.; RI-

VAS, A. Resultados obtenidos con cuatro pruebas serológicas el estudio de la anaplasmosis y babesiosis bovinas; **Revista Cubana Ciencia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 85-92, 1988.

SUAREZ, C.E.; PALMER, C.H.; JASMER, D.P. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. **Molecular Biochemistry Parasitology**, 46, p. 45-52, 1991.

VIDOTTO, O.; ANDRADE, G.M.; AMARAL, C.H.S.; BARBOSA, C.S.; FREIRE, R.L.; ROCHA, M.A.; VIDOTTO, M.C. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *Bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, n. 5, p. 655-659, 1997.

Protocolado em: 9 ago. 2007. Aceito em: 27 mar. 2008.