

OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI *Babesia bovis* E ESTUDO SOBRE A INFECÇÃO NATURAL EM BOVINOS DA RAÇA NELORE, NA REGIÃO DE UMUARAMA, PARANÁ, BRASIL

Occurrence of antibodies against *Babesia bovis* and studies on natural infection in Nelore cattle, in Umuarama municipality, Paraná State, Brazil

OSAKI, S.C.¹; VIDOTTO, O.^{2*}; MARANA, E.R.M.²; VIDOTTO, M.C.³; YOSHIHARA, E.⁴;
PACHECO, R.C.⁵; IGARASHI, M.⁵. & MINHO, A.P.⁵.

(1) Escola Superior de Ciências Agrárias, Guarapuava, Paraná; (2) Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rod. Celso Garcia Cid, Pr 445, km 379, Campus Universitário, Caixa postal 6001, CEP 86051-990 – Londrina, Pr. Email: vidotto@uel.br * A quem devem ser enviadas as correspondências; (3) Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, UEL; (4) Fundação Faculdades “Luiz Meneguel” (FFALM) Depto de Zootecnia, Bandeirantes, PR, Brasil; (5) Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, DMVP, CCA, UEL.

SUMMARY. Antibodies against *Babesia bovis* were screened in seven beef cattle herds in the Umuarama region, northwest of the Paraná State, Brazil. A total of 232 cow sera were analyzed and 149 (64,2%) were positive in a ELISA test. A herd with high antibodies incidence against *B. bovis* was selected for the study of natural infection. Blood samples were taken, at the birth day, from fourteen cows and their respective newborn calves and, next every thirty days, only from the calves, until they were six months old. The blood and sera samples were analyzed by Nested Polymerase Chain Reaction (nPCR) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), respectively. The specificity of the nPCR product was confirmed using the restriction enzyme *Taq* I. The nPCR sensibility was analyzed using tenfold dilutions of a blood sample with 3% of infected erythrocytes, and the system detected until 0.00003% of infected cells. At the parturition day, 57.1% the cows were nPCR positives and 100% were seropositives. From the newborn calves, two were nPCR positives suggesting the *B. bovis* intrauterine infection. The ELISA test showed thirteen positives calves evidencing the transference of maternal antibodies. In the next months the number of positives calves decreased, reaching the smallest level of antibodies against *B. bovis* around 150 days of age. The nPCR showed that, most of the calves were infected with *B. bovis* in the subsequent months after birth and the highest number of positive animals was found at six months old. At this time all the calves were infested by the tick *Boophilus microplus*.

KEY-WORDS: *Babesia bovis*, epidemiology, *Boophilus microplus*, *Bos indicus*, ELISA, PCR, Brazil.

INTRODUÇÃO

Babesioses são enfermidades causadas por protozoários do gênero *Babesia*, o qual possui 73 espécies parasitando diferentes hospedeiros, tais como bovinos, caprinos, ovinos, caninos e roedores (FRIEDHOFF, 1981). No Brasil e nos demais países da América Latina, a babesiose bovina é causada por duas espécies, a *Babesia bovis* e *B. bigemina*, e a anaplasmoze pela *Anaplasma marginale*. Popularmente estas doenças são conhecidas como Tristeza Parasitária Bovina

(TPB), responsável por grandes prejuízos econômicos (KESLLER et al., 1988; MASSARD, 1990; MONTENEGRO-JAMES, 1992; ARAÚJO et al., 1998; TEBELE et al., 2000).

A transmissão intra-uterina da *B. bovis* não é muito frequente, no entanto alguns relatos têm sido descritos na literatura, bem como a ocorrência de abortos (TRUEMAN & McLENNAN, 1987; BARBOSA et al., 1994; BRACARENSE et al., 2001).

Logo após o nascimento os bezerros recebem anticorpos colostrais que os protegem durante os primeiros meses de

vida. A exposição dos bezerros a *Babesia* durante os primeiros seis meses de vida raramente provoca manifestação de sinais clínicos com os animais desenvolvendo imunidade por um longo período (BOCK *et al.*, 1999; CARRIQUE MAS *et al.*, 2000). Bovinos das raças zebuínas são mais resistentes à infecção por *Babesia* spp e também à infestação pelo *B. microplus* quando comparados com bovinos das raças européias (PAYNE & OSORIO, 1990; BOCK *et al.*, 1999).

A babesiose acomete os bovinos em praticamente todo o território brasileiro, com taxas de ocorrência variando de 80 a 100% (MADRUGA *et al.*, 1993). O diagnóstico das babesioses usualmente é feito com base nos sinais clínicos e na visualização dos parasitas no interior das hemácias em esfregaços delgados de sangue corados pelo Giemsa. Porém, a *B. bovis*, mesmo na fase aguda tende a apresentar baixa parasitemia, o que dificulta o seu diagnóstico por exame de esfregaço sanguíneo. Na última década, técnicas de detecção do DNA genômico do agente, tais como sondas moleculares e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), têm sido desenvolvidas para confirmar a presença de *B. bovis* em infecções agudas e crônicas com baixas parasitemias (FIGUEROA *et al.*, 1993; AZAMBUJA *et al.*, 1994; GUBBELS *et al.*, 1999; RUEF *et al.*, 2000). A técnica da PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade na identificação de segmentos específicos de DNA da *B. bovis* (FAHRIMAL *et al.*, 1992; McLAUGHLIN *et al.*, 1992; FIGUEROA *et al.*, 1993).

Além das técnicas diretas de diagnóstico, também são usados os testes sorológicos que são importantes nos estudos epidemiológicos e na avaliação de medidas profiláticas como premunicação, vacinação e controle de carrapatos. Diversos testes foram desenvolvidos, tais como a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), a mais utilizada mundialmente, e as técnicas imunoenzimáticas, como, por exemplo, o ELISA indireto, as quais apresentam alta sensibilidade e especificidade, podendo ser usadas para estudos epidemiológicos da *B. bovis* (BLANDINO *et al.*, 1994; ARAÚJO *et al.*, 1998; MOLLOY *et al.*, 1998).

Considerando a escassez de dados sobre a epidemiologia da babesiose no Paraná, principalmente em *Bos indicus*, este trabalho teve como objetivos realizar um levantamento sorológico em rebanhos e avaliar a infecção pela *B. bovis* em vacas e bezerros da raça Nelore na região de Umuarama, Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos animais e amostras de sangue

No período de agosto a outubro de 1999 foram examinados 232 soros de vacas de sete rebanhos de corte, constituídos exclusivamente por animais da raça Nelore, no município de Umuarama que se localiza na região Noroeste do Esta-

do do Paraná (23° 44' S e 53° 17' W), a 480 metros de altitude. Durante o experimento, a temperatura média mínima na região foi de 18,7 °C, temperatura média máxima de 29,5 °C, pluviosidade média de 92,17 mm e umidade relativa de 60,8% (IAPAR, 1999).

Após a obtenção dos resultados sorológicos dos sete rebanhos, selecionou-se um com alta ocorrência da infecção para o estudo da infecção natural em 14 bezerros, numerados de 1 a 14, dos quais foram colhidas amostras de sangue, nas primeiras 18 horas após o nascimento, porém sem o conhecimento do momento exato do parto, e a cada 30 dias até os seis meses de idade. No dia do parto foram colhidas também amostras de sangue das 14 vacas parturientes. Este estudo foi desenvolvido no período de novembro de 1999 a maio de 2000. Os bezerros permaneceram com as mães até o desmame, o que ocorreu aos sete meses de idade. A cada 30 dias, nos dias das colheitas de sangue, os bezerros eram examinados para verificar se estavam parasitados pelos diferentes estágios evolutivos do *Boophilus microplus*.

As amostras de sangue foram colhidas pela punção da veia jugular, utilizando-se tubos tipo vacutainer[®], com anticoagulante (EDTA) para realização da nPCR e, sem anticoagulante, para a obtenção de soro, utilizado no teste de ELISA. As amostras de sangue com anticoagulante foram processadas para obtenção de papa de hemácias e congeladas a -20 °C até a realização da extração DNA para a nPCR. O soro obtido pela retração do coágulo nas amostras de sangue total sem anticoagulante foi separado e armazenado a -20 °C até a sua utilização.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

As amostras de soro foram testadas pela técnica de ELISA descrita por SOARES *et al.* (2000). O antígeno, gentilmente cedido pelo Dr. Cláudio R. Madruga (CNPq/EMBRAPA, MS), foi produzido através da inoculação de *B. bovis* em bezerros esplenectomizados. Como controles positivos foram utilizados soros de animais de campo com alto título de anticorpos anti-*B. bovis* pela técnica de IFI e como controles negativos, amostras de soro de animais importados do Canadá também negativos pela técnica de IFI. A leitura dos resultados foi realizada por espectrofotometria, com filtro de 405nm, no leitor de ELISA. O ponto de corte do teste foi determinado usando a média das DOs de 40 soros de animais negativos para *B. bovis* pela IFI, acrescidos de três desvios padrões. Animais com DOs acima de 0,215 foram considerados positivos.

Extração do DNA das amostras de sangue

A extração do DNA de sangue total foi realizada conforme BOOM *et al.* (1990) modificado por ALFIERI (1999). Como controle positivo foi usada a amostra de sangue com 3% de parasitemia de *B. bovis*, isolada em Jaboticabal, SP,

gentilmente cedida pela Dr^a. Rosângela Z. Machado (UNESP). Como controle da reação foi utilizada água ultrapura autoclavada e como controle negativo da extração, foi usada água ultrapura autoclavada submetida ao mesmo processo de extração de DNA das amostras de sangue.

Reação em Cadeia pela Polimerase – *Nested* (nPCR)

Para a realização da nPCR foram utilizados dois pares primers, oriundos da sequência de genes da *B. bovis* responsável pela codificação da proteína de roptria de 60 kDa (RAP-1) (FIGUEROA *et al.*, 1993).

A PCR foi realizada no volume final de 25 mL: 20 pmol de cada primer externo BOF (5'caggaaggaactaccgatgtga3') e BOR (5'ccaaggagcttcaacgtacgaggtca3'), 1,25U de *Taq* polimerase (Gibco BRL) e 200 mM de dNTPs (Gibco BRL), 1,5mM de MgCl₂ (Gibco BRL). Os ciclos utilizados foram: desnaturação inicial a 95 °C durante 2 minutos, anelamento inicial a 55 °C durante 1 minuto, extensão inicial a 73 °C durante 1,5 minuto, seguidos de 34 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 73 °C por 1,5 minuto e extensão final a 73 °C por 15 minutos. A reação da nPCR foi realizada utilizando 2 mL do produto da primeira amplificação mais 20 pmol de cada primer interno BOFN (5'tcaacaaggtactctatg-gctacc3') e BORN (5'ctaccgagcagaacctcttcaccat3'), 1,25 U de *Taq* polimerase, 200 mM de dNTPs e 1,5mM de MgCl₂. Os ciclos utilizados foram os mesmos descritos acima.

O fragmento de DNA amplificado pela nPCR foi identificado pela comparação com marcadores de peso molecular de 123 pares de bases (123 bp Ladder - Gibco BRL). O produto da amplificação pela nPCR (5ml) foi visualizado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5mg/mL) em um transiluminador de luz ultra violeta, após eletroforese aplicando uma corrente de 100v/50mA durante 30 minutos, fotografado com câmera digital Kodak e analisado pelo Programa Adobe Photoshop versão 5,0.

Enzima de restrição e Sensibilidade da técnica de nPCR

A identificação do fragmento de DNA amplificado foi comprovada pela comparação com os sítios de restrição da sequência obtida no Gene Runner, pela digestão de produtos amplificados com enzima de restrição *Taq* I, que fornece dois fragmentos com 117 e 181 pares de base. A sensibilidade da nPCR foi estabelecida utilizando uma amostra de sangue com 3% de parasitemia, fazendo-se seis diluições seriadas na base 10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos soros dos 232 animais examinados, 149 (64,2%) mostraram-se positivos ao teste de ELISA para *B. bovis* (Tabela 1). Entre as propriedades estudadas ocorreu variação de

36,7% a 92,0% de animais soropositivos, mostrando que dentro de uma mesma região, existem diferenças relevantes entre os rebanhos. Esta situação coloca algumas das propriedades em estado de instabilidade (propriedades 2 e 6) e as demais, de estabilidade enzoótica, conforme observado por outros autores (MAHONEY; ROSS, 1972; VIDOTTO *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2000).

Resultados semelhantes foram obtidos por VIDOTTO *et al.* (1997) que examinaram 417 amostras de soro de animais pertencentes a rebanhos leiteiros de Londrina, Paraná e encontraram 60,2% de animais positivos pela IFI para *B. bovis* e também por BARCI *et al.* (1995) que analisaram soros de 199 bovinos de corte no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo e encontraram 55,0% de soropositivos para *B. bovis* pela técnica de IFI. Resultados diferentes foram obtidos por SOARES *et al.* (2000) ao analisarem 532 amostras de soros de bezerros zebuínos e mestiços pela IFI no Norte Fluminense, Rio de Janeiro, obtendo 91,0% de animais soropositivos para a *B. bovis*. Essas diferenças, entre as taxas de animais soropositivos que se verificam nos diferentes estudos realizados no Brasil são devidos às diferentes condições climáticas e de manejo que repercutem diretamente na população do carrapato vetor *Boophilus microplus*.

Na Tabela 2 estão relacionados os resultados obtidos pelo teste de ELISA e da nPCR de 14 vacas e seus respectivos bezerros, da propriedade selecionada (nº 7), para o monitoramento da infecção natural por *B. bovis*. No dia do parto, oito vacas (57,1%) foram positivas pela nPCR e 100,0% apresentaram anticorpos (IgG) anti-*Babesia bovis*. Anticorpos específicos contra *B. bovis* também foram detectados no soro dos bezerros, do nascimento aos seis meses de idade. Dos 14 bezerros estudados, 13 foram soropositivos no dia do nascimento, demonstrando a transferência de anticorpos colostrais contra a *B. bovis*. A maioria das mães (71,4%) apresentou níveis de anticorpos séricos menores que dos bezerros (Figura 1B), evidenciando uma grande transferência de anticorpos

Tabela 1. Frequência de anticorpos contra *B. bovis* em soros de vacas da raça Nelore da região de Umuarama, Estado do Paraná, Brasil, pelo teste de ELISA.

Rebanhos	Amostras de soros	Positivos (%)	Negativos (%)
1	25	18 (72,0)	7 (28,0)
2	51	19 (37,2)	32 (62,8)
3	30	21 (70,0)	9 (30,0)
4	39	27 (69,2)	12 (30,8)
5	32	30 (93,7)	2 (6,3)
6	30	11 (36,7)	19 (63,4)
7	25	23 (92,0)	2 (8,0)
TOTAL 232	149 (64,2)	83 (35,8)	

Tabela 2. Resultados obtidos através da técnica de ELISA para detecção de anticorpos contra *B. bovis* e a técnica da nPCR para detecção de DNA de *B. bovis* em vacas e bezerros da raça Nelore, do nascimento aos seis meses de idade, na região de Umuarama, Estado do Paraná, Brasil.

Vacas		Nº	Bezerros													
dia			Idade (meses)													
parto			Nascimento		1		2		3		4		5		6	
PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA	PCR	ELISA	
-	0,492	1	-	0,714	-	0,342	-	0,179	-	0,165	+	0,238	NR	NR	+	0,314
+	0,440	2	-	0,521	-	0,216	-	0,134	-	0,540	-	0,574	+	0,391	+	0,473
+	0,520	3	-	0,599	+	0,179	+	0,519	+	0,586	+	0,530	+	0,314	+	0,370
+	0,526	4	-	0,736	-	0,240	-	0,177	-	0,136	-	0,154	-	0,165	-	0,179
-	0,336	5	-	0,742	+	0,188	-	0,376	-	0,612	-	0,503	+	0,325	+	0,377
+	0,383	6	+	0,498	-	0,447	-	0,349	-	0,464	-	0,360	+	0,199	+	0,320
-	0,570	7	-	0,456	-	0,431	-	0,250	-	0,242	-	0,201	-	0,140	-	0,252
+	0,451	8	-	0,446	-	0,422	-	0,246	-	0,179	-	0,175	-	0,124	-	0,198
-	0,369	9	-	0,150	-	0,263	-	0,163	-	0,177	-	0,191	-	0,143	-	0,202
+	0,453	10	+	0,575	+	0,383	-	0,219	-	0,186	-	0,189	+	0,203	+	0,399
-	0,570	11	-	0,790	-	0,456	-	0,179	-	0,181	-	0,165	-	0,109	-	0,123
+	0,633	12	-	0,562	-	0,776	-	0,237	+	0,181	-	0,165	-	0,308	-	0,462
-	0,539	13	-	0,547	-	0,402	-	0,271	-	0,202	-	0,170	-	0,174	+	0,206
+	0,278	14	-	0,432	-	0,467	-	0,289	-	0,176	-	0,193	-	0,179	-	0,171

NR = Não realizado

para o colostro, que foram ingeridos e absorvidos no trato digestivo dos bezerros. Em apenas um caso (vaca e bezerro nº 9) pode ter havido falha na transferência passiva através do colostro, ou se ocorreu a passagem de anticorpos, não havia transcorrido tempo suficiente para a absorção dos mesmos em níveis que pudessem ser detectados no soro deste bezerro.

As médias dos níveis de anticorpos de 13 bezerros que eram elevadas logo após o nascimento, caíram nos meses seguintes até atingir o nível mais baixo, com menor número de animais positivos no quinto mês, quando apenas quatro bezerros foram soropositivos. No sexto mês houve um pequeno aumento nos níveis de anticorpos séricos com reflexos no número de animais soropositivos (Figura 1C), provavelmente devido à infecção a campo pelo *Boophilus microplus*, presente nos bezerros desde os 30 dias de idade. Nota-se também que os níveis de anticorpos séricos, transferidos via colostro, caíram rapidamente naqueles bezerros que não se infectaram com a *B. bovis* ao longo do estudo, entretanto mantiveram-se elevados ou houve aumento naqueles bezerros que se infectaram ou mantiveram a infecção nos meses seguintes ao nascimento (Tabela 2), mostrando assim a importância da co-infecção na manutenção da imunidade. Estes resultados assemelham-se aos de MADRUGA *et al.* (1984) que encontraram uma diminuição nos níveis de imunoglobulinas específicas contra *Babesia* spp em bezerros com idade entre 30 e 120 dias, tornando estes animais mais susceptíveis à infecção natural neste período.

DNA de *B. bovis* foi detectado no sangue de bezerros, do nascimento até os seis meses de idade, pela nPCR (Figuras 2A). A especificidade do fragmento de DNA amplificado foi confirmada utilizando-se a enzima de restrição *Taq I* (Figura 2B). No teste de sensibilidade, a nPCR foi capaz de detectar um segmento específico de DNA do parasita em amostras de sangue com parasitemias de até 0,00003%, aumentando em cerca de mil vezes a capacidade de detectar a infecção quando comparada à tradicional coloração de esfregaço sanguíneo pelo Giemsa (KAKOMA; MEHLHORN, 1994) (Figura 2C).

Dos 14 bezerros estudados, dois foram positivos no dia do nascimento pela nPCR, sugerindo a infecção vertical (Tabela 2C e Figura 1C). A transmissão congênita da *B. bovis* é considerada incomum. TRUEMAN & McLENNAN (1987) fizeram o primeiro relato de aborto por *B. bovis* ocorreu no oitavo mês de gestação após um período de seca e ausência de carrapatos que, segundo os autores, levou a uma diminuição nos níveis de anticorpos, possibilitando a multiplicação do parasita durante a gestação. BARBOSA *et al.* (1994) relataram um caso de morte de um bezerro com três dias de idade decorrente de infecção por *B. bovis*. Segundo estes autores, durante a gestação, o estresse e o aumento dos níveis de esteróides podem provocar imunossupressão, favorecendo a ativação de infecções latentes e na presença de qualquer lesão das membranas placentárias poderia ocorrer a transmissão congênita de *Babesia*. Um caso de transmissão congênita também foi relatado no Paraná por BRACARENSE *et al.*

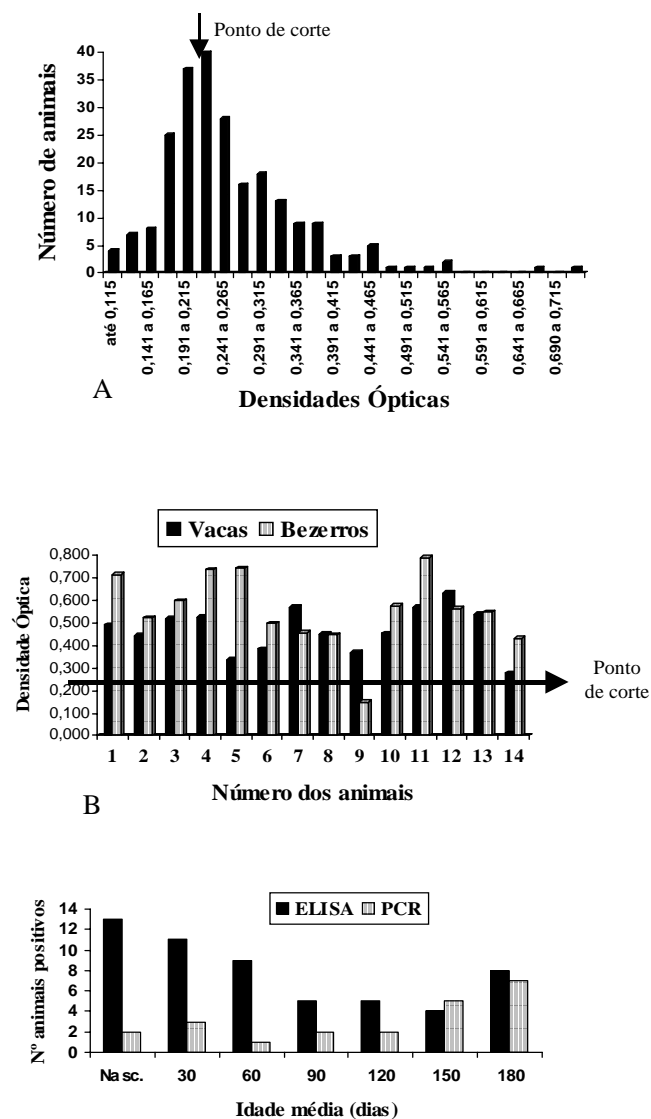


Figura 1. **A.** Frequência da distribuição das Densidades Ópticas (DO) do teste de ELISA, para anticorpos contra *B. bovis* em soros de vacas da raça Nelore da região de Londrina, Paraná, Brasil; **B.** Distribuição das DO obtidas pelo teste de ELISA em soros de vacas e bezerros da raça Nelore no dia do parto e **C.** Número de bezerros, positivos para *B. bovis* no dia do nascimento, pelas técnicas de ELISA e PCR, na região de Umuarama, Paraná, Brasil.

(2001) em uma vaca mestiça da raça Holandesa com Pardo Suíço de 17 anos que pariu um bezerro vivo o qual veio a óbito minutos após o nascimento. O diagnóstico da infecção no bezerro foi confirmado pela visualização de merozoítos característicos em eritrócitos de capilares cerebrais em impressões de fragmentos de cérebro e cerebelo fixados em lâminas e coradas pelo Giemsa.

Dos 12 bezerros nascidos livres da infecção por *B. bovis*, dois se infectaram no primeiro mês de vida e outros três infectaram-se no terceiro, quarto e sexto mês, perfazendo um total de sete bezerros positivos e sete negativos ao final do

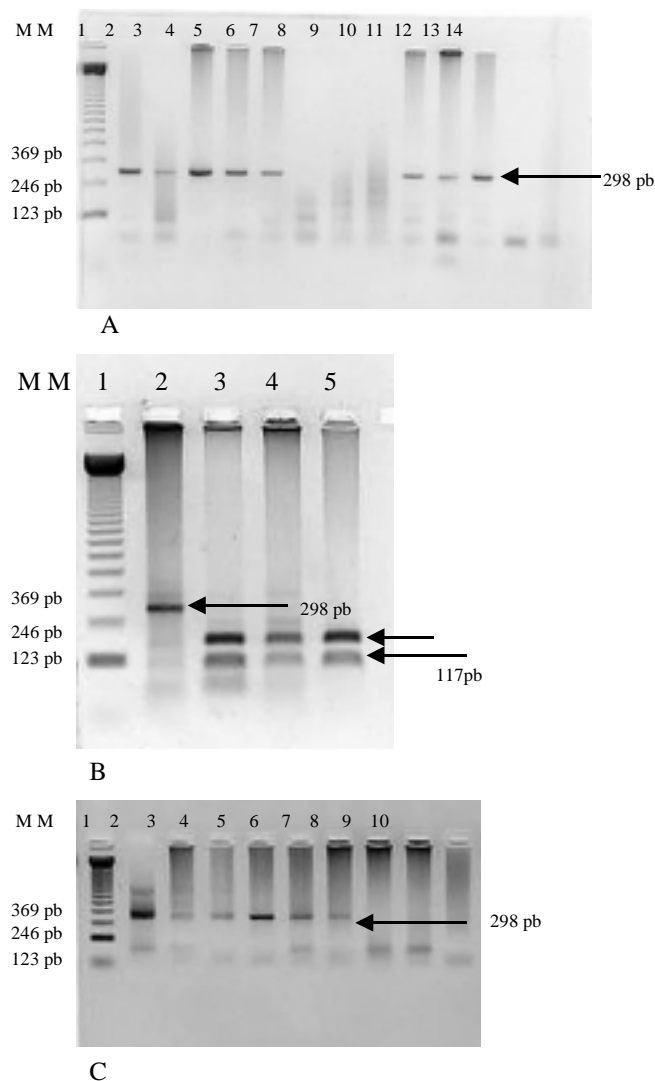


Figura 2. Análise da nPCR em gel de agarose a 2% para detecção do gene de *B. bovis* em sangue de vacas e bezerros da raça Nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil. M M = Massa molecular padrão. **A.** Canaleta 1 - padrão de tamanho molecular de 123pb. Canaleta 2 - controle positivo. Canaletas 3 a 6 e 10 a 12 - amostras de campo positivas. Canaletas 7 a 9 - amostras de campo negativas. Canaleta 13 - controle negativo. Canaleta 14, controle da reação; **B.** Resultado da clivagem de produto amplificado pela nPCR com 298 pb de *B. bovis* de sangue de vacas e bezerros pela enzima de restrição *Taq* I. Canaleta 1 - 123 pb. Canaleta 2 - banda de 298 pb sem clivar. Canaletas 3 a 5 - bandas clivadas formando fragmentos de 117pb e 181pb. **C.** Análise da sensibilidade da técnica de nPCR para detecção do gene de *B. bovis*. Canaleta 1 - 123pb. Canaleta 2 - sangue com 3% parasitemia por *B. bovis* sem diluição. Canaletas 3 a 8 - diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁶. Canaleta 9 - controle negativo. Canaleta 10 - controle da reação.

estudo. É importante ressaltar que embora não tenha sido realizada a contagem de carrapatos, o *B. microplus* já estava presente nos bezerros aos 30 dias de idade, mantendo um parasitismo baixo até o final do estudo. Tanto pelo critério sorológico como pelo parasitológico, a metade dos bezerros ainda não havia se infectado com a *B. bovis* aos seis meses de

idade, mesmo estando infestados pelo *Boophilus microplus*, em baixos níveis de parasitismo, já aos 30 dias de idade. Estes dados, aliados às baixas taxas de animais sororeagentes encontradas em alguns dos rebanhos estudados, sugerem, nestas circunstâncias, um estado de instabilidade enzoótica para *B. bovis* na região de Umuarama, noroeste do Paraná.

Esses estudos epidemiológicos realizados com *B. bovis* e outros, com *B. bigemina* e *A. marginale* (VIDOTTO et al., 1997; VIDOTTO et al., 1998; ANDRADE et al., 2001), aliados às observações de ocorrência de casos clínicos de babesiose e anaplasiose (informação pessoal), são indicativos de que a TPB ocorre de forma endêmica na região norte e noroeste do estado do Paraná, com situações de instabilidade ou estabilidade enzoótica, dependendo da situação. Casos isolados da doença ou surtos geralmente estão ligados a aumentos sazonais da população de *B. microplus*, falhas em seu controle ou à introdução de animais susceptíveis oriundos de áreas livres de carrapato, independente da raça bovina envolvida.

SUMÁRIO

Anticorpos contra a *Babesia bovis* foram pesquisados em soros de vacas de sete rebanhos de corte, constituídos exclusivamente de animais da raça Nelore, provenientes da região de Umuarama, Noroeste do Estado do Paraná. Do total de 232 animais examinados, 149 (64,2%) mostraram-se reagentes ao teste de ELISA. Dentre os rebanhos investigados selecionou-se um, com alta incidência de anticorpos contra a *B. bovis* para o estudo da infecção natural. No dia do parto foram colhidas amostras de sangue de 14 vacas e dos seus recém-nascidos. Destes últimos procedeu-se também a colheita de sangue a cada 30 dias até os seis meses de idade. O material colhido foi analisado pelas técnicas de Reação em Cadeia pela Polimerase-nested (nPCR) para detecção da *B. bovis* e pelo Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto para a detecção de anticorpos anti-*B. bovis*. A especificidade do fragmento de DNA amplificado foi confirmada utilizando-se a enzima de restrição *Taq* I. A sensibilidade da nPCR foi testada usando-se oito diluições do controle positivo e parasitemia de até 0.00003% pode ser detectada. No dia do parto, 57,1% das vacas foram positivas pela nPCR e 100,0% positivas pela técnica de ELISA. Dos recém-nascidos, dois foram positivos pela nPCR, sugerindo uma infecção vertical pela *B. bovis*. Pela técnica de ELISA, 13 deles foram positivos, evidenciando a transferência de anticorpos maternos. Nas colheitas subsequentes, houve uma redução no número de bezerros positivos atingindo a menor média de títulos de anticorpos contra *B. bovis* aos 150 dias de idade. A técnica de nPCR identificou que a maioria dos bezerros infectaram-se com a *B. bovis* após o nascimento, sendo que o maior número de

animais positivos foi encontrado aos seis meses de idade, ocasião em que todos os bezerros mostraram-se infestados pelo *Boophilus microplus*.

PALAVRAS-CHAVE: *Babesia bovis*, epidemiologia, *Boophilus microplus*, *Bos indicus*, ELISA, PCR, Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFIERI, A.F. (1999). Caracterização dos genótipos G (VP7) e P (VP4) de Rotavírus grupo A de origem animal (bovina e suína) e humana pela Reação em Cadeia pela Polimerase (multiplex RT-PCR). *Tese de Doutorado apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP*, São Paulo, SP, Brasil, 116p.
- ANDRADE, G.M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M.C.; YOSHIHARA, E.; KANO, F.S. & AMARAL, C.H.S. (2001). Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in dairy cattle and, studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. *Semina, Ci. Agr., Londrina*, 22 (2): 155 -159.
- ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; LEAL, C.R.; SCHENK, M.A.; KESSLER, R.H.; MARQUES, A.P. & LEMAIRE, D.C. (1998). Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, 74 (2-4): 101-8.
- AZAMBUJA, C.J.; GAYO, V.; SOLARI, M.; SUAREZ, M. & STOLL, M. (1994). Biotechnology applied to the detection of infectious agents in cattle diagnosis of *Babesia bovis* by PCR. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 3 (1): 04-04.
- BARBOSA, M.F.R.; COSTA, J.O. & TAFURI, W.L. (1994). Transmissão congênita de *Babesia bovis* : relato de um caso autóctone em Minas Gerais – Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 5: 519-26.
- BARCI, L.A.G.; DELL PORTO, A.; FUJI, T.U. & MACHADO, R.Z. (1995). Epidemiologia da babesiose bovina no Estado de São Paulo: estudos em rebanhos de corte da região do Vale do Ribeira. *Sem Bras. Parasitol. Vet.*, 9, 1995, Campo Grande. *Anais... Campo Grande*, p.5.
- BLANDINO, T.; ALONSO, M. & BARRERA, M. (1994). Detection of antibodies to *Babesia bovis* using an ELISA test. *Arch. Med. Res.*, 25 (2): 219-22.
- BOCK, R.E.; KINGSTON, T.G. & de VOS, A.J. (1999). Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*, *Aust. Vet. J.*, 77 (7): 00-00.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM van DILLEN, P. M. E. & NOORDAA,

- J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3): 495-503.
- BRACARENSE, A.P.F.L.; VIDOTTO, O. & CRUZ, G.D. (2001). Transmissão congênita de *Babesia bovis*, *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 2001. 53 (4): 479-481.
- CARRIQUE-MAS, J.J.; WIDDOWSON, M.A.; CUÉLLAR, A.M.; RIBERA, H. & WALKER, A.R. (2000). Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia, *Vet. Parasitol.*, 93: 29-38.
- IAPAR. (1999). Cartas climáticas do Estado do Paraná, Londrina.
- FAHRIMAL, Y.; GOFF, W.L. & JASMER, D.P. (1992). Detection of *Babesia bovis* carrier cattle using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 30 (6): 1374-9.
- FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S. & BUENING, G.M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood, *Vet. Parasitol.*, 50: 69-81.
- FRIEDHOFF, K.R. & SMITH, R.D. (1981). Transmission of *Babesia* by ticks. In: Babesiosis. *Academic Press*, New York, p.267-321.
- GUBBELS, J.M.; DE VOS, A.P.; VAN DER WEIDE, M.; VISERAS, J.; SCHOULS, L.M.; DE VRIES, E.; & JONGEJAN, F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization, *J. Clin. Microbiol.*, 37 (6): 1782-1789.
- KAKOMA, I. & MEHLHORN, H. (1994). Babesia of Domestic Animals. In KREIER, J.P. *Parasitic Protozoa*, 7: 141-207.
- KESSLER, H.R.; MADRUGA, C.R.; JESUS, F.E. & SEMPREGOM, V.D. (1988). Isolamento de cepas puras de *B. bovis*, *Babesia bigemina*, e *Anaplasma marginale* em áreas enzoótica. *Pesc. agropec. bras.*, Brasília, 22 (7): 747-752.
- MADRUGA, C.R.; HONER, M.R.; ANDREOTTI, R.; ARAÚJO, F. R. & SANTARÉM, V. (1993). Simulação e sorologia no mapeamento da instabilidade enzoótica da babesiose: Um estudo nas regiões do Boqueirão e Cariri, Estado da Paraíba. In: *Sem. Bras. Parasitol. Vet.*, 8, 1983. Londrina. Anais.... Londrina, p.1. Resumo.
- MADRUGA, C.R.; GOMES, R.; SCHENK, M.A.M.; KESSLER, R.H.; GRATÃO, G.; GALES, M.E.; SCHENK, J.A.P.; ANDREASI, M.; BIANCHIN, I. & MIGUITA, M. (1984). Etiologia de algumas doenças de bezerros de corte no Estado do Mato Grosso do Sul. Campo Grande. EMBRAPA – CNPGC, 27pp. (EMBRAPA – CNPGC. *Circular Técnica*, 15).
- MASSARD, L.C. (1990). Sanidade animal: Tristeza Parasitária dos Bovinos. *A Hora Veterinária*, 54: 10-13.
- 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. (1992). Molecular approaches to malaria and babesiosis diagnosis, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87 (Suppl. III): 57-68.
- MOLLOY, J.B.; BOWLES, P.M.; BOCK, R.E.; TURTON, J.A.; KATSANDE, T.C.; KATENDE, J.M.; MABIKACHECHE, L.G.; WALDRON, S.J.; BLIGHT, G.W. & DALGLIESH, R.J. (1998). Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle in Australia and Zimbabwe, *Prev. Vet. Med.*, 33: 59-67.
- MONTENEGRO-JAMES, S. (1992). Prevalencia and control of babesiosis in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 87 (Suppl. III): 27-36.
- PAYNE, R.C. & OSORIO, O. (1990). Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. I. Seroepidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis, *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 22: 53-60.
- RUEF, B.J.; WARD, T.J.; OXNER, C.R.; CONLEY, P.G.; BROWN, W.C. & RICE-FICHT, A.C. (2000). Phylogenetic analysis with newly characterized *Babesia bovis* hsp70 and hsp90 provides strong support for paraphyly within the piroplasms, *Mol. Bioch. Parasitol.*, 109: 67-72.
- SOARES, C.O.; SOUZA, J.C.P.; MADRUGA, C.R.; MADUREIRA, R.C.; MASSARD, C.L. & FONSECA, A.H. (2000). Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na região Norte Fluminense, *Pesq. Vet. Bras.*, 20 (2): 75-9.
- TEBELE, N.; SKILTON, R.A.; KATENDE, J.; WELLS, C.W.; NENE, V.; McELWAIN, T.; MORZARIA, S.P. & MUSOKE, J. (2000). Cloning, Characterization, and expression of a 200-Kilodalton diagnostic antigen of *Babesia bigemina*, *J. Clin. Microbiol.*, 38 (6): 2240-2247.
- TRUEMAN, K.F. & McLENNAN, M.W. (1987). Bovine abortion to prenatal *Babesia bovis* infection, *Aust. Vet. J.*, 64 (2): 62, 1987.
- VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O.; ANDRADE, G.M.; PALMER, G.; McELWAIN, T. & KNOWLES, D.P. (1998). Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Parana state, Brazil, by MSP-5 competitive ELISA. *Annals of the N. Y. Acad. of sci.* 849: 424-426.
- VIDOTTO, O.; ANDRADE, G.M.; AMARAL, C.H.S.; BARBOSA, C.S.; FREIRE, R.L.; ROCHA, M.A.; VIDOTTO, M.C. (1997). Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná, *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.*, 49 (5): 655-59.