

MARIA DA GLÓRIA QUINTÃO E SILVA

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO DE
TELEÓGINAS DE *Boophilus microplus*
(CANESTRINI, 1887) POR *Babesia bovis* E
Babesia bigemina EM ÁREA ENDÊMICA DE
MINAS GERAIS, BRASIL.**

Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
Belo Horizonte, MG
2003

MARIA DA GLÓRIA QUINTÃO E SILVA

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE INFECÇÃO DE
TELEÓGINAS DE *Boophilus microplus*
(CANESTRINI, 1887) POR *Babesia bovis* e
Babesia bigemina EM ÁREA ENDÊMICA DE
MINAS GERAIS, BRASIL.**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Parasitologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para

Orientador: Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Co-orientadora: Prof^a Maria Norma Melo

Silva, Maria da Glória Quintão e

Avaliação da taxa de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* (canestrini, 1887) por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em área endêmica de Minas Gerais, Brasil. [manuscrito] / Maria da Glória Quintão e Silva. – 2003.

104 f. il. ; 29,5 cm.

Orientador: Múcio Flávio Barbosa Ribeiro. Co-orientadora: Maria Norma Melo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Babesia - Teses. 2. Carrapato – Teses. 3. Boophilus microplus - Teses. 4. Infecção – Teses. 5. Parasitologia veterinária – Teses. 6. Protozoologia veterinária – Teses. 7. Esporocinetos. I. Ribeiro, Múcio Flávio Barbosa. II. Melo, Maria Norma. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.893.1

**A Júlia, minha filha, pelos momentos
em que deixei de estar presente
durante a realização deste trabalho.**

**A meus pais, Antônio e Maria de Lourdes,
por terem me proporcionado a vida.**

**Aos meus irmãos, especialmente o Renato, que
em tantos momentos me forneceu apoio
técnico em informática.**

**Este trabalho foi realizado em memória
do Prof. Hélio Martins de Araújo Costa,
quem me mostrou os caminhos da Parasitologia.**

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia pela oportunidade de concluir esta Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

À Escola de Veterinária da UFMG, pela cessão da Fazenda onde foi realizado parte do experimento.

Ao Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, pela amizade, orientação e por ter me oferecido a possibilidade de realizar este trabalho.

À Prof^a Maria Norma Melo pelo estímulo, amizade e agradável convivência.

Ao Prof. Joaquin Patarroyo, pelo fornecimento das amostras utilizadas como controle positivo nas reações de PCR.

À Rosângela de Fátima Gomes e Soraia de Oliveira Silva, pela paciência e valiosa contribuição.

Ao José Antônio Rodrigues, funcionário da Fazenda Modelo, que sempre me recebeu com alegria e muito auxiliou durante o trabalho de campo.

Ao médico veterinário Fabiano Fiúza Rangel, pela participação ativa no desenvolvimento desta Tese.

À Sumara Aparecida Guilherme Ferreira, por sua valiosa dedicação ao Programa de Pós-Graduação.

A todos os colegas da Pós-Graduação, em especial Thelma de Filippis, Antônio Cezar Rocha Cavalcante e Adriana de Melo Ferreira, pelo apoio e agradável convivência.

A todos os professores deste departamento, pelo que me ensinaram.

Aos todos os funcionários, aqui representados por Maria da Conceição Miranda Caldeira e João da Costa Viana, pela amizade.

Aos companheiros de jornada, Amália Verônica Mendes da Silva, Hudson Andrade dos Santos e Narcisa Imaculada Brant Moreira, com os quais compartilhei momentos de grande alegria e outros de difícil travessia.

SUMÁRIO	Página
RESUMO	01
1. JUSTIFICATIVA	02
2. REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1 Biologia da <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i> no vetor. Aspectos epidemiológicos da infecção do <i>Boophilus microplus</i> por <i>Babesia</i> e da transmissão da babesiose	06
2.2 Utilização de técnicas moleculares para detecção de <i>Babesia</i> em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados	21
3. OBJETIVOS	26
Objetivo geral	26
Objetivos específicos	26
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 Locais dos experimentos	28
5.2 Animais experimentais	28
5.3 Incubação das fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i>	29
5.4 Exame da hemolinfa das teleóginas de <i>Boophilus microplus</i>	31
5.5 Extração do DNA	33
5.5.1 Extração do DNA das amostras de sangue	33
5.5.2 Extração do DNA das teleóginas	34
5.5.3 Amplificação do DNA de <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i> através da reação da PCR	35
5.5.4 Análise dos produtos amplificados	36
5.6 Análise estatística	37
6. RESULTADOS	38
6.1 Exames de hemolinfa de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> colhidas de animais a campo	38
6.1.1 Exame de hemolinfa de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> colhidas de bezerras	39

6.1.2	Exame de hemolinfa de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> colhidas de vacas	40
6.1.3	Comparação das taxas de infecção das teleóginas colhidas de bezerras e vacas	41
6.2	Taxa de infecção em relação à idade dos bezerros	41
6.2.1	Bezerras mantidas sob desafio natural	41
6.2.2	Bezerros mantidos em isolamento	42
6.3	Reação em Cadeia da Polimerase	42
6.3.1	Comparação do resultado do exame direto de hemolinfa com a PCR	43
7.	DISCUSSÃO	58
7.1	Artigo enviado para publicação	58
7.2	Avaliação da taxa de infecção de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> por <i>Babesia</i> sp através do exame de hemolinfa e da Reação em Cadeia da Polimerase	73
8.	CONCLUSÕES	87
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXO 1	102
	ANEXO 2	103
	ANEXO 3	104

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Página

Quadro 1. Sequência de nucleotídeos utilizados na PCR múltipla 35

Tabela 1. Número de esporocinetos por esfregaço de hemolinfa. Teleóginas colhidas de bezerras e vacas, incubadas em estufa climatizada (BOD) e no meio ambiente (AMB). Teleóginas colhidas em Pedro Leopoldo, MG, entre março de 1999 e fevereiro de 2001. 44

Tabela 2. Número de esporocinetos por campo microscópico. Teleóginas colhidas de bezerras e vacas, incubadas em estufa climatizada (BOD) e no meio ambiente (AMB). Teleóginas colhidas em Pedro Leopoldo, MG, entre março de 1999 e fevereiro de 2001. 44

Tabela 3. Taxa de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* com esporocinetos de *Babesia* spp, colhidas de bezerras e de vacas e mantidas em BOD ou temperatura ambiente, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, em Pedro Leopoldo, MG. 45

Tabela 4. Taxa de infecção, por faixa etária, das teleóginas de *Boophilus microplus* colhidas em bezerras mantidas a campo, no período de março/1999 a fevereiro/2001, no município de Pedro Leopoldo, MG.45

Tabela 5. Taxa de infecção de teleóginas colhidas nos bezerros mantidos em isolamento, avaliada por exame direto de hemolinfa em esfregaço corado pelo Giemsa. Distribuição por faixa etária 46

Tabela 6. Porcentagem de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* por *Babesia* sp colhidas nos períodos seco e chuvoso, no município de Pedro Leopoldo, MG, e examinadas através do exame direto de hemolinfa e da Reação em Cadeia da Polimerase. ... 46

Tabela 7. Distribuição das espécies de *Babesia* sp que infectavam teleóginas de *Boophilus microplus*, identificadas por PCR, no período seco (compreendido entre os meses de abril e setembro de 1999 e 2000) e chuvoso (compreendido entre os meses de outubro de 1999 e março de 2000 e outubro de 2000 a fevereiro de 2001).....47

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Coleta de amostra de hemolinfa de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i>	32
Figura 2. Esporocinetos de <i>Babesia</i> spp em esfregaço de hemolinfa de <i>Boophilus microplus</i> corado pelo Giemsa	32
Figura 3. Taxa de infecção mensal de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> com esporocinetos de <i>Babesia</i> sp, colhidas de bezerras, relacionada com temperatura e precipitação, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.	48
Figura 4. Médias mensais de dois anos de observações da taxa de infecção de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> com esporocinetos de <i>Babesia</i> sp., colhidas de bezerras e mantidas em estufa ou temperatura ambiente, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.	49
Figura 5. Taxa de infecção mensal de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> com esporocinetos de <i>Babesia</i> sp, colhidas de vacas, relacionada com temperatura e precipitação, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.	50
Figura 6. Médias mensais de dois anos de observações da taxa de infecção de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> com esporocinetos de <i>Babesia</i> sp., colhidas de vacas e mantidas em estufa ou temperatura ambiente, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.	51

Figura 7. Médias mensais de dois anos de observações da taxa de infecção de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> com esporocinetos de <i>Babesia</i> sp., colhidas de bezerras e de vacas e mantidas em BOD, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.	52
Figura 8. Médias mensais de dois anos de observações da taxa de infecção de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> com esporocinetos de <i>Babesia</i> sp., colhidas de bezerras e de vacas e mantidas em temperatura ambiente, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.	53
Figura 9. Médias mensais de dois anos de observações da taxa de infecção de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> com esporocinetos de <i>Babesia</i> sp., colhidas de bezerras e de vacas e mantidas em estufa e no ambiente, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.	54
Figura 10. Géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata, mostrando produtos amplificados de DNA de sangue de bezerros experimentalmente infectados com <i>Babesia bigemina</i> e <i>Babesia bovis</i> , utilizando em A iniciadores específicos para <i>B. bigemina</i> e em B iniciadores específicos para <i>B. bovis</i>	55
Figura 11. Gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata, mostrando produtos amplificados com iniciadores específicos para <i>Babesia bovis</i> e <i>B. bigemina</i> . Amostras de teleóginas positivas ao exame de hemolinfa.	56

Figura 12. Gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata, mostrando produtos amplificados com iniciadores específicos para *Babesia bovis* e *B. bigemina*. Amostras de teleóginas negativas ao exame de hemolinfa. 57

RESUMO

A taxa de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* por esporocinetos de *Babesia* sp, foi analisada durante dois anos de observação em um rebanho leiteiro, mantido em uma propriedade localizada no município de Pedro Leopoldo, MG, área de estabilidade enzoótica para babesiose. A cada 14 dias as teleóginas foram colhidas de bezerras e de animais adultos. Estas foram separadas de acordo com a faixa etária dos animais doadores, posteriormente, divididas, sendo a metade incubada em estufa climatizada e o restante em condições ambientais. Após oito dias, essas teleóginas foram examinadas por meio do esfregaço direto da hemolinfa corado pelo Giemsa e depois fixadas em etanol a 70% para que posteriormente fossem submetidas à extração do DNA e processadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Após a realização de 52 colheitas, 3.763 teleóginas foram obtidas, sendo 1.710 colhidas de bezerras e 2.053 colhidas de vacas. A taxa de infecção total das teleóginas foi de 9,0%. Entretanto, a taxa de infecção das teleóginas colhidas em bezerras (14,6%) foi maior ($p < 0,05$) comparando com as colhidas em vacas (4,4%). O exame direto do esfregaço de hemolinfa apresentou sensibilidade de 78% quando comparado à PCR. A PCR possibilitou a detecção da infecção específica de teleóginas de *B. microplus* por *B. bigemina*, *B. bovis* ou a infecção concomitante das duas espécies. A frequência da infecção das teleóginas por *B. bigemina* foi maior ($p < 0,05$), do que por *B. bovis*.

1- JUSTIFICATIVA

A babesiose é uma doença causada por protozoários intraeritrócitários do gênero *Babesia*, parasitos de animais domésticos e silvestres, transmitida por carrapatos da família Ixodidae. Neste gênero existem 11 espécies. No Brasil ocorrem apenas duas espécies que parasitam bovinos: *Babesia bovis* (Babes, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893). Estas espécies ocorrem em quase todos os países de clima tropical e subtropical, nas regiões compreendidas entre as latitudes 32° N e 32° S, áreas endêmicas do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), que é o principal carrapato vetor destes parasitos (Kuttler, 1988).

Segundo dados da FAO (1998), a população mundial de bovinos é de aproximadamente 1,3 bilhão e destes, 75% são criados em áreas endêmicas para *B. microplus* e, portanto, para babesiose bovina. Esta enfermidade, quando não devidamente controlada acarreta prejuízos, uma vez que apresenta alta mortalidade, reduz os índices de produção do rebanho, com comprometimento da produção de leite, ocasionando abortos e infertilidade temporária dos machos. Além disto, induz a gastos com medidas de controle da babesiose em área endêmica, retarda o desenvolvimento da indústria pecuária em determinadas regiões, levando a perda de mercados consumidores para animais de altas linhagens procedentes de áreas endêmicas (McCosker, 1981).

Em animais importados de regiões livres da infecção, altos índices de mortalidade podem ser esperados quando os bovinos são introduzidos em áreas endêmicas (Kuttler, 1988). Das espécies que infectam bovinos, *B. bigemina* é a menos patogênica, porém, devido a alta prevalência na natureza pode desencadear surtos que levam a grandes perdas econômicas (Figuroa et al, 1992).

O ciclo da *Babesia* spp é complexo, envolvendo três elementos: o hospedeiro (bovino), o agente etiológico e o vetor, *B. microplus*. Os carrapatos se infectam com *Babesia* spp durante as últimas 36 a 24 horas da fase parasitária, quando ingerem maior quantidade de sangue (Callow, 1968). Não é observada

relação entre os níveis de parasitemia no bovino e a taxa de infecção do *B. microplus* (Dallwitz, et al., 1987). No vetor ocorre o ciclo sexual e assexual, envolvendo a formação de esporocinetos, que via hemolinfa infecta os tecidos do carrapato, inclusive o ovário, ocorrendo transmissão transovariana (Melhorn & Schein, 1984).

Na região do Brasil-Central o *B. microplus* desenvolve-se durante todo o ano (Magalhães, 1989) e a transmissão de *Babesia* spp aos bezerros é esperada ser constante, permitindo a imunização natural durante os primeiros meses de vida. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que clima, raça, idade e manejo dos animais, dentre outros, são importantes fatores que interferem na transmissão do protozoário (Friedhoff & Smith, 1981).

Fatores climáticos têm importância na epidemiologia da babesiose, influenciando a intensidade de infecção dos carrapatos ou a transmissão da *Babesia* spp aos hospedeiros.

A variação estacional do *B. microplus* foi demonstrada no estado de Minas Gerais (Magalhães, 1989), afetando a taxa de inoculação do protozoário no hospedeiro. Em locais onde há infestação constante com *B. microplus*, a inoculação de *Babesia* sp é freqüente, ocorrendo um equilíbrio entre o hospedeiro e o parasito. Nestas áreas os bezerros adquirem a *Babesia* spp, aproximadamente, entre quatro a seis semanas de vida, respondendo bem à infecção, por apresentarem resistência natural. Vários fatores têm sido relacionados com a resistência natural: maior atividade eritropoiética da medula óssea, rápida resposta imune celular e presença de hemoglobina fetal nos eritrócitos (Mahoney et al., 1973, 1979). A resistência natural persiste até, aproximadamente, nove meses de idade e os animais ao serem infectados até esta época, apresentam infecção subclínica e adquirem imunidade, caracterizando uma área de estabilidade enzoótica (Kessler et al., 1983).

Em áreas onde a população de vetores é influenciada pelas variações climáticas há desequilíbrio na relação parasito / hospedeiro em determinadas épocas do ano e quando a infecção ocorre após o término da imunidade natural,

propicia o aparecimento de casos clínicos de babesiose, o que caracteriza áreas de instabilidade.

Estudos têm sido realizados para esclarecer os fatores que determinam a instabilidade enzoótica para babesiose. Um desses é a determinação da probabilidade de infecção diária de um hospedeiro por *Babesia* spp (Mahoney, 1964; Mahoney & Mirre, 1971; Mahoney & Ross, 1972), que está relacionada com a taxa de infecção dos carrapatos e, conseqüentemente, com a taxa de inoculação. Segundo esse parâmetro, em rebanhos que recebem de dez a vinte carrapatos / animal / dia, a taxa de inoculação é acima de 0,005, desencadeando a infecção em mais de 75% dos animais do rebanho até os nove meses de idade. Nesse caso ocorre estabilidade enzoótica.

No entanto, em rebanhos com infestações de dois a dez carrapatos/animal/dia, com taxa de inoculação inferior a 0,005, a probabilidade dos animais se infectarem após os nove meses de idade é alta e ocorrem casos da doença em animais adultos, com alta taxa de mortalidade, o que caracteriza uma área de instabilidade enzoótica.

A compreensão dos fatores que levam ao aparecimento da instabilidade enzoótica requer estudos complexos, envolvendo a determinação da taxa de infecção dos carrapatos, taxa de infestação dos bovinos, dados climáticos e programas de controle de carrapatos.

Vários fatores têm sido descritos como capazes de influenciar a transmissão de *Babesia* spp dos bovinos aos vetores, e vice-versa, destacando-se:

- teleóginas que se alimentam em animais com infecção clínica têm maior probabilidade de se infectarem (Riek, 1964; 1966);
- bovinos mantêm a capacidade de infectar carrapatos com *B. bovis* por toda vida em gado europeu (Mahoney et al., 1973), mas os zebus podem eliminar o parasito em três anos (Johnston et al., 1978);
- com relação à *B. bigemina*, os bovinos podem eliminar a infecção e, portanto, deixarem de infectar os carrapatos dentro de um ano (Callow et al., 1974; Johnston et al., 1978).

-
-
- temperaturas abaixo de 20°C, por período contínuo de sete dias, inibem o desenvolvimento de *Babesia* spp nas teleóginas (Riek, 1964);
 - *Babesia* spp pode causar efeitos patogênicos traduzidos por redução da postura e morte das teleóginas (Friedhoff, 1982).

A detecção de *Babesia* spp em teleóginas de *B. microplus* tem sido realizada por meio do exame da hemolinfa (Burgdorfer, 1970), sendo que o melhor período para estudo da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas está entre o oitavo e décimo dia após o desprendimento natural do hospedeiro vertebrado (Guglielmone et al., 1985). Embora seja o método utilizado para o estudo da taxa de infecção dos carrapatos, este apresenta algumas limitações: não permite a diferenciação das espécies apenas pelos aspectos morfológicos dos esporocinetos (Buscher, 1988; Guglielmone et al., 1996), existe uma grande variação na quantidade de hemolinfa extraída de diferentes carrapatos (Guglielmone et al., 1985) e a observação direta do parasita por meio do exame da hemolinfa é trabalhosa e demorada.

Devido a essas limitações são necessários estudos que desenvolvam métodos que possuam alta sensibilidade e especificidade, capazes não somente de detectar a presença do protozoário no vetor, mas também de diferenciar especificamente esta infecção. Nos últimos anos, com os avanços na biologia molecular, vários autores têm utilizado métodos específicos para detecção de DNA de *Babesia* spp, principalmente, para avaliar a eficácia de vacinas e diagnosticar bovinos portadores do parasito. Tais análises têm sido realizadas simultaneamente pela amplificação do DNA do parasita por meio da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e pela hibridização dos produtos da PCR usando sondas espécie-específicas de DNA (Figuroa & Buening, 1995).

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Biologia da *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no vetor. Aspectos epidemiológicos da infecção do *Boophilus microplus* por *Babesia* spp e da transmissão da babesiose.

Os primeiros estudos relativos à elucidação do ciclo biológico de *Babesia* spp. no vetor biológico foram realizados por Koch (1906) com a *B. bigemina*. Posteriormente, outros pesquisadores realizaram trabalhos com este mesmo parasito, demonstrando a ocorrência de formas do ciclo biológico diferenciadas em ovos e hemolinfa de *Margaropus annulatus* (= *Boophilus annulatus*) (Crawley, 1915) e *B. microplus* (Rosembusch, 1927).

Riek (1964) ao estudar o ciclo biológico de *B. bigemina* em *B. microplus* colhidos em bovinos com infecção experimental, observou que todas as formas presentes em esfregaços de sangue periférico eram encontradas no interior dos eritrócitos intactos no conteúdo intestinal do carrapato, durante as primeiras 24 horas. Em seqüência, evidenciou também que várias formas eritrocíticas ingeridas eram destruídas no intestino do vetor, e que somente as formas ovais e arredondadas sobreviviam. A primeira indicação da invasão dos parasitos em células epiteliais do intestino ocorria 24 horas após a repleção, quando foi evidenciada a presença de estruturas fusiformes com a massa de cromatina na região central, medindo 10 μm x 2 μm . Durante o período de 48 a 60 horas estes parasitos multiplicavam-se por fissão múltipla dando origem a um grande número de corpos em forma de clava ou vermículos na luz intestinal. Os vermículos medindo 9,0 – 13,0 μm x 2,0 – 2,9 μm (média de 11,0 μm x 2,5 μm) migravam através da parede intestinal, indo para a hemolinfa, onde atingiam a maturidade e invadiam vários órgãos da cavidade geral. Após o quarto dia, alguns vermículos invadiam células dos túbulos de malpighi e da hemolinfa, onde uma segunda multiplicação por fissão múltipla, formava novos vermículos, iguais aos originados nas células epiteliais do intestino. Descreveu ainda que vermículos invadiam o sistema reprodutor, efetivando a transmissão vertical e atingindo o estágio larvar,

onde novamente multiplicavam-se nas células intestinais. O autor verificou que o final do ciclo biológico no vetor ocorria na glândula salivar do estágio ninfal e as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado apareciam oito a dez dias após a fixação das larvas. As formas encontradas nesse ciclo resultaram também de fissões múltiplas, porém diferiam em relação ao tamanho e forma, visto que mediam 2,2 - 2,7 μm x 1,0 - 1,5 μm , com forma similar aos corpos piriformes encontrados nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado. Este autor, ao descrever o ciclo de *B. bigemina* em *B. microplus*, observou que 90% das teleóginas colhidas de bovinos com parasitemia superior a 20% morreram após o sétimo dia de incubação. Para explicar o fenômeno o autor relacionou esta mortalidade com as alterações de permeabilidade na parede intestinal, em consequência da multiplicação destes protozoários nas células epiteliais e com a passagem de hemoglobina para hemolinfa.

Riek (1966) ao estudar, em condições experimentais, o desenvolvimento e a morfologia de *Babesia argentina* (Lignieres, 1903) (sinônimo de *B. bovis*) nos hospedeiros vertebrado e invertebrado, considerou o ciclo biológico no vetor *B. microplus* similar ao descrito para *B. bigemina* (Riek, 1964). Nos esfregaços de sangue periférico do hospedeiro vertebrado foram observados parasitos com formas simples e esféricas, ou pareadas com aspecto piriforme. Os corpos pareados mediam 1,5 - 2,3 μm x 1,0 - 1,5 μm (média de 1,8 μm x 1,2 μm) e apresentavam-se formando um ângulo obtuso. Segundo o autor, estas formas são diferenciadas das de *B. bigemina* com base na morfologia e relação do material nuclear com o citoplasma. No hospedeiro invertebrado, estas formas foram observadas nos eritrócitos intactos em esfregaços do conteúdo intestinal, quando confeccionados logo após a queda natural das teleóginas. Após o período de 24 horas era observado o predomínio das formas esféricas. Por volta de 38 horas, parasitos em formas de charutos se reproduziam por fissão múltipla. As primeiras formas vermiculares foram encontradas na hemolinfa a partir do terceiro e quarto dias de incubação. Mais tarde, os vermículos maduros medindo 14,3 - 16,9 μm x 2,8 - 3,5 μm (média de 15,8 μm x 3,0 μm) migravam para o ovário, penetravam nos ovos, onde estabeleciam um ciclo nas células intestinais das larvas em

desenvolvimento, produzindo vermículos semelhantes aos observados nas teleóginas. Dois a três dias após a fixação das larvas, estas formas migravam para as glândulas salivares, onde se multiplicavam por fissão múltipla, as quais tornavam-se infectantes para o hospedeiro vertebrado. As formas infectantes adquiriam um aspecto piriforme no interior da glândula salivar, medindo em torno de 1,5 x 1,0 μm . Este autor registrou que durante o quinto e o sétimo dias de incubação havia uma acentuada taxa de mortalidade das teleóginas de *B. microplus* colhidas em bovinos com parasitemia por *B. argentina* superior a 5%.

Pelos estudos realizados por Anthony et al (1970) ficou evidenciado uma grande interferência do parasitismo por *Babesia caballi* (Nuttal & Strickland, 1910) na longevidade e potencial reprodutivo de fêmeas de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897). Os autores verificaram que as teleóginas colhidas após o desprendimento natural do hospedeiro vertebrado infectado, apresentaram-se com peso menor e capacidade de postura inferior, quando comparadas com fêmeas ingurgitadas em hospedeiro não infectado. Também foi constatada alta taxa de mortalidade das teleóginas ingurgitadas em eqüinos infectados, entre o período de sete a dez dias de incubação. Segundo os autores, alguns aspectos como o da redução no peso e da taxa de eclosão dos ovos originados de fêmeas infectadas estavam associados à intensa multiplicação dos parasitos nos ovários e, por conseguinte nos ovos.

Tendo em vista a dificuldade de detectar a infecção de carrapatos por agentes patogênicos, Burgdorfer (1970) desenvolveu uma técnica para examinar a hemolinfa destes artrópodes. O exame consistia na obtenção de uma gota de hemolinfa, através da amputação da porção distal de uma das patas do carrapato. Este material era recolhido em uma lâmina de vidro limpa, espalhado, fixado a quente e após a coloração pelo método de Giménez era examinado em microscópio óptico, através da objetiva de imersão. Este autor destaca a importância do exame de hemolinfa para pesquisar carrapatos infectados com agentes causadores de rickettsioses, babesioses, anaplasmoses e espiroquetas. Cita também que há variação na quantidade de hemolinfa e de hemócitos recuperados em diferentes carrapatos. Espécies pequenas, como por exemplo

Ixodes ricinus, *Haemophysalis leporipalustris* e *Rhipicephalus sanguineus*, frequentemente não fornecem hemolinfa para o exame microscópico. O autor discute ainda sobre as técnicas utilizadas anteriormente para o exame dos carrapatos. Segundo o pesquisador, estas técnicas eram trabalhosas e caras. Grupos suspeitos de carrapatos eram colocados para se alimentar em animais susceptíveis, ou macerados e injetados nos mesmos. Este macerado com “pool” de carrapatos poderiam conter vários patógenos diferentes. Portanto, a técnica do exame de hemolinfa provou ser simples, rápida e econômica, além de permitir que os carrapatos infectados fossem colocados individualmente para se alimentar ou fossem macerados e inoculados em animais de laboratório susceptíveis. Este fato permitiria o isolamento e a identificação do agente patogênico.

Em seus estudos sobre a taxa de infecção do carrapato vetor *B. microplus* mantidos em bovinos infectados com *B. argentina* (sinônimo de *B. bovis*) e *B. bigemina*, Mahoney & Mirre (1971) observaram a presença de vermículos nas amostras de hemolinfa colhidas de teleóginas entre o quinto e o sétimo dia de incubação. Verificaram também, que no total de teleóginas colhidas dos bovinos parasitados com *B. argentina*, 30% apresentavam-se infectadas. Entretanto, nas teleóginas infectadas com *B. bigemina*, a taxa de infecção foi de 36%. Observando a dinâmica da transmissão transovariana de *B. bovis* por *B. microplus*, revelaram uma baixa proporção de ovos infectados durante os primeiros cinco dias após a queda das teleóginas. Entretanto, as amostras de ovos colhidas no sexto e sétimo dia apresentaram índice de infecção acentuado.

Callow et al (1974) discutiram sobre os fatores que poderiam propiciar surtos de babesiose e anaplasiose nos animais. Dentre estes, cita o risco da introdução de animais susceptíveis em áreas onde a transmissão é constante, a resistência dos animais quando infectados antes de completarem nove meses de vida e a existência de áreas de estabilidade e instabilidade enzoótica.

Friedhoff & Buscher (1976) após revisarem os trabalhos que apresentavam propostas sobre o estágio sexual de *Theileria parva* (Theiler, 1904), estudaram o desenvolvimento de *B. bigemina* em fêmeas de *B. microplus*. Nos exames das amostras do conteúdo intestinal extraídas de teleóginas recolhidas após o

desprendimento natural de bovinos experimentalmente infectados, observaram grande número de formas do parasito com aspecto raiado (“Strahlenkorper”) com acentuada variação na morfologia e tamanho durante o período de sete a 19 horas de incubação. Embora estes dados tenham sugerido uma grande evidência da existência de reprodução sexuada em *B. bigemina*, os autores não conseguiram explicar a importância destas formas no ciclo biológico deste protozoário.

El Allawy (1977) examinou esfregaços de hemolinfa e ovos de *B. annulatus* infectados com *B. bigemina* e observou merozoítos com aspecto claviforme. Cada merozoíto era constituído de um núcleo corado de vermelho, localizado na região mediana, e citoplasma levemente azulado com um grande vacúolo. Estes merozoítos não só apresentavam as mesmas características morfológicas, como também possuíam aproximadamente o mesmo comprimento. Durante a realização dos exames das amostras de ovos com diferentes dias de incubação, foi registrado um aumento progressivo no número de merozoítos, caracterizando assim a influência do período de incubação na reprodução dos merozoítos e na infecção dos ovos. Após estas observações o autor considerou o sexto dia de incubação como um limite ideal para realizar os exames das amostras de ovos.

Morzaria & Brocklesby (1977) utilizando dados morfométricos como principal critério para o diagnóstico diferencial entre vermículos de *Babesia major* (Sergent, Donatien, Parrot, Lestoquard & Plantureaux, 1926) e *B. bigemina* em esfregaços de hemolinfa obtidos de fêmeas de carrapatos *Haemaphysalis punctata* com infecção experimental, observaram a presença de duas formas de vermículos para cada espécie. Os vermículos com vacúolos citoplasmáticos foram considerados como formas maduras e os vermículos não vacuolados como formas imaturas. As medidas dos vermículos imaturos de *B. major* variaram de 16,75 – 16,69 μm x 3,86 – 4,15 μm (média de 16,22 μm x 4,01 μm), que após atingirem a maturidade passaram a medir entre 15,20 – 15,86 μm x 2,92 – 3,13 μm (média de 15,53 μm x 3,0 μm). As mensurações realizadas em vermículos maduros de *B. bigemina* resultaram em valores menores, que variaram entre 11,46 – 12,12 μm x 2,45 – 2,65 μm (média de 11,79 μm x 2,55 μm). Ao

compararem os valores médios das formas maduras de *B. major* e *B. bigemina*, os autores concluíram que a diferença observada no comprimento dos vermículos podia ser adotada como mais um critério para o diagnóstico diferencial entre estas espécies do gênero *Babesia* parasitos de bovinos.

Stewart (1978) trabalhando com duas cepas de *B. bovis*, uma modificada por passagens sucessivas em hospedeiro vertebrado e outra não modificada, observou grandes variações no ciclo biológico destes protozoários no hospedeiro invertebrado *B. microplus*. Os espécimes originados das duas cepas de *B. bovis* encontrados no conteúdo intestinal durante as primeiras 16 horas após a queda natural das teleóginas, apresentavam-se com grande semelhança morfológica. Após este período, suas estruturas se diferenciavam. No período compreendido entre 16 e 24 horas pós repleção, um grande número de parasitos com formas esféricas sem evidenciar sinais de multiplicação foram encontrados em esfregaços de conteúdo intestinal obtidos de teleóginas infectadas com a cepa não modificada. Entre o terceiro e o quarto dia de incubação observou-se redução das formas esféricas encontradas no conteúdo intestinal, devido a penetração e multiplicação nas células epiteliais e subsequente aparecimento de formas vermiculares na hemolinfa. Ao contrário, as formas esféricas da cepa modificada permaneceram em grande número durante todo o período de observação. Algumas formas sugerindo um processo de multiplicação foram observadas entre 16 e 144 horas pós-repleção. Somente as teleóginas infectadas com a cepa não modificada, apresentaram formas evolutivas em vários órgãos como túbulos de malpighi, músculos e ovários, com subsequente infecção e multiplicação nos ovos e larvas. Os vermículos observados em hemolinfa mediram 14 – 16 μm de comprimento, no entanto nas larvas foram descritos medindo entre 13 -16 μm de comprimento.

Realizando estudos sobre a epidemiologia da babesiose, Callow (1979) observou que após a transmissão transovariana de *B. bovis* e *B. bigemina* no carrapato, ocorrem diferenças de transmissão dos dois patógenos para o bovino, na próxima geração do carrapato. Para *B. bovis* a infectividade termina no final do estágio larvar, mas não se inicia para *B. bigemina* até a metade do estágio de

ninfa. Entretanto, a transmissão de *B. bigemina* parece ser contínua durante o estágio de ninfa e adulto, tanto em machos quanto em fêmeas. O exame da glândula salivar indicou que as fêmeas repletas e os machos acima de 35 dias de idade podem ser transmissores. A consequência epidemiológica deste padrão é que o período pré patente para *B. bovis* (um período mínimo de seis a sete dias) é cerca de uma semana mais curto do que para *B. bigemina*. Outro fator é que *B. bigemina* pode ser mais facilmente dispersada do que *B. bovis*, devido ao fato de ser transmitida por mais de um estágio, especialmente por machos adultos. O *Boophilus* pode se transferir de um bovino a outro quando estes estão muito próximos. Outra possível consequência da persistência de *B. bigemina* em estágios adultos, é que o carrapato repleto pode se reinfetar com sua própria secreção salivar infectada. Este fato pode explicar as observações de que carrapatos podem reter a infecção com certas espécies de *Babesia*, quando se alimentam em hospedeiros não naturais. Em geral, *B. bigemina* tem sido detectada em esfregaços sanguíneos mais precocemente e mais frequentemente do que *B. bovis*. Esta maior facilidade de detectar *B. bigemina* em esfregaços sanguíneos também pode ser explicada por sua alta parasitemia no sangue periférico.

Akimboade & Dipeolu (1981) investigando a infecção experimental de *B. bovis* e o seu comportamento no carrapato *Boophilus gaigyi* (Aeschlimann & Morel, 1965) concluíram que, o aparecimento inicial dos vermículos na hemolinfa ocorria entre o quarto e o sexto dia após o ingurgitamento das teleóginas. Posteriormente, foi registrado um aumento progressivo no número de vermículos até o oitavo dia, sendo em seguida, observada uma redução acentuada até o total desaparecimento destas formas a partir do 14^o dia após a queda natural das teleóginas. Os exames dos ovos destas teleóginas registraram a presença de vermículos a partir do quinto dia, com aumento no número de parasitos até o 24^o dia de incubação. A partir deste período, os vermículos raramente foram detectados.

Dagliesh et al. (1981)(b) verificaram que as passagens sucessivas das cepas de *B. bigemina* no hospedeiro vertebrado interferiam na morfologia e

infecciosidade destes protozoários no intestino do hospedeiro invertebrado *B. microplus*. Os autores consideraram que as fêmeas desta espécie infectadas com cepas submetidas a um baixo número de passagem em hospedeiro vertebrado apresentavam número reduzido de corpos raiados durante as primeiras 48 horas de incubação. Ao contrário, as fêmeas infectadas com cepas de alta passagem evidenciaram grande número de corpos raiados no tubo digestivo, por período superior a 72 horas de incubação. Para Dalglish et al. (1981) (a) a presença do grande número de corpos raiados estava associada com a redução da infecciosidade das cepas para o carrapato. Estes autores observaram também, que 70% das teleóginas obtidas de bovinos infectados com cepa de *B. bovis* não modificada por passagens sucessivas em hospedeiro vertebrado apresentaram hemolinfa com coloração vermelho escuro. Tal alteração na cor da hemolinfa foi considerada como resultado da passagem de hemoglobina para a hemolinfa, conseqüente da intensa destruição das células epiteliais do intestino do carrapato durante a multiplicação dos parasitos. Verificaram também que tanto as teleóginas infectadas com cepas não modificadas, quanto as infectadas com cepas modificadas por passagens sucessivas em bovinos, apresentaram igual número de vermículos encontrados na hemolinfa. Entretanto, somente nas teleóginas infectadas com cepa não modificada foi registrada grande taxa de mortalidade após o oitavo dia de incubação.

Em estudos experimentais, Davey (1981) observou que a presença de *B. bovis* não interferiu significativamente no peso das fêmeas de *B. microplus*, embora as fêmeas não infectadas tivessem apresentado um peso superior (409,3 mg) ao das fêmeas infectadas (395,6 mg). O período de pré-postura registrado no grupo de teleóginas não infectadas e infectadas não apresentou grande diferença (3,7 e 3,8 dias, respectivamente). As massas de ovos obtida das fêmeas não infectadas (162,5 mg) foram significativamente maiores do que as colhidas das fêmeas infectadas (93,1 mg). O período de postura apresentado pelo grupo das teleóginas não infectadas foi mais longo (15,7 dias), quando comparado com o grupo das teleóginas infectadas (8,8 dias). O período de incubação (26 dias) e a

taxa de eclosão (85%) dos ovos colhidos nos grupos das fêmeas não infectadas e infectadas, não sofreram interferência da infecção por *B. bovis*.

Stewart & Dalgliesh (1981), descrevendo aspectos do mecanismo de transmissão dos parasitos do gênero *Babesia*, consideraram o ciclo biológico de *B. bigemina* no hospedeiro vertebrado e invertebrado similar ao descrito para *B. bovis*. Os autores observaram que o desenvolvimento do ciclo no hospedeiro invertebrado tinha início com a ingestão dos eritrócitos infectados, seguido da penetração dos parasitos nas células epiteliais do intestino, com subsequente multiplicação e reprodução dos vermículos ou merozoítos. Na hemolinfa, os vermículos migravam para o oviduto, penetravam nos ovos em desenvolvimento, multiplicavam-se e permaneciam inativos até a eclosão das larvas. Quando da fixação destas larvas no hospedeiro vertebrado, os vermículos alcançavam as células das glândulas salivares produzindo grande número de pequenos esporozoítos, que foram considerados as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado.

Melhorn & Schein (1984), estudando o ciclo biológico das espécies do gênero *Babesia*, descreveram vários aspectos do desenvolvimento destes protozoários nos respectivos vetores. Inicialmente observaram a fusão dos gametas na luz intestinal, com produção de “cinetos” durante as primeiras horas após a queda das teleóginas. Constataram também que os cinetos migravam através da parede intestinal e alcançavam a cavidade geral, invadindo e reproduzindo-se assexuadamente em células de vários órgãos do carrapato, principalmente nos hemócitos, fibras musculares, túbulos de malpighi e células do ovário, incluindo oócitos. Durante o período de incubação dos ovos, os “cinetos” evoluíam nas células epiteliais do intestino das larvas em desenvolvimento. Após o início da fixação das larvas dos carrapatos no hospedeiro vertebrado, os protozoários migravam para as glândulas salivares onde perdiam sua forma característica de cineto dando origem a uma nova fase, denominada “esporonte”, a qual evoluía para esporozoíta, considerada a forma infectante para o hospedeiro vertebrado.

Guglielmone et al. (1985) pesquisaram a presença de vermículos de *B. bovis* e *B. bigemina* em hemolinfa de teleóginas de *B. microplus* entre o quarto e o décimo dia após desprenderem-se dos hospedeiros. Os autores verificaram que a probabilidade em detectar a presença de vermículos em fêmeas de *B. microplus* mantidos em bovinos com baixa parasitemia (até 1,5%), foi maior quando os esfregaços de hemolinfa foram confeccionados no período compreendido entre o nono e o décimo dia após a queda natural das teleóginas. Para teleóginas mantidas em bovinos com uma parasitemia de 3,5%, o melhor dia para exame foi o sexto dia após a queda da fêmea ingurgitada. Estes autores sugerem que a infecção simultânea de *B. microplus* com *B. bigemina* e *B. bovis* não causa uma interação que produza a prevalência de uma espécie de *Babesia* sobre a outra ou modifique o ciclo biológico de alguma delas. Estes autores observaram ainda, a mortalidade de 70% das teleóginas de *B. microplus* que ingurgitaram em bovinos com parasitemia de 1,5% para *B. bovis* e 3,5% para *B. bigemina*. Entretanto, em animais com grau de parasitemia de 1,5% por *B. bovis* e *B. bigemina*, a taxa de mortalidade foi reduzida. Agbede et al. (1986), ao descrever o desenvolvimento de *B. bovis* no intestino de teleóginas de *B. microplus* infectadas experimentalmente, também verificaram a presença de corpos raiados (Strahlenkorper) no interior das células basófilas após o terceiro dia de incubação. Observaram ainda a presença de corpos em divisão que, após um período de 24 horas, evoluíram para “cinetos” no interior das células intestinais.

Stewart et al. (1986) estudando o desenvolvimento e a morfologia de *B. bigemina* nas fêmeas de *B. microplus* infectadas naturalmente, observaram nas primeiras 24 horas pós-repleção a presença de parasitos com formas ovais, esféricas, amebóides e piriformes, semelhante as descritas em sangue periférico do hospedeiro vertebrado. Os parasitos piriformes foram encontrados com formas simples ou pareadas. Neste período de 24 horas pós-repleção, um pequeno número de parasitos com formas esféricas, medindo 7 µm de diâmetro foram observados no conteúdo intestinal. Nas amostras colhidas 48 horas após a repleção das teleóginas, os autores identificaram parasitos localizados intra e extracelularmente com estrutura celular precursora de fissão, assim como, corpos

imaturos em diferentes fases de divisão celular. Em 72 horas após a repleção das teleóginas, foi observado um grande número de corpos maduros em divisão e vermículos (merozoítas), tanto nas células epiteliais do intestino do carrapato como, aparentemente, na luz intestinal.

Young & Morzaria (1986) em uma revisão sobre o ciclo biológico de *Babesia*, especialmente *B. bovis* e *B. bigemina* relatam que a maioria dos parasitos ingeridos junto com o sangue do hospedeiro morre no intestino do carrapato. Por outro lado, alguns dos estádios intraeritrocitários ovóides ou esféricos deixariam o eritrócito e se diferenciariam originando estádios mononucleares, conhecidos como “corpos raiados”, os quais são esféricos ou polimorfos, com diâmetro de cerca de 4 a 7 μm . Estes seriam rodeados por uma única membrana com vários microporos. Considera-se que estes corpos raiados sejam os gametas. Cerca de dois a quatro dias após o ingurgitamento das teleóginas, estes gametas iriam se parear e então se fundir para formar um zigoto esférico. Quando observados através de microscopia óptica, este par aparentemente seria formado por isogametas. Porém, segundo estes autores, diferenças na densidade elétrica destes dois indivíduos poderiam ser observadas através de microscopia eletrônica. O zigoto esférico sofreria transformação para formar um cineto uninuclear, alongado e móvel, o qual poderia ser chamado de cineto primário ou oocineto. Este invadiria o epitélio intestinal para iniciar a divisão assexuada e formar mais cinetos. Estes seriam liberados das células do epitélio intestinal e alcançariam a hemolinfa para invadir os hemócitos, as células dos túbulos de Malpighi, as fibras musculares, as células do ovário e os oócitos. Nestas células o parasito sofreria posterior divisão assexuada para produzir mais cinetos. Estes ciclos de divisão continuariam, sem sincronização, em fêmeas repletas do carrapato durante o período de pré-postura e de postura até que as teleóginas morressem. O complicado processo de reprodução dos cinetos pode ser dividido em três principais estádios. O primeiro é a invasão do citoplasma das células do hospedeiro, onde o cineto se aloja dentro de um vacúolo parasitóforo e se transforma em uma forma polimórfica. O segundo estágio envolve a formação de um citômero uninucleado para produzir uma fisão do corpo. No estágio final, o

citômero sofre um processo de diferenciação para formar numerosos cinetos, os quais deixam a célula para continuar posteriores ciclos de divisão. Estes cinetos derivados de repetidas divisões assexuadas são denominados de esporocinetos e o processo de formação dos mesmos é conhecido como esporogonia. Os antigos termos “merozoíto” e “vermiculo” para estes estádios deixam de ser válidos. Após a infecção dos oócitos do carrapato, os parasitos, aparentemente, permanecem dormentes até que o desenvolvimento dos tecidos da larva dentro dos ovos continue. Entretanto, quando a progênie do carrapato infectado começa a se alimentar, um processo de esporogonia pode ocorrer, o qual é similar à infecção primária no adulto.

Em um trabalho realizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, no período compreendido entre novembro de 1983 e novembro de 1987, Magalhães (1989), fez importantes observações sobre a variação estacional do *Boophilus microplus*. A infestação por este carrapato foi evidenciada nos bovinos durante todos os meses do ano. O grau médio de parasitismo foi de 138 carrapatos por animal, com uma variação de 10 a 415. Quatro gerações de carrapatos foram observadas sobre os animais, por ano, em condições naturais. As populações de *B. microplus* variaram muito em tamanho dentro e entre os anos, em razão das diferentes condições climáticas. No entanto, esta região é considerada uma área de estabilidade enzoótica para a babesiose.

Friedhoff (1990) estudando as interações existentes entre a *Babesia* sp e o carrapato, cita que o desenvolvimento do protozoário no trato digestivo do vetor pode ser inibido quando este se alimenta em um bovino imune à *Babesia*. Porém, a antigenicidade estágio-específica dos subseqüentes estádios de *Babesia* (estádio sexuado e esporocinetos, por exemplo), impediria as reações adversas com os anticorpos depois que os protozoários tenham sido liberados dos eritrócitos no intestino do carrapato.

Alonso et al (1992) realizam um detalhado estudo sobre os fatores que seriam relevantes na epidemiologia da babesiose e da anaplasmoze na América Latina e no Caribe. Dentre outros fatores, citam a importância da composição genética do rebanho, uso de acaricidas, taxa de lotação e manejo das pastagens

e variações climáticas na determinação da ocorrência ou não de surtos de babesiose e anaplasnose.

O ciclo biológico da *B. bigemina* e da *B. canis* foi estudado por Mackenstedt et al. (1995) por meio de medidas dos níveis de DNA de seus diferentes estágios, analisando a fluorescência dos mesmos através de fotometria, após serem corados com Hoechst 33258, um corante específico para DNA. Estas medidas forneceram provas diretas da reprodução sexuada, com fusão de gametas e formação do zigoto, seguida por uma divisão mitótica. Ambas as espécies de *Babesia* são consideradas como membros típicos do gênero *Babesia*. Entretanto, as medidas de DNA revelaram importantes diferenças no ciclo de vida destes parasitos, indicando que as espécies de *Babesia* não são caracterizadas por um ciclo de vida típico específico deste gênero.

Os efeitos da infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* sobre a capacidade reprodutiva das teleóginas de *B. microplus* foram avaliados por Farias (1994), por meio de indicadores como a capacidade de postura das teleóginas e fertilidade dos ovos, estimando-se a possível repercussão desses efeitos na epidemiologia dos protozoários. Foi observado o grau de infecção por *Babesia* spp e seus efeitos sobre os parâmetros morfométricos e a massa das teleóginas, bem como sobre a produção total de ovos e sua fertilidade. A infecção dos carrapatos por *Babesia* spp causou uma redução da produção total de ovos e da fertilidade destes. A redução causada por *B. bigemina* foi mais intensa do que a causada por *B. bovis*, determinando um efeito diferencial no potencial reprodutivo da população de carrapatos.

Gaido & Guglielmo (1995) estudando a dinâmica da taxa de infecção das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* por esporocinetos de *Babesia bigemina*, citam que esta é uma variável de distribuição binomial negativa. Segundo este parâmetro, a maioria das fêmeas de carrapato estariam parasitadas com um pequeno número de esporocinetos, enquanto um pequeno número de teleóginas estariam fortemente infectadas com *Babesia*.

Melendez & Forlano (1996) realizaram um experimento para determinar a incidência e a intensidade de infecção de teleóginas de *B. microplus* por

esporocinetos de *Babesia* ao longo de 14 meses de observação, em duas propriedades localizadas na região central da Venezuela. Estes autores acompanharam dois rebanhos leiteiros, com diferentes programas de controle do carrapato. No primeiro rebanho (rancho A) o grupo experimental era composto por novilhas, submetidas a um rígido programa de controle de carrapatos, sendo os animais submetidos quinzenalmente a banhos carrapaticidas. No segundo rebanho (rancho B), o grupo experimental era composto de animais jovens, com menos de um ano de idade, e os banhos com carrapaticida não eram freqüentes, e sim baseados na observação visual do aparecimento de carrapatos sobre os animais. A incidência de esporocinetos de *Babesia* nas teleóginas, evidenciada por meio do exame direto da hemolinfa corado pelo Giemsa, foi maior no rancho B do que no rancho A. Esta incidência também foi maior durante a estação seca quando comparada com os valores obtidos na estação chuvosa. A intensidade de infecção por esporocinetos de *Babesia* foi maior no rancho B do que no rancho A. Nesta região, sabe-se que a incidência e a soroprevalência da babesiose bovina é maior durante a estação seca. Embora os níveis de incidência mensal de esporocinetos de *Babesia* em seu carrapato vetor sejam baixos ou negativos durante a estação chuvosa em ambos os ranchos, os níveis de intensidade deste protozoário em *B. microplus* foram maiores durante a mesma estação. Este fato comprova que não há correlação entre a parasitemia por *Babesia* sp observada nos animais e a infectividade para os carrapatos.

Preocupados com a necessidade de diferenciar as espécies de *Babesia* que infectam os carrapatos, Guglielmone et al (1996) citam que as diferenças morfológicas dos esporocinetos de *B. bovis* e *B. bigemina* encontrados em *B. microplus*, não são parâmetros confiáveis para identificação específica. Estes autores enfatizam sobre a necessidade do desenvolvimento de técnicas mais precisas, provavelmente, utilizando biologia molecular para diagnosticar as espécies de *Babesia* no vetor, e enriquecer os conhecimentos sobre a epidemiologia da babesiose.

Guglielmone et al (1997) realizando avaliações quantitativas sobre a infecção natural da hemolinfa de teleóginas de *B. microplus* por esporocinetos de

Babesia sp, relatam que a mediana mostrou-se mais apropriada para avaliar a distribuição desta infecção. A média, por outro lado, foi gravemente distorcida, uma vez que poucos carrapatos carregavam um grande número de esporocinetos. Citam ainda, que de acordo com resultados de trabalhos anteriores, o nível de infecção na hemolinfa parece ser um indicador pobre do nível de infecção nos ovos. Entretanto, destacam que a avaliação qualitativa (infectados / não infectados), mais do que a avaliação quantitativa (número de esporocinetos na hemolinfa) parece ter maior importância epidemiológica no estudo da babesiose bovina. Os autores destacam a necessidade da comprovação posterior destes achados, para determinar se os dados encontrados em condições de laboratório, correspondem às condições naturais. Para isso, seria necessário o desenvolvimento de técnicas mais precisas para diferenciar as infecções por *B. bovis* e *B. bigemina* na hemolinfa do carrapato.

Ribeiro & Patarroyo (1998) observaram por meio de microscopia eletrônica de transmissão, que *B. bigemina* mantida “in vitro”, em cultura de eritrócitos, se transformam nos estádios sexuais do parasito, caracterizados pela formação de projeções citoplasmáticas e de microtúbulos. Estes parasitos, após estas modificações, aderiram aos pares com posterior fusão de suas membranas. Neste estudo, os autores observaram somente a fase inicial da união de gametas, não ocorrendo a fusão nuclear, possivelmente devido a falta de condições favoráveis para o prosseguimento do processo reprodutivo na cultura “in vitro”.

Realizando estudos sobre a variação sazonal do *B. microplus* em uma propriedade localizada na Região Metalúrgica do estado de Minas Gerais, Lima et al (2000) observaram que o clima nesta região é caracterizado por duas estações: uma estação seca (abril a setembro) com baixas temperaturas e outra chuvosa, com temperatura mais elevada, correspondente ao verão (outubro a março). A população de carrapatos sofre uma queda durante a estação seca. Foram observados quatro picos de infestação dos animais durante o experimento, o que corresponderia a quatro gerações por ano, dados estes que estão de acordo com os de Magalhães (1989). Os picos no número de carrapatos foram precedidos por

precipitações mais intensas, constatando-se que a chuva foi o fator climático que mais afetou a variação sazonal dos mesmos.

2.2 – Utilização de técnicas moleculares para pesquisa de *Babesia* spp e outros protozoários em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados

Devido às limitações já apresentadas referentes ao exame direto do esfregaço de hemolinfa, segundo as quais esta técnica apresenta desvantagens por não permitir a diferenciação das espécies apenas pelos aspectos morfológicos dos esporocinetos, pelo fato da observação direta do parasito ser trabalhosa e demorada e também por haver uma grande variação na quantidade de hemolinfa extraída de diferentes carrapatos, o que pode comprometer os resultados obtidos, surgiu a necessidade de estudos, que utilizando métodos de alta sensibilidade e especificidade, fossem capazes não somente de detectar a presença do protozoário no vetor, mas também de diferenciar especificamente esta infecção. Nos últimos anos, com os avanços na biologia molecular vários autores tornaram possível a utilização de novas técnicas para diagnóstico de parasitos por meio da detecção de seu DNA, tanto nos hospedeiros vertebrados quanto invertebrados.

Figuerola et al. (1992) com a finalidade de desenvolver iniciadores que pudessem, especificamente, por meio da técnica de PCR, diagnosticar *B. bigemina*, utilizaram um fragmento de DNA repetitivo para obter um par de sequências iniciadoras (BiIA e BiIB), que amplificam um fragmento de DNA de 278 pares de bases (pb), e um segundo par (BiIAN e BiIBN) utilizado para hibridizar com um sítio interno da sequência inicialmente amplificada, resultando num fragmento de 170 bp. Estas sequências mostraram-se bastante específicas, não amplificando DNA de *B. bovis*, *A. marginale* e seis espécies de bactérias e de leucócitos de bovinos.

Fahrimal et al. (1992) utilizaram a técnica da PCR com iniciadores específicos para detectar bovinos portadores de *B. bovis*, e observaram que a sequência alvo dos iniciadores utilizados foi amplificada em DNA de parasitos originários do México, Texas e Austrália, demonstrando a aplicabilidade do método para detectar este parasito. A técnica mostrou ser altamente sensível e específica. Padrões idênticos de amplificação foram obtidos em testes em que a PCR foi também utilizada para detectar animais parasitados com *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* em infecção simples ou associada (Figuroa et al., 1993, 1996, Figuroa & Buening, 1995).

Stich et al. (1993) utilizaram a técnica da PCR com iniciadores específicos para detectar *A. marginale* em amostras de hemolinfa de *Dermacentor andersoni*. Estes autores discutem que a PCR feita diretamente da hemolinfa, poderia evitar o risco de contaminação externa, e a inibição da enzima Taq DNA polimerase pelas proteínas presentes no tubo digestivo do carrapato e por solventes inorgânicos ou agentes desnaturantes.

A partir de uma sequência de DNA que codifica para uma proteína de 60 Kda presente na superfície de *B. bovis* (Suarez et al., 1991), Figuroa et al. (1994) desenvolveram iniciadores (BoF e BoR) capazes de amplificar por PCR uma sequência de 350 pb específica para *B. bovis* e iniciadores (BoFN e BoRN), que marcados com digoxigenina-dUTP hibridizam com uma sequência de 291 pb dentro do produto amplificado pelos iniciadores BoF e BoR.

Examinando exemplares de carrapatos do gênero *Amblyomma* sp infectados experimentalmente com *Cowdria ruminantium* (*Ehrlichia ruminantium*) Peter et al. (1995) compararam a sensibilidade da PCR com a da hibridização com uma sonda de DNA. A PCR e a sonda detectaram as taxas de infecção de 86 e 37%, respectivamente em carrapatos alimentados em um animal febril. Em 75 carrapatos alimentados em animais portadores, a PCR e a hibridização detectaram a infecção em 28% e 1,33% dos exemplares, respectivamente. Estes dados demonstram que a hibridização com a sonda de DNA utilizada possuía

uma pequena sensibilidade para detectar baixos níveis de infecção nos carrapatos, e que a PCR específica seria necessária para este propósito.

Utilizando a técnica da PCR, d'Oliveira et al. (1995) constataram que é possível determinar se animais oriundos de áreas endêmicas para theileriose são ou não portadores do parasito. Além disso, observaram que a PCR pode ser usada para diferenciar *Theileria annulata* de outras espécies não patogênicas e também, para monitorar animais submetidos a vacinação. Neste caso, as amostras de sangue podem ser retiradas dos animais após a vacinação e após o desafio natural com o carrapato, para determinar se os mesmos se tornaram portadores assintomáticos do parasito e se constituem fonte de infecção para *Hyalomma* sp, vetor deste parasito.

Em outro estudo, d'Oliveira et al. (1997) reforçam o papel do *H. dromedarii* como o principal vetor de *T. annulata* na Mauritânia e citam a PCR como uma técnica eficaz para determinar as taxas de infecção dos carrapatos colhidos de animais portadores com baixa parasitemia.

Vários estudos têm demonstrado que algumas substâncias presentes no sangue de mamíferos podem inibir a amplificação da PCR. Para verificar esta possível inibição, Schwartz et al. (1997) realizaram um trabalho no qual pesquisaram, por meio da PCR, a presença de *Borrelia burgdorferi* em exemplares de *Ixodes scapularis*. Os autores observaram que quando o lisado de carrapatos era processado diretamente para a PCR, sem que houvesse uma extração prévia do DNA, a PCR sofria inibição. A inibição era observada tanto em material proveniente de ninfas que haviam realizado o repasto sangüíneo, quanto naquelas que não tinham se alimentado após a ecdise. Por outro lado, quando este mesmo material era submetido à extração do DNA, por meio da utilização de um KIT, havia a remoção destes fatores inibidores.

Watt et al. (1997) adaptaram uma PCR para detectar a infecção de *Rhipicephalus appendiculatus* por *T. parva* e compararam esta técnica com preparações histológicas coradas, para as quais há necessidade de manusear carrapatos vivos. A PCR, além de ter se mostrado uma técnica sensível, permitiu a detecção da infecção em carrapatos fixados em etanol.

Smeenk et al. (2000) recolheram amostras de sangue de 94 bovinos em 12 localidades diferentes do Zimbawe e após a extração do DNA, realizaram uma PCR utilizando “primers” específicos para *B. bigemina* e *B. bovis*. O DNA de *B. bigemina* foi detectado em 35% e de *B. bovis* em 47% do sangue dos animais. A frequência de detecção do DNA de *B. bigemina* foi significativamente maior em animais jovens do que em animais acima de dois anos de idade. Amostras de *Boophilus decoloratus* e de *B. microplus* também foram coletadas e após serem submetidas a PCR, apresentaram o seguinte índice de infecção: 5% das amostras de *B. decoloratus* estavam infectados com *B. bigemina* e 60% com *B. bovis*; dentre as amostras de *Boophilus microplus*, 69% estavam positivas para *B. bovis* e 12% estavam positivas para *B. bigemina*.

Trabalhando em uma área endêmica para babesiose no Estado de São Paulo, Oliveira (2002) utilizou o esfregaço direto de hemolinfa, PCR e nested-PCR (n-PCR) para detectar a infecção de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* por *B. bigemina*. As teleóginas foram coletadas em bezerros e vacas provenientes de um rebanho leiteiro. Os ovos produzidos por estas teleóginas foram examinados por meio de esfregaços de ovos corados com derivados de Romanovski, PCR e n-PCR. O número de teleóginas coletadas de bezerras foi menor que o de vacas. Quanto aos esporocinetos, estes foram encontrados em número significativamente maior em teleóginas coletados de bezerros. Infecções por *B. bigemina* avaliadas pela utilização da técnica de n-PCR, foram detectadas em 60,4% das amostras de teleóginas coletadas em bezerros e em 22,2% das teleóginas coletadas em vacas, evidenciando que um número significativamente mais elevado de teleóginas se infectam quando se ingurgitam em animais jovens.

Dentre as vantagens da técnica da PCR para pesquisas em babesiose bovina podem ser citadas: a alta sensibilidade e especificidade, a rápida diferenciação entre as espécies, a possibilidade de processamento de um grande número de amostras. As desvantagens seriam: a necessidade de um laboratório equipado para estudos com biologia molecular, a capacitação de técnicos preparados para seguir detalhadamente os protocolos e o custo relativamente alto do teste (Buening & Figueroa, 1996).

A utilização da técnica da PCR para diagnosticar a infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* em teleóginas de *B. microplus*, juntamente com as demais ações de pesquisa propostas, darão subsídios ao entendimento das inter-relações *Babesia* spp. / carrapato / ambiente / bovino, ampliando os conhecimentos sobre a epidemiologia da babesiose.

3 - OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

- Verificar a frequência de *Boophilus microplus* infectados com *Babesia* sp em área endêmica de babesiose bovina, no estado de Minas Gerais, Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar as taxas de infecção de *B. microplus* com *Babesia* spp, por meio do exame de hemolinfa em teleóginas coletadas em animais jovens e adultos.
- Determinar se há diferença na taxa de infecção de telóginas mantidas em condições naturais comparadas as incubadas em estufa climatizada.
- Correlacionar a intensidade de infecção de teleóginas com a variação estacional de *B. microplus*;
- Determinar a sensibilidade, especificidade e valor preditivo da PCR na identificação de *B. bovis* e *B. bigemina* em *B. microplus*
- Utilizar a PCR para identificar *B. bovis* e *B. bigemina* em *B. microplus* nas diferentes estações do ano.

4 - HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- A intensidade da infecção de teleóginas de *B. microplus* com esporocinetos de *Babesia* spp e a taxa de inoculação em bovinos, é significativamente menor durante o período de baixas temperaturas.

- A utilização da PCR, permite a obtenção de resultados específicos e necessários ao conhecimento da taxa de infecção de teleóginas de *B. microplus* por esporocinetos de *Babesia* spp, com baixos níveis de infecção.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 – Locais dos experimentos

Os experimentos foram realizados na Fazenda Modelo, pertencente à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), localizada no município de Pedro Leopoldo (19°37'S, 42°02'W), Minas Gerais, e no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As amostras foram coletadas a campo no período de março de 1999 a fevereiro de 2001. O processamento das análises laboratoriais se estendeu até dezembro de 2002.

Os dados climáticos referentes à temperatura, precipitação e umidade relativa do ar foram obtidos na estação no 5º Distrito Meteorológico de Belo Horizonte, localizado a 40 km do local do experimento.

5.2 – Animais experimentais

Foram utilizados dois lotes de animais (I e II), sendo cada um composto de 24 animais 7/8 holandês x zebu, mantidos a campo, em pastagem natural, composta de “capim jaraguá” (*Hyparrhenia rufa*), “capim gordura” (*Melinis minutiflora*) e “capim braquiária” (*Brachiaria decumbens*). O lote I era composto de bezerras com idade entre um a oito meses. Estas eram mantidas a pasto, em sistema de casinhas individuais, do nascimento até aos 60 dias de idade, onde eram alimentadas por meio de aleitamento artificial e recebiam suplementação com o fornecimento de ração. Após este período as bezerras eram desmamadas e mantidas à pasto, recebendo ração diariamente. Ao completarem oito meses de idade estas bezerras eram substituídas por outras mais novas, que passavam então a constituir nosso grupo experimental. O lote II era composto de animais acima de 24 meses de idade. Cada lote foi dividido em quatro grupos de seis animais. A composição de cada grupo foi determinada após avaliação prévia do

nível de infestação dos animais, para que fossem distribuídos de forma homogênea, ficando em cada grupo animais com maiores ou menores níveis de resistência individual ao carrapato.

A cada 14 dias, um dos grupos era tratado com acaricida cuja base é o coumaphos (Assuntol, Bayer), sendo que cada grupo foi submetido a banhos carrapaticida intervalados de 56 dias entre aplicações. Este intervalo foi suficiente para reinfestação, pois o coumaphos possui um poder residual de três dias e a fase parasitária do *B. microplus* requer um período de desenvolvimento de 21 dias (Gonzales et al., 1974).

A cada 14 dias, os animais de ambos os grupos eram recolhidos a um curral, sempre no período das oito às dez horas, e individualmente submetidos à coleta de todas as fêmeas de *B. microplus* maiores que 4,5 mm de comprimento.

Nestes intervalos todas as bezerras foram submetidas a esfregaços sanguíneos confeccionados de sangue periférico, provenientes da borda da cauda. Estes eram fixados com metanol e corados com solução de Giemsa. A pesquisa de hematozoários foi realizada para determinação da infecção e identificação das espécies infectantes, utilizando microscópio óptico e objetiva de 100x, (Burgdorfer, 1970).

Todas as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor, identificadas corretamente e transportadas no mesmo dia para o Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde foram processadas.

5.3 – Incubação das fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*

Após cada coleta das fêmeas ingurgitadas, eram selecionadas aleatoriamente 48 provenientes do grupo de bezerras e 48 provenientes do grupo de vacas. Os carrapatos eram colocados individualmente em placas escavadas de polietileno e divididos em quatro grupos:

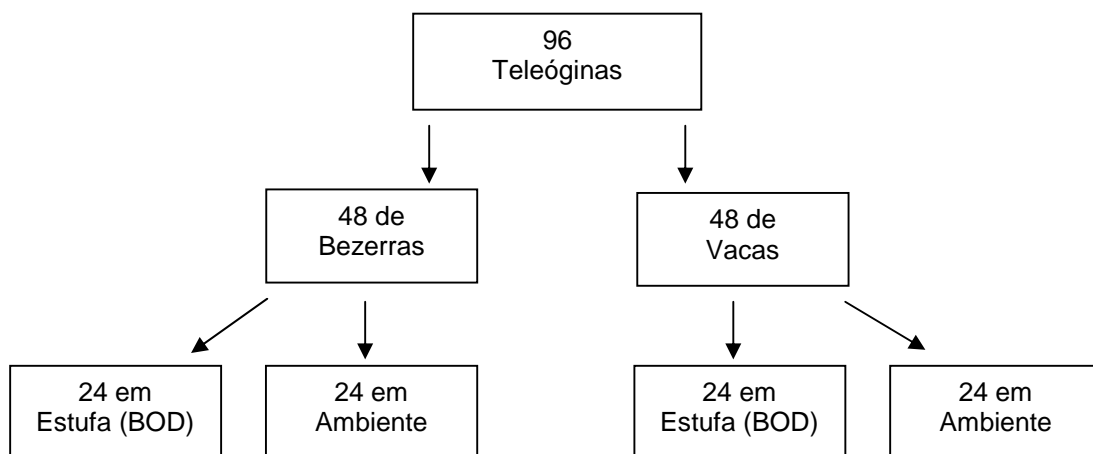
Grupo I – composto de 24 teleóginas coletadas de bezerras, e incubadas em estufa climatizada (BOD);

Grupo II – composto de 24 teleóginas coletadas de bezerras, e deixadas à temperatura ambiente;

Grupo III – composto de 24 teleóginas coletadas de animais com idade superior a 24 meses e incubadas em BOD;

Grupo IV – composto de 24 teleóginas coletadas de animais com idade superior a 24 meses e incubadas à temperatura ambiente.

Esta distribuição está ilustrada no esquema abaixo:



A partir da 5^a coleta, as teleóginas removidas de bezerras foram separadas e identificadas de acordo com o número do animal no qual tinham sido retiradas.

A incubação em estufa climatizada (BOD) foi realizada a 27°C e umidade relativa acima de 83%. Nos grupos com incubação no meio ambiente, as placas foram colocadas no pasto, junto ao solo e cobertas com capim, para proteção dos raios solares.

Paralelamente, foram acompanhados quatro animais naturalmente infectados com *Babesia* sp, mantidos em condições de confinamento a partir dos dois meses de idade. Os animais foram infestados semanalmente com 2000 larvas de *B. microplus* livres de infecção por *Babesia* sp. Estas larvas livres de infecção foram obtidas a partir de ovos separados nos três primeiros dias de postura das teleóginas mantidas em BOD. Os ovos obtidos neste período não se

encontram infectados, pois os protozoários que, eventualmente, tenham sido ingeridos pelos carrapatos, encontram-se na fase inicial de seu ciclo biológico no vetor, quando ainda não ocorreu a transmissão transovariana (Riek, 1966).

5.4 - Exame da hemolinfa das teleóginas de *Boophilus microplus*

Oito dias após a coleta das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, esfregaços de hemolinfa de todas as teleóginas mantidas em BOD e ambiente, eram preparados a partir da seção da região distal de uma de suas patas, com auxílio de uma pinça como pode ser observado na figura 1. Os esfregaços foram feitos em lâminas de vidro, que após secadas ao ar foram fixados em álcool metílico e corados pelo método de Giemsa. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico para a visualização de esporocinetos de *Babesia* spp (Figura. 2), utilizando-se objetiva de imersão com observação de todo o esfregaço de acordo com Guglielmone *et al.* (1997).

Foram estudados dois parâmetros pelo exame dos esfregaços de hemolinfa:

- Taxa mensal de infecção (TMI): definida como a porcentagem de carrapatos que apresentam esporocinetos na hemolinfa em relação ao total de carrapatos examinados por mês ($TMI = \text{número de carrapatos positivos} / \text{número de carrapatos examinados}$).
- Intensidade da infecção (II): definida como o número de esporocinetos de *Babesia* spp. contados em cada esfregaço de hemolinfa, dividido pelo número de campos microscópicos examinados.

Cada observação da taxa de infecção representou o valor médio de duas observações mensais (Melendez & Forlano, 1996).

Após a coleta da hemolinfa, as teleóginas foram armazenadas individualmente, em etanol 70%, de acordo com d'Oliveira *et al.* (1997), onde permaneceram para posterior processamento para extração de DNA.

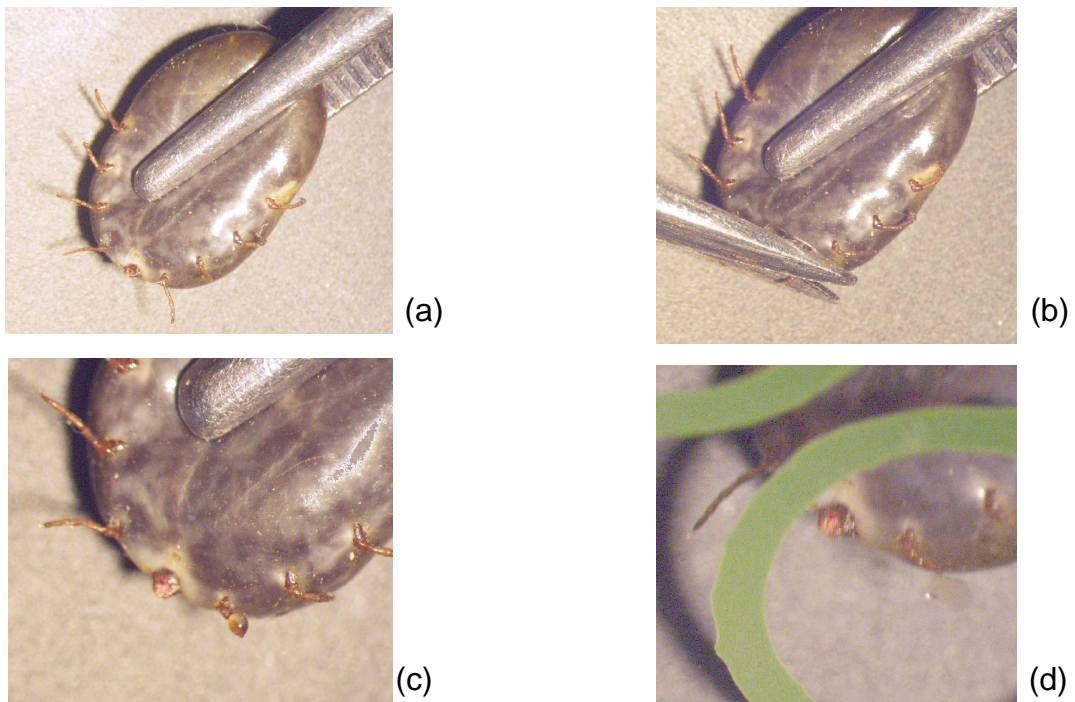


FIGURA 1. Coleta de amostra de hemolinfa de teleóginas de *Boophilus microplus*. Fixação da teleóquina com uma pinça (a); seção da região distal de uma de suas patas (b); gota de hemolinfa na pata cortada (c); confecção do esfregaço em lâmina (d).



FIGURA 2. Esporocinetos de *Babesia* spp em esfregaço de hemolinfa de *Boophilus microplus* corado pelo Giemsa.

5.5 – Extração do DNA

O DNA foi extraído do sangue de dois animais experimentalmente infectados com *B. bovis* (Bbo UFV-1) e *B. bigemina* (Bbi UFV-1), respectivamente. O sangue foi criopreservado em nitrogênio líquido até o momento da extração. O animal infectado com *B. bovis* apresentava uma parasitemia de 22% no dia da coleta da amostra, enquanto o animal infectado com *B. bigemina* apresentava uma parasitemia de 16,4%. As amostras de *B. bovis* e *B. bigemina* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Joaquin H. Patarroyo S. (Bioagro-UFV). Estes DNAs foram utilizados como controles positivos para *B. bovis* e *B. bigemina* nas ampliações por PCR das teleóginas estudadas.

5.5.1 - Extração do DNA das amostras de sangue

O DNA das amostras de sangue foi extraído segundo metodologia proposta por Smeenk et al. (2000). O material foi descongelado em temperatura ambiente e a cada 250 µl da amostra foi adicionado 1 ml de tampão de lise (saponina 0,015%, NaCl 35mM, e EDTA 1 mM). O material foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. O “pellet” foi ressuscitado em 100 µl de “Tris buffer” (Tris-HCl 10 mM e KCl 50mM pH 8.0) e digerido com proteinase K (10 µg – Sigma), por uma hora a 56 °C, seguido de incubação por 10 minutos a 96°C.

Em seguida, o DNA foi extraído pelo método de fenol/clorofórmio (Sambrook et al., 1989) e precipitado com etanol absoluto gelado. O DNA foi ressuscitado em 20 µl de tampão PBS 0,15M e estocado a 4°C até o momento de uso.

Uma amostra do DNA extraído foi submetido a diluições sucessivas na base 10 em água mili-Q estéril, para determinar a menor diluição em que a PCR detectava parasitos no sangue, nas condições utilizadas.

5.5.2 - Extração do DNA das teleóginas

Dentre as teleóginas coletadas de bezerras, incubadas em BOD e analisadas por meio do exame de hemolinfa, foram escolhidas aleatoriamente 180 exemplares que foram posteriormente processadas pela PCR. Estas teleóginas foram divididas em quatro grupos assim distribuídas: 45 teleóginas negativas e 45 teleóginas positivas ao exame de hemolinfa, coletadas no período de abril a setembro de 2000 e 2001; 45 negativas e 45 positivas coletadas no período de outubro de 1999 a março de 2000 e outubro de 2000 a fevereiro de 2001. O DNA foi extraído segundo metodologia proposta por Figueroa (1997), utilizando o kit para extração de DNA (GENTRA SYSTEMS, D-5500^A, PUREGENE), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações:

As teleóginas armazenadas em etanol 70% foram secadas em papel absorvente e cortadas em oito partes com uma lâmina de barbear estéril, uma lâmina para cada exemplar. A seguir 1/8 de cada exemplar foi processado para a extração do DNA e o restante foi novamente armazenado em etanol 70%. A porção a ser processada foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e triturada com o auxílio de um pistilo de vidro estéril, artesanalmente fabricado e moldado para tubos eppendorf de 1,5 ml. Ao tubo foram acrescentados 450 µl de solução de lise celular (GENTRA SYSTEMS, D-5500^A, PUREGENE). O material foi posteriormente incubado a 65° C por 45 minutos. Após a incubação, foi adicionada proteinase K na concentração de 10 mg/ml. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e incubado a 37⁰C “overnight”. Ao lisado celular foram adicionados 2,2 µl de RNase (4 mg/ml). Procedeu-se a homogeneização a 37⁰C por 40 minutos. A este material foram adicionados 150 µl de solução de precipitação de proteína (GENTRA SYSTEMS, D-5500^A, PUREGENE). O material foi agitado vigorosamente em “vortex”, sendo depois centrifugado a 10.000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi cuidadosamente transferido para tubo de 1,5 ml. A este tubo foram adicionados 450 µl de isopropanol e 0,7 µl de glicogênio (20 mg/ml). Este material foi cuidadosamente homogeneizado e

incubado a -21°C por 40 minutos, após o que foi centrifugado a 10.000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi então desprezado e o DNA após secagem foi lavado com 600 μl de etanol a 70%. A seguir o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 7 minutos, e o sobrenadante desprezado. Após a secagem completa do DNA, foram adicionados 20 μl de solução de hidratação de DNA (GENTRA SYSTEMS, D-5500^A, PUREGENE) a cada tubo e estes foram estocados a 4°C até o processamento pela PCR.

5.5.3 - Amplificação do DNA de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* por meio da reação da PCR

Para amplificar fragmentos do DNA genômico das duas espécies de *Babesia* foi realizada uma PCR múltipla, na qual foi utilizado um par de oligonucleotídeos responsável pela amplificação de um fragmento de 350 bp (Figueroa et al., 1994) para *B. bovis* e outro par que amplifica um fragmento de 278 bp para *B. bigemina* (Figueroa et al., 1992) especificados no Quadro 01.

As reações foram processadas segundo Smeenk et al. (2000), com modificações: 1 μl do DNA extraído das teleóginas foi adicionado a um tampão de reação contendo 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100 (SIGMA), 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 μM de cada dNTP, 2,5 U de Taq DNA polimerase (GIBCO), 0,5 pmol de cada um dos primers e água miliQ estéril para completar o volume final de 10 μl . O material foi coberto com 20 μl de óleo mineral e colocado em um termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.). Os ciclos de amplificação consistiram de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e expansão de 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 34 ciclos com extensão final de 5 minutos a 72°C .

Cada reação de PCR utilizando as amostra de DNA extraído das teleóginas de *B. microplus* foi analisada no mínimo duas vezes.

Em todas as reações, como controle positivo, utilizou-se o DNA previamente extraído do sangue de animais experimentalmente infectados com *B.*

bovis (Bbo UFV-1) e *B. bigemina* (Bbi UFV-1). Como controle negativo utilizou-se uma amostra contendo todos os reagentes, porém sem adição de DNA.

Quadro 01. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados na PCR múltipla.

Hemoparasito	Iniciadores	Sequência	Produto (bp)
<i>B. bovis</i>	BoF	5' CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA 3'	→ 350
	BoR	5' CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA 3'	←
<i>B. bigemina</i>	BiIA	5' CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC 3'	→ 278
	BiIB	5' CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG 3'	←

5.5.4 - Análise dos produtos amplificados

Os produtos das reações de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), 5% em tampão TBE (89 mM Tris-borato, 2mM EDTA pH 8,0). Foram adicionados 3µl de DNA amplificado acrescidos de 7 µl de tampão da amostra 2X [0,1% Azul de Bromofenol; 0,1% Xilenocianol; 10% Ficoll 400; em TBE 5X]) por canaleta do gel.

A corrida foi processada até que o corante xilenocianol migrasse 3 cm a partir do local de aplicação. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 123 bp (DNA Ladder Life Technologies). Após a eletroforese, os fragmentos amplificados foram visualizados pelo método da coloração pelo nitrato de prata (Santos et al., 1993).

Os géis, após fixação, foram fotografados com filme KODAK 35mm 50 ISSO / 18 DIN, sob luz branca, com filtro azul e câmara NIKON FM2.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma banda de 278 pb para *B. bigemina* e 350 pb para *B. bovis*.

Para garantir a qualidade da PCR e prevenir contaminações foram adotadas medidas de segurança preconizadas por Persing (1991).

5.6 - Análise estatística

Os dados relativos ao exame direto de hemolinfa das teleóginas coletadas de bezerras e vacas foram arranjados em Tabelas de Contingência 2 x 2 e comparados pelo teste de Qui-quadrado, utilizando-se um nível de significância de 0,05.

A comparação dos resultados do exame direto de hemolinfa e da PCR, foi feita utilizando-se uma Tabela de Contingência 2 x 2 (Fletcher & Fletcher, 1989).

		Padrão-ouro		
		Positivo	Negativo	
T E S	Positivo	a	b	a + b
	Negativo	c	d	c + d
T E		a + c	b + d	

Para calcular a sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos foram utilizadas as seguintes fórmulas, propostas por Fletcher & Fletcher (1989):

$$\text{Sensibilidade (S)} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Especificidade (E)} = \frac{d}{b + d}$$

$$\text{Valor preditivo positivo (VPP)} = \frac{a}{a + b}$$

$$\text{Valor preditivo negativo (VPN)} = \frac{d}{c + d}$$

6 – RESULTADOS

6.1 – Exames de hemolinfa de teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de animais a campo

Durante as coletas quinzenais de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, nem sempre foi possível obter o número desejado de 48 carrapatos para cada lote do experimento. Em duas ocasiões não foram obtidas teleóginas no lote de vacas e em uma no lote de bezerras. Quando o número de teleóginas coletadas foi insuficiente para completar as duas placas para a incubação em diferentes ambientes, as mesmas foram incubadas somente em BOD. O número total de teleóginas coletadas de vacas e bezerras, por mês, ao longo dos dois anos de experimento, pode ser observado nos ANEXOS 1 e 2.

Entre as teleóginas coletadas, algumas morreram durante o período de incubação, tanto em BOD quanto em ambiente, antes da confecção dos esfregaços de hemolinfa, realizado no oitavo dia pós coleta. Frequentemente, estas teleóginas apresentavam-se com cor avermelhada.

No grupo de teleóginas que foram incubadas em ambiente, algumas foram atacadas por formigas, predadores naturais dos carrapatos (Matthewson, 1984), e morreram antes do exame.

Entre os esfregaços de hemolinfa positivos foram escolhidos 277 aleatoriamente, tanto no grupo de bezerras quanto no grupo de vacas, para que fosse realizada a contagem do número de campos microscópicos e de esporocinetos. Foi constatada grande variação com relação à quantidade de hemolinfa extraída de cada teleóquina, interferindo no tamanho do esfregaço.

O número médio de células por campo microscópico por esfregaço de hemolinfa foi de 147 ± 87 (variou de 05 a 1175). O número médio de esporocinetos de *Babesia* sp por esfregaço foi de 617,6 (variou de 1 a 47.564) (Tabela 1). O número de esporocinetos observados por esfregaço de hemolinfa, variou de 0,004 (1 esporocinetos em 220 campos microscópicos) a 127,9 (47.564

esporocinetos em 372 campos microscópicos). Na Tabela 2 pode ser observado o número médio de esporocinetos por campo de esfregaço examinado.

O número total de teleóginas de *B. microplus* coletadas e examinadas entre março de 1999 e fevereiro de 2001, em ambos os lotes, assim como o resultado do exame dos esfregaços de hemolinfa, encontram-se representados na Tabela 3.

Neste período foram examinadas 3763 teleóginas de *B. microplus*, das quais 1710 foram coletadas em bezerras de um a oito meses de idade e 2053 de vacas.

A taxa de infecção das teleóginas de *B. microplus* com esporocinetos de *Babesia* sp observada na propriedade em ambos os lotes, foi de 10,1% para as teleóginas mantidas em BOD, e de 7,7% para as mantidas no meio ambiente. A taxa de infecção em teleóginas coletadas em bezerras foi maior ($p < 0,05$) do que a encontrada em vacas, tanto naquelas mantidas em BOD (17,5% em bezerras e 3,6% em vacas) quanto naquelas mantidas em ambiente (10,6% em bezerras e 5,4% em vacas).

6.1.1 - Exame de hemolinfa de teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de bezerras

As taxas de infecções mensais de teleóginas com esporocinetos de *Babesia* sp, coletadas em bezerras, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001 estão representadas na Figura 3. As teleóginas incubadas em estufa climatizada, geralmente, apresentaram um índice de infecção maior do que as mantidas em ambiente. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos meses de abril de 1999 e junho, julho e agosto de 2000. Entretanto, observa-se que a taxa de infecção das teleóginas incubadas no meio ambiente apresentou variações mensais semelhantes às incubadas em BOD. Em ambos os grupos foram observados picos de infecção nos meses de abril, julho e novembro de 1999 e agosto de 2000. Nos meses de fevereiro, abril e novembro de 2000 as

teleóginas mantidas em condições ambientais apresentaram taxas de infecções mais elevadas do que as mantidas em estufa.

A temperatura média na área estudada, durante a fase experimental, apresentou pequenas variações, mantendo-se entre 19,5^oC a 24,4^oC (média de 21,7^oC) (Figura 4).

Quando se observam os dados de precipitação pluvial, é possível verificar a existência de um período de chuva, que vai de outubro a março, e outro de seca, de abril a setembro. As maiores taxas de infecções das teleóginas geralmente coincidiram com o início do período de chuvas, atingindo o máximo quando a precipitação foi superior a 240 mm, sugerindo que este fator pode interferir na taxa de infecção das teleóginas por *Babesia* sp (Figura 3).

Na Figura 4 estão representadas as médias mensais das observações das infecções de teleóginas coletadas de bezerras durante os dois anos do período experimental. Pode ser observada uma distribuição mais homogênea da infecção, quando se comparam as teleóginas mantidas em estufa e ambiente.

6.1.2 - Exame de hemolinfa de teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de vacas

No que se refere às teleóginas coletadas em vacas, as taxas de infecção durante o período experimental, podem ser observadas na Figura 5. Foram observadas taxas de infecção menores que aquelas encontradas nas teleóginas coletadas de bezerras. Observa-se ainda que os maiores picos de infecção ocorreram nos meses de outubro de 1999, março e novembro de 2000, e janeiro de 2001. Nos meses de janeiro e março de 2000 e janeiro de 2001, houve uma distribuição atípica quando comparada com os demais dados. A mesma variação é observada na Figura 6, que representa a média das observações mensais nos dois anos do experimento. No período de abril a maio não foram observadas teleóginas positivas.

6.1.3 - Comparação das taxas de infecção das teleóginas coletadas de bezerras e vacas

A taxa média de infecção das teleóginas coletadas de bezerras e vacas entre março de 1999 e fevereiro de 2001 e incubadas em estufa climatizada pode ser vista na Figura 7. Há uma nítida evidência de que as bezerras mantêm maior número de teleóginas infectadas do que as vacas, durante todo o período de observação. Esta diferença é significativa nos meses de abril, maio, junho, julho, agosto, setembro, novembro e dezembro ($p < 0,05$). A mesma distribuição pode ser observada quando as teleóginas são mantidas no meio ambiente (Figura 8), com diferença significativa nos meses de abril, julho, agosto, novembro e dezembro ($p < 0,05$). A análise dos dados referentes a média de dois anos de observação com relação ao total de teleóginas infectadas encontradas em bezerras e vacas, revela uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos nos meses de abril, junho, julho, agosto, setembro, novembro e dezembro (Figura 9).

6.2 - Taxa de infecção em relação à idade das bezerras

6.2.1 - Bezerras mantidas sob desafio natural

Durante o período experimental foram utilizados 73 bezerras, de um à oito meses de idade, que foram mantidas em piquetes sob desafio natural de *B. microplus*. Todas as bezerras que fizeram parte do grupo experimental apresentaram esfregaços sanguíneos positivos por *Babesia* sp. Todas estas bezerras forneceram teleóginas para o presente trabalho, entretanto, apenas 46 forneceram teleóginas infectadas por *Babesia* sp.

Como foi citado no item 6.1, foram coletadas 1710 teleóginas neste grupo de animais. Entretanto, neste estudo de taxa de infecção, não foram computadas 158 teleóginas provenientes das primeiras coletas, por não ter sido realizada a identificação dos animais das quais foram coletadas. Assim, na Tabela 6 estão registradas 1552 teleóginas relacionadas com as idades das bezerras doadoras

de carrapatos. Na análise dos dados desta Tabela observa-se que houve infecção das teleóginas coletadas nos animais de todas as faixas etárias. Observa-se ainda, que 19,4% das teleóginas coletadas em bezerras com menos de um mês de idade encontravam-se infectadas e os níveis de infecção mantiveram-se elevados até que as bezerras doadoras completassem oito meses de idade.

6.2.2 - Bezerros mantidos em isolamento

Os dados referentes aos bezerros que após a infecção natural de *B. bigemina* foram mantidos em isolamento, sem contato com larvas infectadas, estão na Tabela 5. Os animais apresentaram hemácias parasitadas com um mês de idade, e no período de isolamento foram infestados com larvas livres de *B. bigemina*. Observa-se que os bezerros infectaram maior número de teleóginas no segundo mês de idade, e nos meses seguintes houve redução gradual e significativa da taxa de infecção ($p < 0,05$). No quinto mês de isolamento a taxa de infecção das teleóginas era de 0,7%.

6.3 – Reação em Cadeia da Polimerase

A PCR foi realizada em teleóginas selecionadas como descrito no item 5.5.2. O produto da amplificação com ambos os iniciadores foi analisado através da eletroforese em gel de poliacrilamida a 5 %.

As amostras de DNA extraídas de sangue foram submetidas a diluições sucessivas e examinadas através da PCR (Figura 10). Isto foi realizado para se observar a menor concentração de DNA que utilizado como controle positivo mostrasse uma banda nítida no gel de poliacrilamida. Foi escolhida para as duas amostras a diluição de 1:10.000.

Todas as 90 amostras (45 relativas ao período seco e 45 relativas ao período chuvoso) que estavam positivas à análise do exame direto de hemolinfa, também se apresentaram positivas à PCR. Já entre as 90 amostras negativas ao

exame de hemolinfa (também divididas entre o período seco e chuvoso), 25 (27,8%) apresentaram-se positivas quando processadas por meio da PCR (Tabela 6).

Após a realização da PCR foi possível identificar as espécies de *Babesia* que infectavam as teleóginas de *B. microplus*. Entre as 90 teleóginas coletadas no período seco e submetidas a PCR, constatou-se que 50% (45/90) apresentaram infecção com *B. bigemina*, 2,2% (2/90) com *B. bovis*, 14,5% (13/90) apresentaram infecção pelas duas espécies e 33,3% (30/90) não estavam infectadas. Com relação às 90 teleóginas coletadas durante o período chuvoso, as taxas de infecção foram as seguintes: 43,3% (39/90) estavam infectadas com *B. bigemina*, 7,8% (7/90) com *B. bovis*, 10% (9/90) apresentavam infecção mista e 38,9% (35/90) não estavam infectadas. Estes dados podem ser visualizados na Tabela 7.

A Figura 11 apresenta os resultados da PCR específica realizada com algumas amostras positivas ao exame de hemolinfa. A Figura 12, ilustra o resultado da PCR de parte das amostras que estavam negativas ao exame de hemolinfa e positivas à PCR.

6.3.1- Comparação do resultado do exame direto de hemolinfa com a PCR

Os resultados das duas técnicas utilizadas para detectar a infecção das teleóginas por *Babesia* sp foram analisados por meio de uma Tabela de Contingência 2 x 2 (Fletcher & Fleticher, 1989). O exame direto de hemolinfa apresentou uma sensibilidade de 78% quando comparado com a PCR. Os dois testes apresentaram especificidade de 100%. O valor preditivo positivo foi de 100% e o valor preditivo negativo foi de 72%.

Quando comparamos as duas técnicas e analisamos o índice de positividade, a PCR foi mais sensível do que o exame direto de hemolinfa ($p < 0,05$).

Tabela 1. Número de esporocinetos por esfregaço de hemolinfa. Teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de bezerras e vacas, incubadas em estufa climatizada (BOD) e no meio ambiente (AMB). Teleóginas coletadas em Pedro Leopoldo, MG, entre março de 1999 e fevereiro de 2001.

Número de esporocinetos / esfregaço	Teleóginas de bezerras				Teleóginas de vacas			
	BOD		AMB		BOD		AMB	
	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
1 a 5	37	31,6	19	34,0	19	43,2	13	21,7
6 a 50	35	29,9	19	34,0	18	40,9	11	18,3
51 a 100	05	4,3	05	9,0	03	6,8	03	5,0
> 100	40	34,2	13	23,0	04	9,1	33	55,0
Total	117	100	56	100	44	100,0	60	100,0

Tabela 2. Número de esporocinetos por campo microscópico. Teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de bezerras e vacas, incubadas em estufa climatizada (BOD) e no meio ambiente (AMB). Teleóginas coletadas em Pedro Leopoldo, MG, entre março de 1999 e fevereiro de 2001.

Número de esporocinetos por campo microscópico	Teleóginas coletadas de bezerras - BOD		Teleóginas coletadas de bezerras - AMB		Teleóginas coletadas de vacas - BOD		Teleóginas coletadas de vacas - AMB	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
	< 0,09	3	2,6	4	7,1	5	11,4	1
0,01 a 0,09	35	29,9	18	32,1	13	29,5	12	20
0,1 a 0,99	41	35	21	37,6	22	50	13	21,7
1,0 a 5,4	28	23,9	12	21,4	3	6,8	28	46,6
5,5 a 10,4	3	2,6	01	1,8	1	2,3	3	5
> 10	7	6,0	0	0	0	0	3	5
Total	117	100	56	100	44	100	60	100

Tabela 3. Taxa de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* com esporocinetos de *Babesia* spp, coletadas de bezerras e de vacas, incubadas em estufa climatizada (BOD) e no meio ambiente (AMB). Teleóginas coletadas em Pedro Leopoldo, MG, entre março de 1999 e fevereiro de 2001.

	Teleóginas mantidas em				Teleóginas mantidas em			
	BOD				AMB.			
	Total	Nº	Nº	%	Total	Nº	Nº	%
Examinado	Positivo	Negativo		Examinado	Positivo	Negativo		
Bezerras	982	172	810	17,52	728	77	651	10,5
Vacas	1123	40	1083	3,56	930	50	880	5,38
Total	2105	212	1893	10,1	1658	127	1531	7,66

Tabela 4. Taxa de infecção, por faixa etária das teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas em bezerras, incubadas em estufa climatizada (BOD) e no meio ambiente (AMB). Teleóginas coletadas em Pedro Leopoldo, MG, entre março de 1999 e fevereiro de 2001.

Idade das Bezerras	Teleóginas mantidas em BOD			Teleóginas mantidas Em Ambiente			Nº teleóginas examinadas	Nº Teleóginas positivas	%
	Número	+	%	Número	+	%			
< 1	95	25	26,3	75	8	10,7	170	33	19,4
1	129	15	11,6	102	9	8,8	231	24	10,4
2	145	14	9,7	132	9	6,8	277	23	8,3
3	162	25	15,4	120	9	7,5	282	34	12,1
4	129	23	17,8	105	8	7,6	234	31	13,2
5	91	14	15,4	74	11	14,9	165	25	15,2
6	71	18	25,4	59	3	5,1	130	21	16,2
7	22	8	36,4	16	5	31,3	38	13	34,2
8	13	1	16,7	12	2	33,3	25	3	25

Tabela 5. Taxa de infecção de teleóginas coletadas nos bezerros mantidos em isolamento, avaliada por exame direto de hemolinfa em esfregaço corado pelo Giemsa. Distribuição por faixa etária.

Idade (meses)	Total de teleóginas Examinadas	Teleóginas Positivas	Incidência %
2	241	33	13,7
3	451	47	10,4
4	280	26	9,3
5	142	1	0,7

Tabela 6. Porcentagem de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* por *Babesia* sp coletadas nos períodos seco e chuvoso, no município de Pedro Leopoldo, MG, e examinadas por meio do exame direto de hemolinfa e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

		Período seco		Período chuvoso	
		Hemolinfa		Hemolinfa	
		+	-	+	-
PCR	+	45	30	45	35
	-	0	15	0	10

Tabela 7. Distribuição das espécies de *Babesia* sp em teleóginas de *Boophilus microplus*, identificadas por PCR, no período seco (abril a setembro de 1999 e 2000) e chuvoso (outubro de 1999 a março de 2000 e outubro de 2000 a fevereiro de 2001).

Espécie	Período seco		Período chuvoso	
	Hemolinfa positiva PCR	Hemolinfa negativa PCR	Hemolinfa positiva PCR	Hemolinfa negativa PCR
<i>B. bigemina</i>	38 (84,4%)	7 (15,6%)	32 (71,1%)	7 (15,6%)
<i>B. bovis</i>	2 (4,5%)	-	5 (11,1%)	2 (4,4%)
<i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i>	5 (11,1%)	8 (17,8%)	8 (17,8%)	1 (2,2%)
Total	45	45	45	45

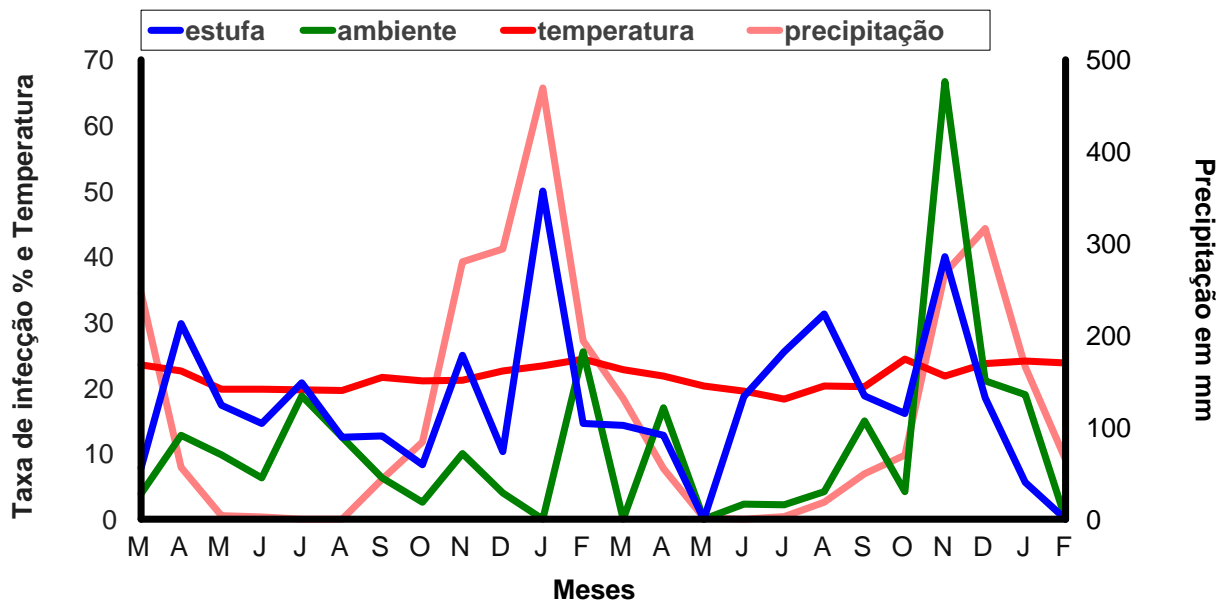


FIGURA 3. - Taxa de infecção mensal de teleóginas de *B. microplus* com esporocinetos de *Babesia* sp, coletadas de bezerras, relacionada com temperatura e precipitação, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

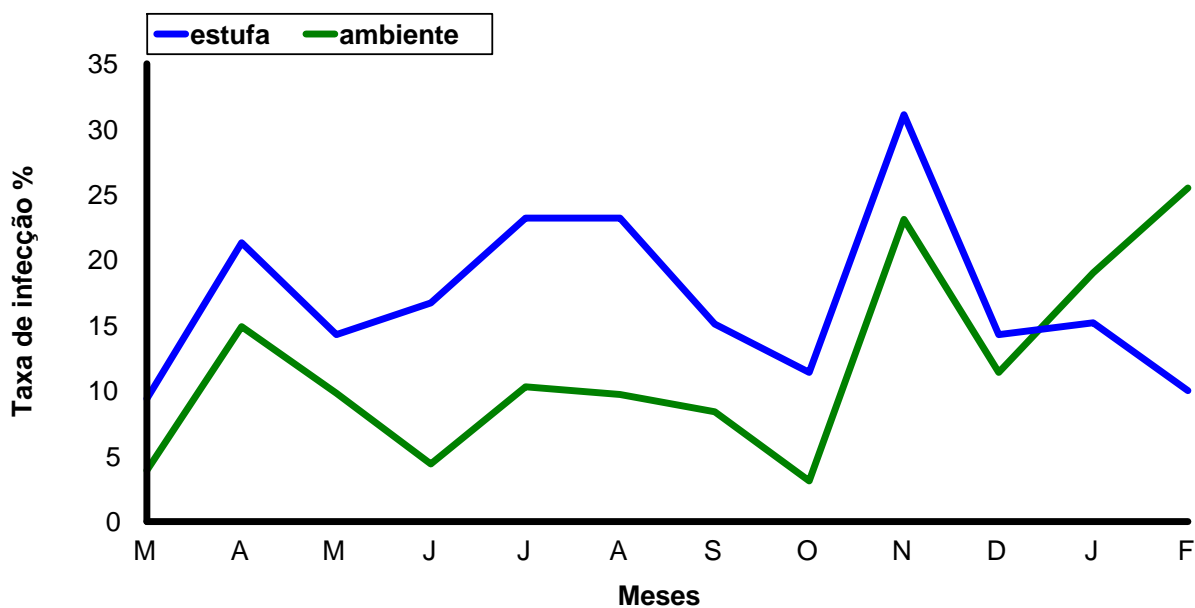


FIGURA 4. Médias mensais de dois anos de observações das taxas de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* com esporocinetos de *Babesia* sp., coletadas de bezerras e incubadas em estufa ou temperatura ambiente, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

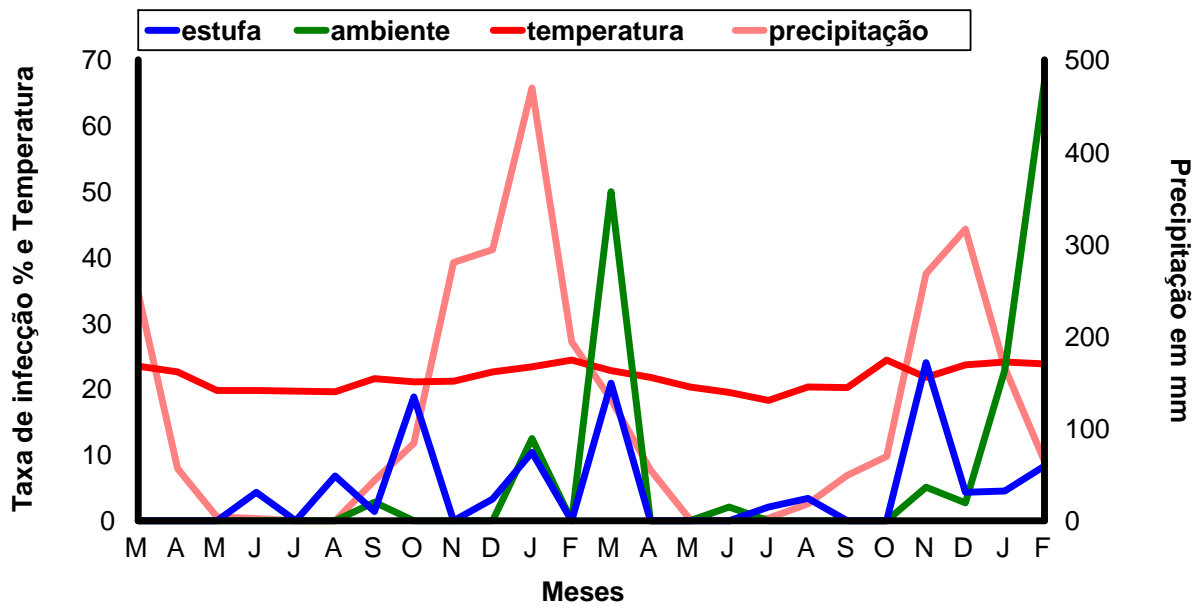


FIGURA 5. Taxa de infecção mensal de teleóginas de *Boophilus microplus* com esporocinetos *Babesia* sp, coletadas de vacas, relacionadas com temperatura e precipitação, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

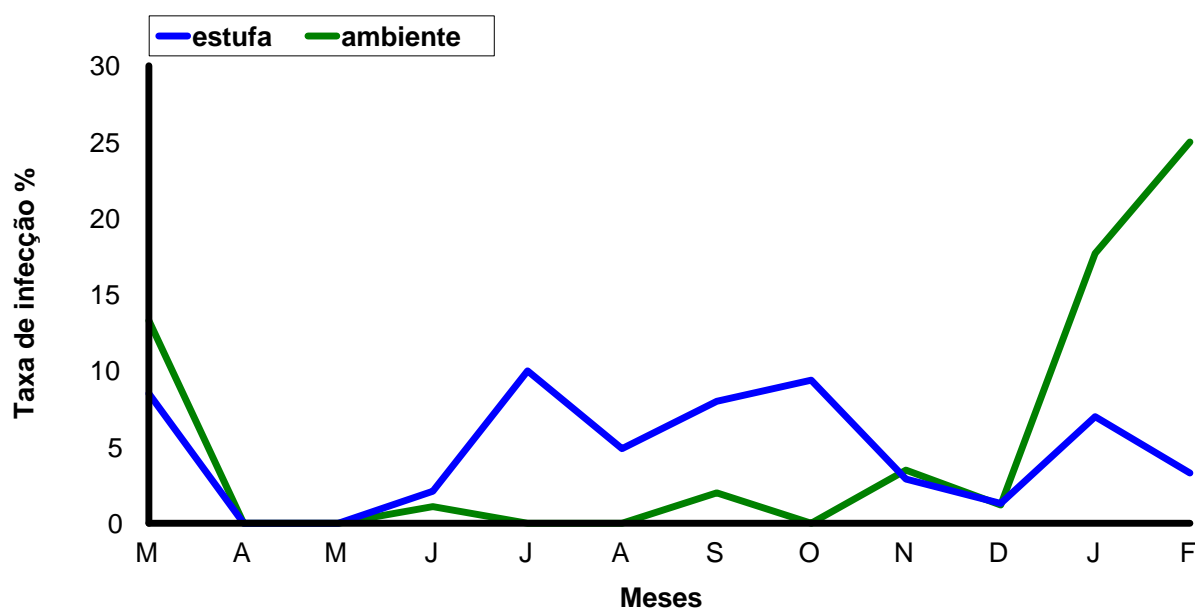


FIGURA 6. Médias mensais de dois anos de observações das taxas de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* com esporocinetos de *Babesia* sp., coletadas de vacas e incubadas em estufa ou temperatura ambiente, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

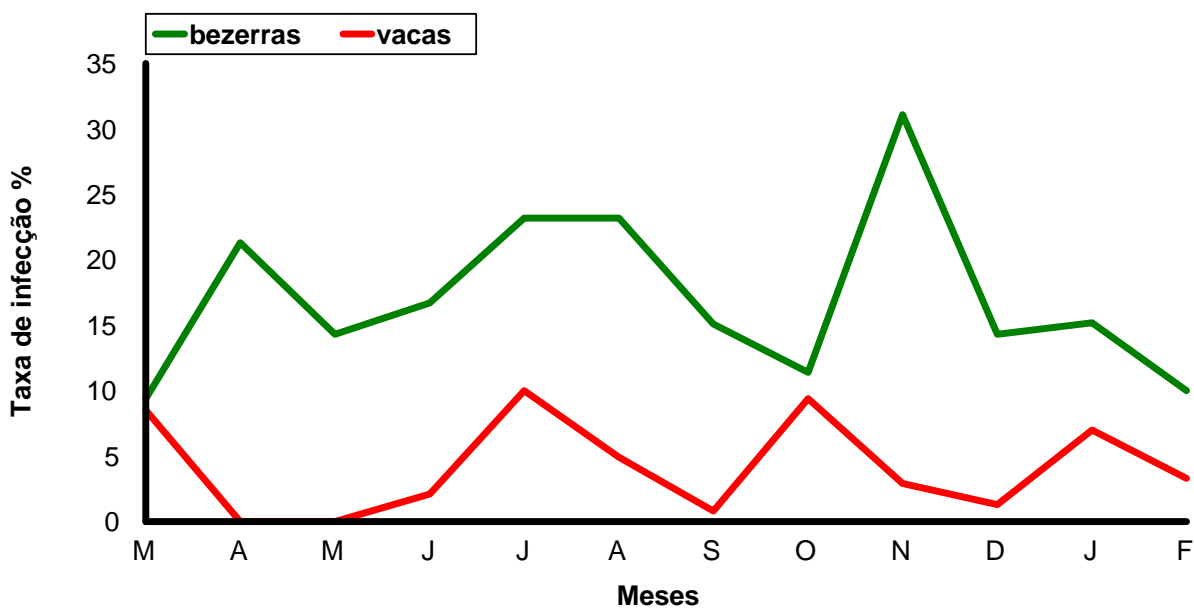


FIGURA 7. Médias mensais de dois anos de observações das taxas de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* com esporocinetos de *Babesia* sp, coletadas de bezerras e vacas e incubadas em BOD, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

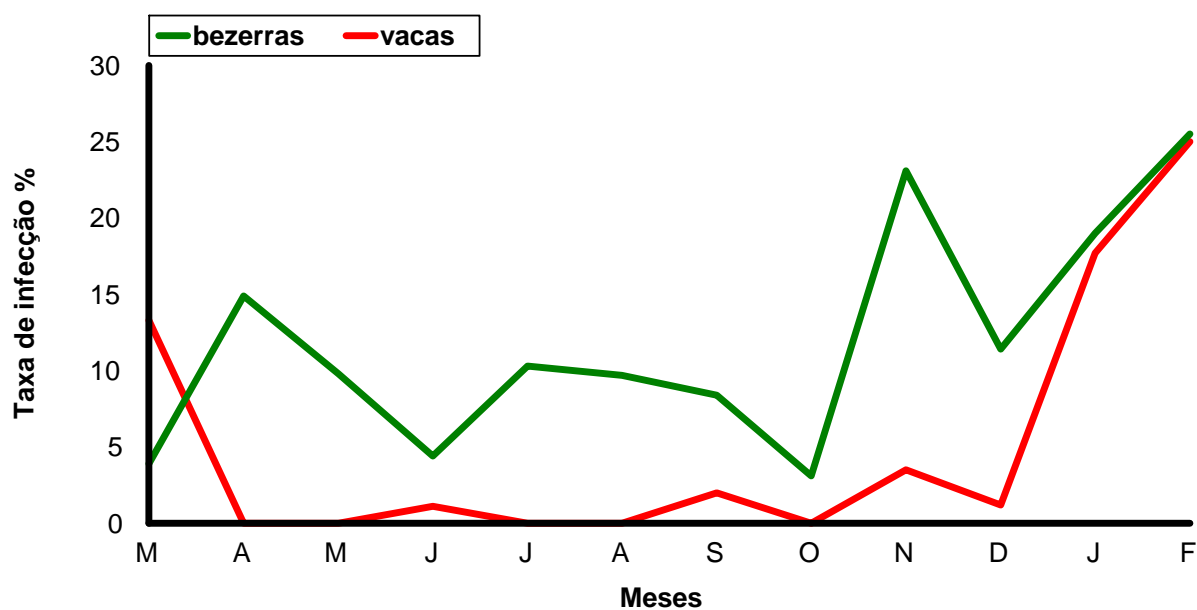


FIGURA 8. Médias mensais de dois anos de observações das taxas de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* com esporocinetos de *Babesia* sp, coletadas em bezerras e vacas e incubadas em temperatura ambiente, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

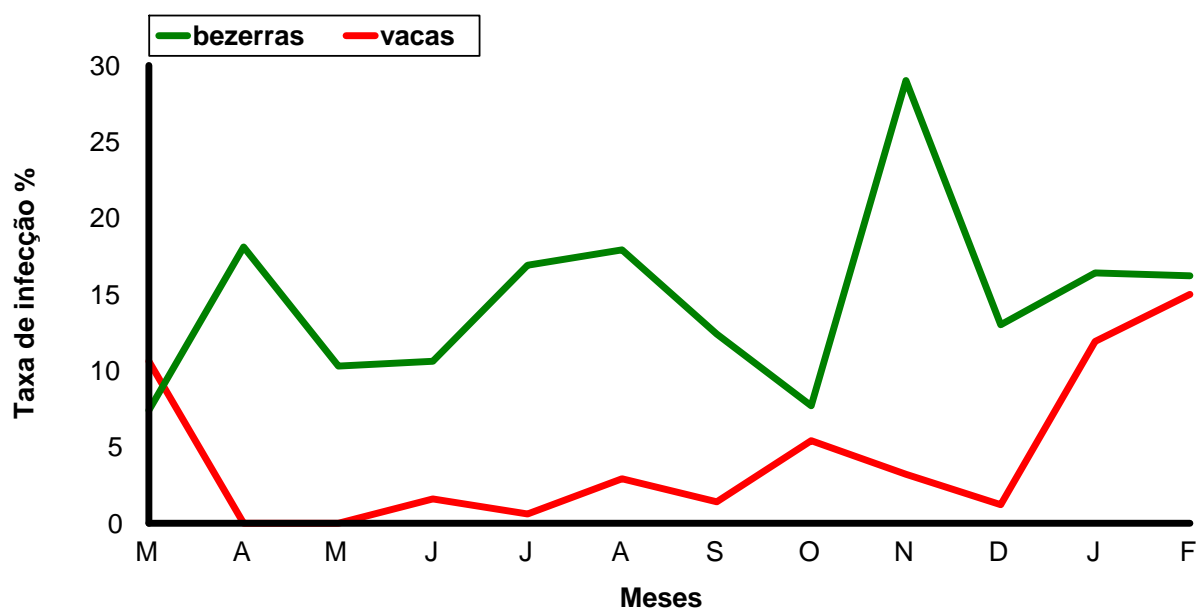


FIGURA 9. Médias de dois anos de observações das taxas de infecção das teleóginas de *Boophilus microplus* com esporocinetos de *Babesia* sp, coletadas de bezerras e vacas e incubadas em estufa ou temperatura ambiente, no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

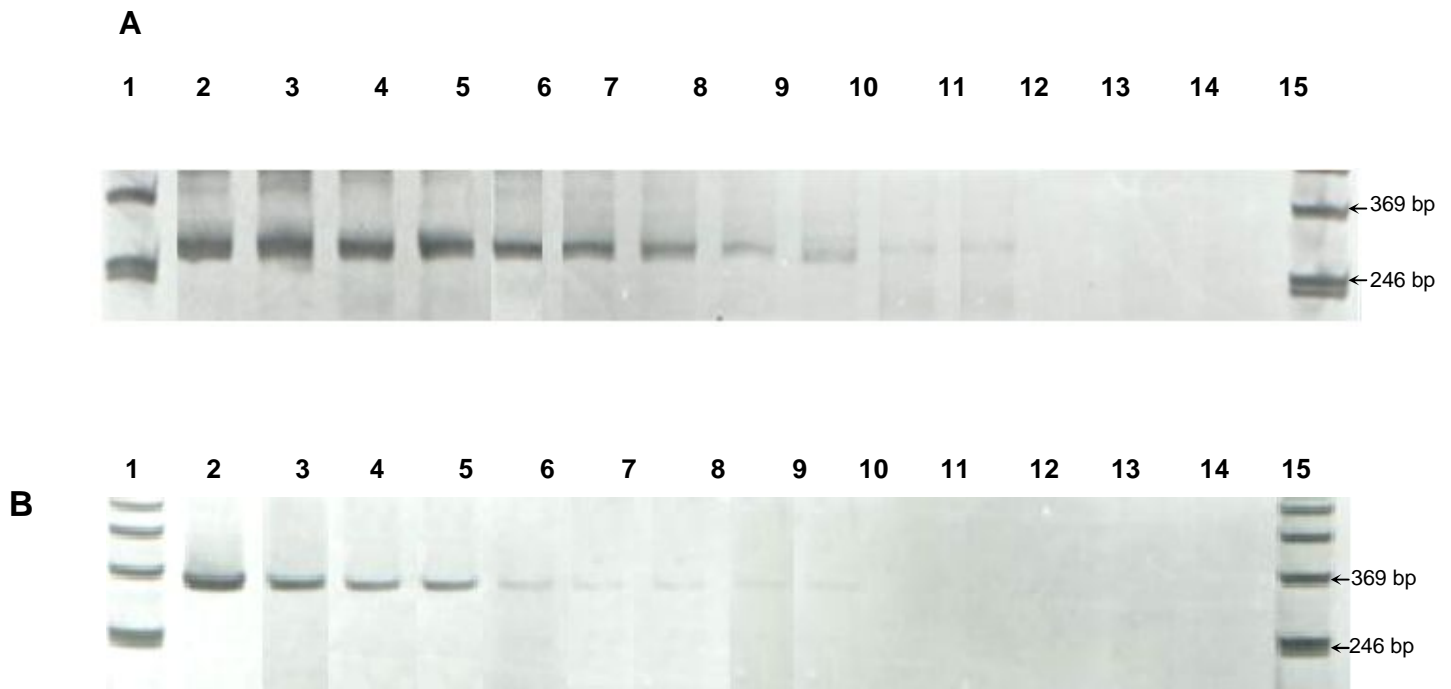


Figura 8 - Géis de poliacrilamida a 5% corados pela prata, mostrando produtos amplificados de DNA de sangue de bezerras experimentalmente infectados com *Babesia bigemina*, cuja parasitemia era de 22% em A, e *B. bovis*, com parasitemia de 16,4% em B. Foram utilizados iniciadores específicos para *B. bigemina* e para *B. bovis*. Canaletas 2 a 14: diluições sucessivas do DNA na base 10. Canaleta 15 (A e B) controle negativo, sem DNA. Canaletas 1 e 16 (A e B) padrão de peso molecular de 123 pb.

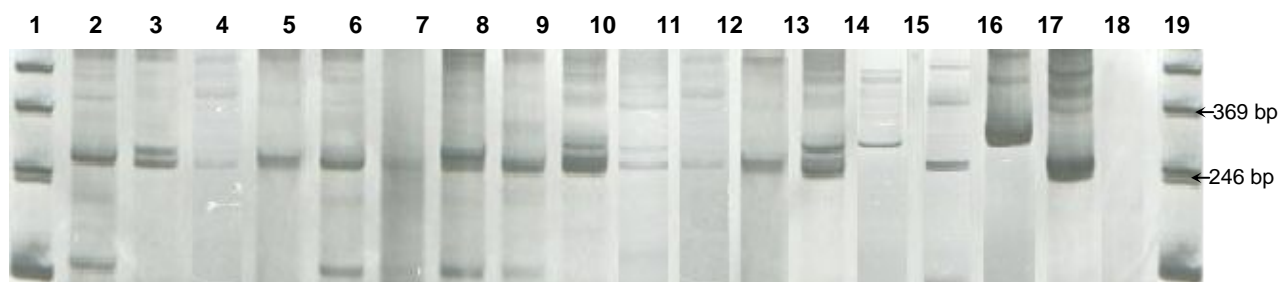


Figura 9 - Gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata de DNA extraído de *Boophilus microplus*, de telóginas com hemolinfa positiva para *Babesia* sp, utilizando iniciadores específicos para *Babesia bovis* (BoF/BoR) e *B. bigemina* (BiIA/BiIB). Canaletas: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 e 13 amostras com PCR positiva para *B. bigemina*; canaleta: 15 amostra positiva para *B. bovis*; canaletas 3, 10, 11 e 14 amostras positivas para *B. bovis* e *B. bigemina*. Canaletas 17 e 18 controles positivos de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente; canaleta 19 controle negativo da reação, sem DNA; canaletas 1 e 20 padrão de peso molecular de 123 pb.

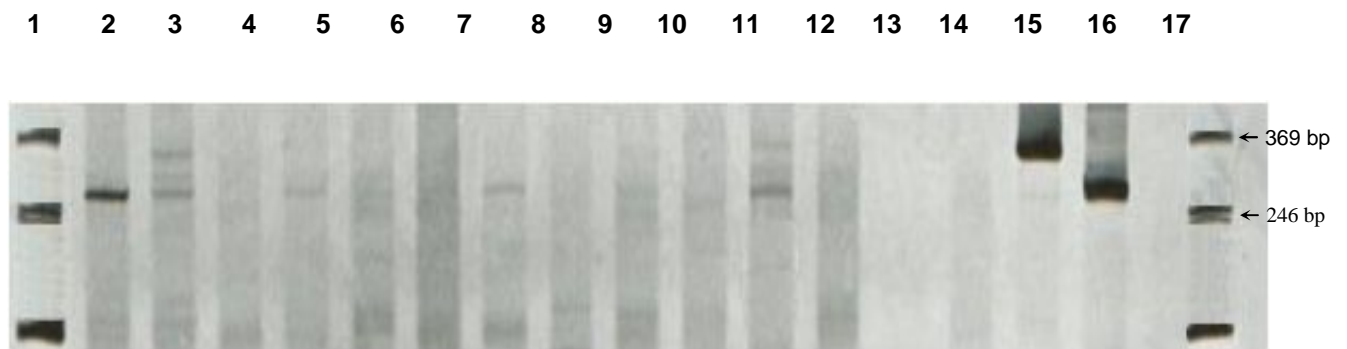


Figura 10 - Gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata de DNA extraído de *Boophilus microplus*, de telóginas com hemolinfa negativa para *Babesia* sp, utilizando iniciadores específicos para *Babesia bovis* (BoF/BoR) e *B. bigemina* (BiIA/BiIB). Canaletas 2, 5, 8 e 10 amostras com PCR positiva para *B. bigemina*; canaletas 3 e 12, amostras positivas para *B. bovis* e *B. bigemina*. Canaletas 16 e 17 controles positivos de *B. bovis* e *B. bigemina* respectivamente; canaleta 18 controle negativo da reação, sem DNA; canaletas 1 e 19, padrão de peso molecular de 123 pb.

7. DISCUSSÃO

7.1. ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Infection rate of *Babesia* spp. sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* from an area of enzootic stability in the State of Minas Gerais, Brazil

Maria G. Quintão-Silva¹ ; Múcio F B Ribeiro^{2*}

1- Universidade de Alfenas-MG.

2*- Departamento de Parasitologia -ICB- Universidade Federal de Minas Gerais,
Caixa Postal 486, 31270-910-Belo Horizonte, MG-Brazil E-mail:
muciobr@mono.icb.ufmg.br

* Corresponding author

Tel: + 55 31 34992842

Fax: + 55 31 34992970

Abstract

The infection rates of *Babesia* sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* were evaluated during a 2-year period in a dairy farm located in an area of enzootic stability. Every 14 days engorged females were collected from calves and from adult animals. Ticks were incubated under BOD conditions and *Babesia* infection rates were determined by microscopic examination of Giemsa-stained hemolymph smears. After 52 collections, 2,105 ticks were obtained, from which 982 were collected from calves and 1,123 from cows. The total *Babesia* infection rate was 10.0%, however the incidence was higher ($p < 0.05$) in ticks collected from calves (17.5%) than in those collected from cows (3.6%). Females collected from cows showed the highest infection rates in January, March and August, and absence of infection in April and May. Ticks feeding on calves were infected throughout the experimental period. The infection rates of engorged females collected from naturally infected calves that were artificially infested with *Babesia*-free-larvae of *B. microplus* gradually decreased until the calves were 4 months old. No differences were observed among infection rates of ticks collected from calves maintained under natural conditions.

Key words: *Babesia* sp, tick, sporokinetes, *Boophilus microplus*

1- Introduction

Babesiosis is a disease caused by intraerythrocytic protozoan parasites of the genus *Babesia*, which infect domestic and wild animals, transmitted by ixodid ticks. In Latin America two species, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, infect cattle, both transmitted by the one-host tick *Boophilus microplus* (Alonso et al., 1992).

The state of Minas Gerais, Brazil, has an area of 588.386 Km² and the population of cattle is estimated in 20,082,067 heads, corresponding to 12.2% of the national herd (Ministério da Agricultura, 2000). In the State, bovine babesiosis has been a limiting disease for the cattle industry (Leite & Lima, 1982; Ribeiro et al. 1983),

although the region has been considered an area of enzootic stability (Patarroyo et al., 1987).

The main factors interfering with transmission of *Babesia* are the tick parasitic load on cattle and the infection rate in the ticks (Friedhoff & Smith, 1981). Several reports on seasonal variation of *B. microplus* ticks have been published and it is known that in the Minas Gerais State four generations occur per year with infestations throughout the year (Magalhães, 1989, Lima et al., 2000). However, little is known about infection rates of *Babesia* spp in *B. microplus* and the studies have been carried out under laboratory conditions.

The implementation of strategic control programs against *B. microplus* ticks associated to new management measures in raising calves have contributed to the establishment of areas of enzootic instability in some farms, increasing economic losses due to clinical cases of babesiosis. As a consequence, considerable efforts have been made to a better understanding of epidemiological aspects of babesiosis. In addition to estimation of cattle serum reactivity to *B. bigemina* and *B. bovis*, the knowledge of infestation levels and the infection rates in the ticks are essential information for a comprehensive epidemiological study on bovine babesiosis (Alonso et al, 1992).

The present study had the objective to determine the infection rates of *Babesia* spp. in *B. microplus* ticks infesting calves and adult cattle, during the dry and the rainy seasons in a dairy farm located in an area of enzootic stability.

2- Materials and Methods

Study site

The study was carried out on a dairy-breeding farm, in the municipality of Pedro Leopoldo (19^o 37'S, 42^o02'W, altitude 882m), Minas Gerais state, over a 2-year period, from March 1999 to February 2001. The region has a distinct dry season (winter) from April to September and a rainy season (summer) from October to March.

Animals

Crossbreed cattle (7/8 Holstein x Zebu) were kept on a natural pasture comprised of “capim jaraguá” (*Hyparrhenia rufa*), “capim gordura” (*Melinis minutiflora*) and “capim braquiária” (*Brachiaria decumbens*). In the farm, the newborn calves were kept with their respective mothers for two days and then were transferred to calf hutches where they stayed up to 30 days of age and then they were raised on natural pastures. The calves received four liters of milk daily and balanced ration *ad libitum*.

The animals were divided into two groups. Group I had 24 female calves, less than 8 months of age. At the age of 8 months, other newborn calves replaced these calves. Group II had 24 animals older than 24 months. Each group was subdivided into four subgroups with six animals each.

Every 14 days one subgroup in each group was sequentially treated with an organophosphorus acaricide, coumaphos (Assuntol, Bayer), resulting in treatment of all subgroups every 56 days. Each animal was dipped, using a hand sprayer, with approximately five liters of 0.05% coumaphos, freshly prepared each time. The acaricide treatment was used to prevent development of injurious levels of tick infestation on the animals.

Other four newborn calves were monitored weekly by blood smears. As soon as infections of *Babesia* spp. were detected in blood smears, the animals were treated with acaricide and kept isolated. Every seven days these animals were individually infested with 2,000 *B. microplus* larvae, which were originated from a *Babesia*-free colony. Engorged females were collected weekly from these calves.

Tick collection

Every 14 days, the animals in groups I and II were gathered, always between 8 and 10 a.m., and all *B. microplus* engorged females larger than 4.5 mm were collected. Ticks were individually placed into glass tubes and identified with the number of the animal from which they had been collected.

From each collection, 48 engorged females were selected (24 from calves and 24 from cows). Ticks were individually placed in polystyrene plates and incubated under BOD conditions, at 27°C and relative humidity over 83%.

Females collected from calves that had been infested with *Babesia*-free larvae were submitted to the same procedures.

Hemolymph examination

Smears were prepared from a section at a distal region of one leg of engorged females, after an 8-day incubation period. Smears were made on glass slides, stained with Giemsa, and examined microscopically under immersion. The whole smear was examined considering the following parameters:

- Monthly Infection rates (IR): defined as the percentage of *Babesia* spp. positive ticks related to the total number of ticks examined per month;
- Infection Intensity (II): defined as the number of *Babesia* spp. sporokinetes counted in each hemolymph smear, divided by the number of microscopic fields examined per smear, and divided by the total number of positive ticks. Each number for IR and II represents the mean number of monthly observations.

Statistical analysis

The data are presented combining the values of the corresponding months during the two years of study, using analysis of variance (ANOVA); the infection rates of ticks were compared by the chi-square test.

3- Results

In some occasions during the experimental period it was not possible to obtain the desirable number of 48 ticks on all animals in the two groups. Some engorged females died during the BOD incubation period, previously to preparation of hemolymph smears.

After 52 collections, 2,105 *B. microplus* engorged females were obtained, from which 982 (46.7%) were collected from calves and 1,083 (51.4%) were collected

from cows. Hemolymph smears were prepared from all females, but the amount of fluid extracted from them was variable. The mean number of microscopic fields examined per smear was 144 ± 87 (ranging from 05 to 1,175), and no significant differences were seen between smears made from females collected from calves and females collected from cows.

The total *Babesia* spp. infection rate of *B. microplus* engorged females was 10.1%. The infection rate of females collected from calves (17.5 %) was significantly higher ($p < 0.05$) than that observed in females collected from cows (3.6 %). The probability to find a *Babesia*-infected engorged female feeding on a calf was five times greater than that to find an infected female feeding on a cow.

The monthly variation of *Babesia* infection rate in *B. microplus* is presented in Figure 1. The mean incidence of *Babesia* sporokinetes in the tick vector in the calf group was constantly higher than that in the cow group. The engorged females feeding on calves were infected throughout the experimental period, with infection rates ranging from 9.4 to 31.1 %. The lowest infection rate was observed in March and the highest in November. It was observed that females collected from cows showed the highest infection rates in January (6.9%), March (8.5%) and October (9.4%), with absence of infection in April and May (Figure 1).

The studied region is characterized by two defined seasons: a dry season from April to September and a rainy season from October to March. The mean rainfall was 19.5 mm^3 (ranging from 0 to 56.7 mm^3) during the dry season, and 215.3 mm^3 (ranging from 69.8 to 469.5 mm^3) during the rainy season (Figure 1).

Babesia spp infection rates in engorged females collected from cows during the rainy season were significantly higher ($p < 0.05$) than those observed during the dry season. In contrast, infection rates in engorged females collected from calves showed no significant variations between the two seasons (Figure 2).

The mean number of *Babesia* sporokinetes per microscopic field in engorged females collected from calves (3.1) was significantly higher ($p < 0.05$) than that obtained in females collected from cows (0.5).

The infection rates observed in engorged females collected from the four naturally infected calves, maintained in isolation and artificially infested with *Babesia*-free-

larvae are shown in Table 1. The infection rate of engorged females collected when calves were two months old was 13.7%. This value showed a gradual decrease until the age of four months; and when calves were five months old the infection rate of engorged females was only 0.7%.

Infection rates of engorged females collected from one- to five-months-old calves, maintained under natural conditions, ranged from 9,7 to 17,8%, with no significant differences ($p < 0.05$) (Table 1).

4- Discussion

The farm where the experiment was carried out is considered an area of enzootic stability, where calves usually become infected with *B. bigemina* and *B. bovis* during their first weeks of life. There is a relationship between age and resistance to *Babesia* infections (Callow et al. 1976; Mahoney, 1979); however, if the population of *B. microplus* increases clinical cases of babesiosis may occur in calves. Under these circumstances, there is a need to adopt programs of acaricide dipping to prevent emergence of disease. The acaricide-dipping protocol adopted for calves and cows was effective in avoiding high infestation levels of *B. microplus*. The 56-day-interval between treatments was sufficient for re-infestations, since coumaphos has a residual effect of three days and the parasitic stage of *B. microplus* ticks requires a developmental period of 23 days (Magalhães, 1989).

Riek (1964; 1966), describing the life cycle of *B. bigemina* and *B. bovis* in their tick vector *B. microplus*, suggest that the distinctive morphological characteristics of the kinetes in the ticks could be of value in epidemiological studies. However, differentiation between *Babesia* species based only on morphological aspects of sporokinetes has been questionable (Guglielmone et al., 1996). For this reason, sporokinetes were not differentiated in the present study.

It was observed, throughout the experimental period, that engorged females collected from calves had *Babesia* spp infection rates significantly higher than those collected from cows. It is known that engorging females are the only stage of *B. microplus* ticks that becomes infected with *Babesia* spp., and only if they feed

on cattle with parasitemia during the last 16 to 24 h before detachment (Callow & Hoyte, 1961; Friedhoff & Smith, 1981). Most of the parasites imbibed by the tick die within the tick gut. Only the gamonts survive and differentiate into ray bodies, which are diploid and start immediately cell divisions. This process results in the formation of haploid gametes (Mackenstedt et al, 1995), which will initiate a sexual process in the vector leading to the formation of sporokinetes. Thus, the key to understand the process of infection of engorged females has to do with formation of gamonts in the vertebrate host.

In experimental infections the maximum infectivity of ticks occur during the initial phase of parasitemia, although the animals maintain the capacity to infect ticks with *B. bigemina* for four to seven weeks, and with *B. bovis* for one year (Mahoney, 1969). After the primo infection, calves living in endemic areas, suffer successive inoculations of *Babesia* sporozoites due to infestations of naturally infected ticks, and consequently present high levels of infectivity for engorging females. However, adult animals, even when exposed to constant inoculations of *Babesia* sporozoites by ticks, present low parasitemia and low transmission rates to the engorging females. This fact suggests that the low infection rates of females collected from adults are related to the development of immunity against *Babesia* stages in the host, including the gamonts. Therefore, after blood suckling, antibodies in the tick gut, limiting the continuation of the life cycle, neutralize the gamonts. Development of specific antibodies against the sexual stages has been described in infections by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. These antibodies interfere in the parasite transmission by neutralizing gametes in the gut of mosquitoes (Lal et al., 2001). However, it is possible that anti-gamont antibodies induced in the bovine host are not able to neutralize all the gamonts due to an escaping mechanism created by the parasite. Evidence for that is the fact that some gamonts are reported to be surrounded by an erythrocytic membrane while within the lumen of the tick midgut (Friedhoff, 1990) and thus may never be directly exposed to antibodies.

After recovering from patent disease, calves may develop sub clinical infections that last for several months (Johnston et al., 1978). However, when the calves

kept isolated after primo infection were infested with *Babesia*-free ticks the infection rate of engorged females was higher at the beginning of host infections (Table 1), with progressive decrease, in accordance with observations reported by Mahoney (1969). The calves living in the endemic area, with constant inoculations of sporozoites by ticks, remained infective to engorging females during the six months of observation. These results suggest the need of an ongoing life cycle in the tick for gamont formation in the host. After several cycles of multiplication in the vertebrate host, the parasite probably loses the capacity to form gamonts, with consequent reduction of its ability to infect *B. microplus* ticks.

The monthly variation of sporokinete incidence in ticks collected from cows was higher during the rainy season, in both years of observation. This finding ratifies seasonality for *Babesia* spp. infected ticks, which would lead to greater chances of transmission during the rainy season.

Babesia inoculation rate is directly related to the intensity of infestation and to the infection rate. In the State of Minas Gerais, the rainfall appeared to be the climatic factor that most influenced the seasonal variation in intensity of infestation of *B. microplus* (Lima et al., 2000). During the dry season, when rainfall and temperatures were low, there was a sharp reduction in *B. microplus* infestation. The onset of the rainy season produced a rise in infestation levels, which remained relatively high until February. Thus, the increased infestation levels lead to an increased *Babesia* inoculation rate in the animals, allowing the development of gamonts and, consequently, an increased infection rate in engorged females.

During the dry season, decreases in temperature may interfere with the *Babesia* biological cycle in the tick. Low temperatures may completely inhibit alimentary and transovarial *Babesia* infections in *B. microplus* engorged females (Rieck, 1964). Despite the occurrence of *B. microplus* infestations during cold periods, larvae may show reduction in *Babesia* infection rates and, therefore, the possibility to induce formation of gamonts is reduced in the host. In contrast, the young animals that have not yet developed immunity against gamonts are able to maintain high levels of gamont formation and high infection rates for engorging females, even though they are inoculated with fewer sporozoites.

References

- Alonso, M., Arellano-Sota, C., Cereser, V.H., Cordoves, C.O., Guglielmone, A.A., Kessler, R., Mangold, A.J., Nari, A., Patarroyo, J.H., Solari, M.A., Veja, C.A., Vizcaino, O., Camus, C.A., 1992. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Ver. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 11, 713-733.
- Callow, L.L., Emmerson, F.R., Parker, R.J., Knott, S.G., 1976. Infection rates and outbreaks of disease due to *Babesia argentina* in unvaccinated cattle on 5 beef properties in South-eastern Queensland. *Aust. Vet. J.* 52, 446-450.
- Callow, L.L., Hoyte, H.M.D., 1961. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. and the tick, *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.*, 37, 381-390.
- Friedhoff, K.T., 1990. Interaction between parasite and tick vector. *Intern. J. Parasitol.* 20, 525-535.
- Friedhoff, K.T., Smith, R.D., 1981. Transmission of *Babesia* by ticks. In: Ristic, M., Kreier, J.P. *Babesioses*, Academic Press, San Diego, p. 267-321.
- Guglielmone, A.A., Gaido, A.B., Mangold, A.J., 1996. Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. *Vet. Parasitol.* 61, 15-20.
- Johnston, L.A.Y., Leatch, G., Jones, P.N., 1978. The duration of latent infection and functional immunity in Droughtmaster and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. *Aust. Vet. J.* 54, 14-18.
- Lal, A.A., Patterson, P.S., Sacci, J.B., Vaughan, J.Á., Collins, W.E., Wirtz, R.A., Azad, A.B., 2001. Anti-mosquito midgut antibodies block development of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in multiple species of *Anopheles* mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 5228-5233.
-

-
-
- Leite, R.C., Lima, J.D., 1982. Fatores sanitários que influenciam na criação de bezerros. *Arq. Esc. Vet. UFMG.* 34, 485-492.
- Lima, W.S., Ribeiro, M.F.B., Guimarães, M.P., 2000. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Tropic. Anim. Health Prod.* 32, 375-380.
- Mackenstedt, U., Gauer, M., Fuchs, P., Zapf, F., Schein, E., Mehlhorn, H., 1995. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitol. Res.* 81, 595-604.
- Magalhães, F.E.P., 1989. Aspectos biológicos, ecológicos e de controle do *Boophilus microplus* (Canestrini,1887) no Município de Pedro Leopoldo, MG. Belo Horizonte: UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, 115p. MSc Thesis.
- Mahoney, D.F., 1969. Bovine babesiosis: A study of factors concerned in transmission. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 6, 1-14.
- Mahoney, D.F., 1979. *Babesia* of domestic animals. In: Kreier, J.P. (ed) Parasitic protozoa. Academic Press , San Diego, pp 1-52.
- Patarroyo, J.H., Ribeiro, M.F.B., Santos, J.L., Faria, J.E., 1987. Epidemiologia da babesiose bovina no Estado de Minas Gerais. I Prevalência de anticorpos fluorescentes na Zona da Mata-MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 39, 423-429.
- Ribeiro, M.F.B., Patarroyo, J.H., Santos, J.L., Faria, J.E., 1983. Inquérito de opinião com criadores da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. I Alguns fatores associados com mortalidade de bezerros. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 35, 547-556.
- Riek, R.F., 1964. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Aust. J. Agr. Res.* 15, 802-821.
- Riek, R.F., 1966. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Aust. J. Agric. Res.* 17, 247-254.

Acknowledgements

Financial support for this work was from Minas Gerais State Research Foundation – FAPEMIG – Brazil.

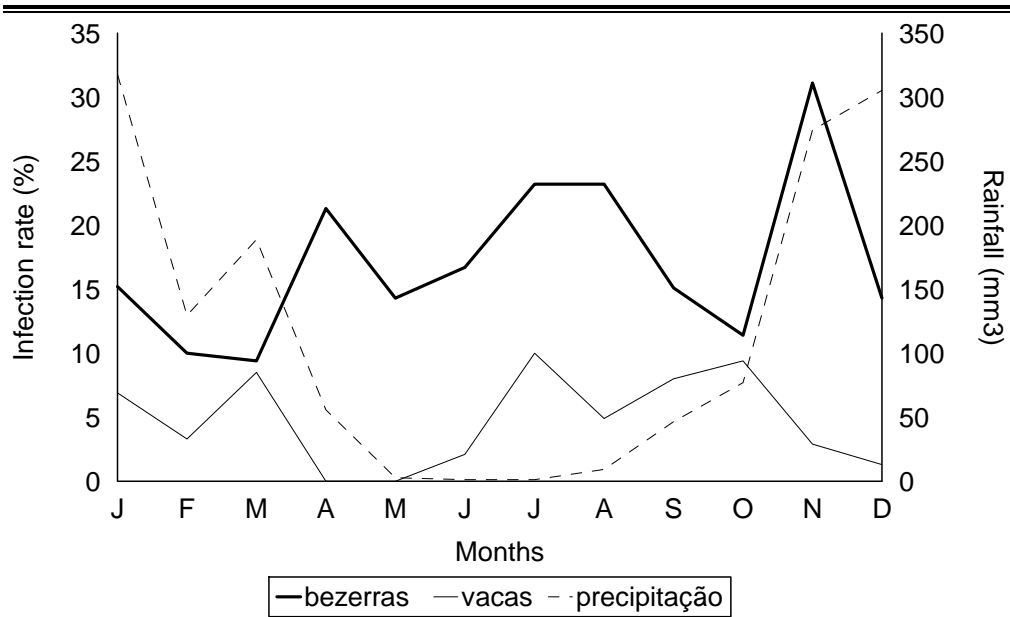


Figure 1. *Babesia* spp infection rate (%) in *Boophilus microplus* engorged females collected from calves and cows in relation to rainfall, from March 1999 to February 2001, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil.

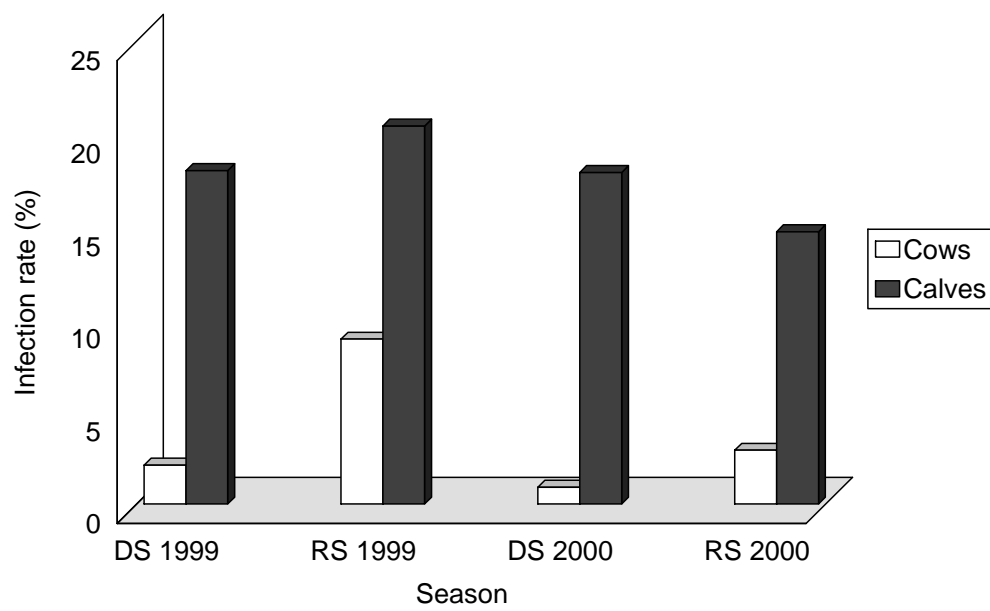


Figure 2 - *Babesia* spp infection rate (%) in *Boophilus microplus* engorged females collected from calves and cows, during dry seasons (DS) and rainy seasons (RS), Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil, 1999 to 2000.

Table 1. Infection rate of *Babesia* spp. in *B. microplus* engorged females collected from infected calves maintained isolated or under natural conditions in an endemic area in the State of Minas Gerais, Brazil, 1999 to 2001.

Age (months)	Isolated (n = 4)			Under natural conditions (n = 73)		
	Examined engorged females	Positive engorged females	% Positive	Examined engorged females	Positive engorged females	% Positive
1	-	-	-	129	15	11,6
2	241	33	13.7	145	14	9,7
3	451	47	10.4	162	25	15,4
4	280	26	9.3	129	23	17,8
5	142	1	0.7	91	14	15,4
> 6	-	-	-	106	27	25,4
Total	1114	107	9.6	762	118	15,5

7.2. Avaliação da taxa de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* por *Babesia* sp por meio do exame de hemolinfa e da Reação em Cadeia da Polimerase.

Na epidemiologia da babesiose, dentre outros fatores importantes, o conhecimento sobre as taxas de infecção das teleóginas ingurgitadas em bovinos infectados por *Babesia* spp é fundamental. A taxa de infecção pode ser afetada por fatores tais como diferenças de susceptibilidade entre cepas de carrapatos, método de infecção do bovino, temperatura ambiente e parasitemia do hospedeiro (Riek, 1966, Hoffmann, 1971). Algumas cepas de *Babesia* são adaptadas a determinadas espécies e/ou cepas de carrapatos (Hoffmann, 1971), por outro lado, algumas espécies e/ou cepas de carrapatos são completamente refratárias à infecção (Friedhoff & Smith, 1981).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a taxa de infecção de *B. microplus* com esporocinetos de *Babesia* sp em uma área endêmica de babesiose bovina, no estado de Minas Gerais, Brasil. Durante dois anos, no período compreendido entre março de 1999 e fevereiro de 2001, foram coletadas teleóginas de animais mantidos em pastagem, naturalmente expostos a infecção de *B. microplus*. Os animais experimentais foram constituídos de dois grupos de acordo com a faixa etária. Um grupo de animais jovens, acompanhados de um aos oito meses de idade e outro grupo constituído por vacas em lactação.

Durante todo o período experimental foi possível coletar teleóginas de *B. microplus* nos dois grupos, com exceção de duas ocasiões quando não foram obtidas teleóginas de vacas e nem de bezerras.

Algumas teleóginas coletadas nos animais e incubadas tanto em estufa como no meio ambiente, morreram antes de serem submetidas ao exame direto de hemolinfa. Estas teleóginas geralmente apresentavam coloração avermelhada, sugerindo um processo hemorrágico intestinal. A multiplicação da *Babesia* sp no vetor causa efeitos patogênicos que podem ser evidenciados por meio de alterações que variam desde a redução na ovoposição (Dalgliesh et al, 1981) até

à morte da teleóquina (Friedhoff & Smith, 1981). Alterações hemorrágicas também foram observadas por Melendez & Forlano (1996) em um estudo desenvolvido na Venezuela, sobre a incidência e a intensidade de infecção de esporocinetos de *Babesia* sp em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*.

A multiplicação do hematozoário nos tecidos do vetor faz com que fêmeas ingurgitadas em bovinos com altas parasitemias apresentem índices de mortalidade superiores a 90%, após a primeira semana de postura. Essa mortalidade está relacionada a alterações na parede intestinal do carrapato permitindo a passagem de hemoglobina e hemácias íntegras do conteúdo intestinal para a hemolinfa (Riek, 1964; 1966; Farias, 1994). Embora as teleóquinas que morreram não tenham sido submetidas ao exame direto de hemolinfa e nem à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), as alterações observadas sugerem que a causa de sua morte pode estar relacionada a uma alta infecção por *Babesia* sp.

Durante a confecção dos esfregaços de hemolinfa foi constatada uma grande variação na quantidade de líquido extraído de cada teleóquina, concordando com as observações de Guglielmone et al. (1985). A falta de padronização na quantidade de hemolinfa a ser examinada constitui um dos fatores limitantes deste exame. No presente trabalho foi verificado que seccionando o primeiro par de patas do carrapato obteve-se maior volume de hemolinfa, quando comparado com o volume obtido de outras patas. Este fato provavelmente está relacionado com a anatomia do *B. microplus*, onde o primeiro par de patas está localizado próximo às glândulas salivares, formando uma área que favorece o acúmulo de hemolinfa, visualizada externamente como uma área mais clara. Por outro lado, na secção das patas posteriores, a recuperação de hemolinfa pode ser menor devido à rápida expansão das alças intestinais, dificultando a passagem de líquido para estes órgãos.

No presente trabalho, o exame do esfregaço de hemolinfa das teleóquinas coletadas nos dois grupos de animais durante o período experimental, revelou uma taxa de infecção total das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* por *Babesia* sp de 9,0%. Outros estudos realizados em área endêmica da América do Sul,

utilizando o exame do esfregaço direto de hemolinfa de teleóginas de *B. microplus*, constataram taxas de infecção de 8% a 15% em cinco regiões da Colômbia (Forero et al., 1986); de 2% a 23% na Argentina (Guglielmone et al., 1988); de 18% a 40% e 0% a 5% em zebuínos e taurinos, respectivamente, também na Argentina (Guglielmone et al., 1989).

A ocorrência de maior taxa de infecção por *Babesia* sp em teleóginas de *B. microplus* tem sido correlacionada com o repasto sanguíneo em animais que estejam em fase de parasitemia detectável, tanto para *B. bigemina* como para *B. bovis* (Riek, 1964, 1966). Segundo Callow (1968) os carrapatos se infectam com *Babesia* sp somente durante as últimas 36 a 24 horas da fase parasitária, quando ingerem maior quantidade de sangue. Assim, fêmeas de *B. microplus* que se alimentam em animais com parasitemia patente, ingerem maior quantidade do protozoário tendo maior possibilidade de se infectarem.

O nível de parasitemia dos bovinos infectados pode ser influenciado por diversos fatores, como a idade, raça e intensidade de infestação por carrapato. Estas variáveis poderiam assim influenciar indiretamente na taxa de infecção das teleóginas de *B. microplus* por *Babesia* sp. No presente trabalho, foi observado que a taxa de infecção das teleóginas coletadas em bezerras (14,6%) foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) do que naquelas coletadas em vacas (4,4%). Este fato confirma as observações de Silva et al (1999) e, posteriormente, também verificada por Oliveira (2002), entretanto, discorda de Farias (1994) que considera os bovinos adultos portadores de infecção capazes de infectarem maior número de carrapatos. Trabalhos de Johnston (1967), Gaido & Guglielmone (1995) e Melendez & Forlano (1996), também verificaram maior taxa de infecção em teleóginas coletadas em bezerros, embora estes autores não tenham discutido este resultado ou relacionando-o com outros fatores como controle da população de carrapatos.

Durante o experimento as teleóginas do grupo 1 foram coletadas de 73 bezerras que foram mantidas a campo e em contato constante com carrapatos. Esses animais estavam comprovadamente infectados por *Babesia* sp uma vez que estes protozoários foram visualizados em esfregaços sanguíneos

confeccionados a partir do sangue periférico. Entretanto, somente 46 (63%) destas bezerras de um a oito meses e forneceram teleóginas infectadas, indicando que a infecção não está relacionada apenas com a parasitemia patente.

Fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* constituem o único estágio que se infecta com *Babesia* spp quando alimenta-se em bovino com parasitemia (Callow & Hoyte, 1961; Friedhoff & Smith, 1981). Os estádios de trofozoítos e merozoítos ingeridos morrem no intestino do carrapato, sobrevivendo apenas os gamontes. Os gamontes se diferenciam em corpos raiados que são diplóides e iniciam imediatamente a divisão celular resultando na formação de gametas haplóides (Mackenstedt et al., 1995), os quais darão início ao processo sexual no vetor, com formação dos esporocinetos. Assim, o ponto chave para compreender a infecção das teleóginas está relacionando com a formação de gametas.

Em infecções experimentais tem-se verificado que a infectividade máxima para carrapatos ocorre na fase inicial da parasitemia embora os animais mantenham a capacidade de infectar carrapatos com *B. bigemina* por quatro a sete semanas e por *B. bovis* por um ano (Mahoney, 1969). Os bezerros criados em áreas endêmicas, após a primeira infecção sofrem repetidas inoculações de esporozoítos de *Babesia* através de infestações de carrapatos naturalmente infectados e apresentam alta taxa de infectividade para as teleóginas. Entretanto, nos animais adultos, mesmo sofrendo também inoculações freqüentes de esporozoítos de *Babesia* pelos carrapatos, apresentam baixa parasitemia e baixa taxa de transmissão à teleóginas. Esse fato sugere que as menores taxas de infecção de teleóginas coletadas em bovinos adultos estejam relacionadas com o desenvolvimento de imunidade contra os estádios de *Babesia* no hospedeiro, inclusive os gamontes. Assim, após a ingestão de sangue pelo carrapato, haverá neutralização dos gamontes pelos anticorpos no lúmen intestinal, dificultando a continuidade do ciclo do parasito. O desenvolvimento de anticorpos específicos para o estágio sexual tem sido descrito na infecção por *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, interferindo na transmissão do parasito, através da neutralização dos gametas no intestino dos mosquitos (Lal et al., 2001).

Bezerros após se recuperarem da fase patente da doença mantêm a infecção subclínica por vários meses (Johnston et al., 1978). Entretanto, os bezerros que após a primeira infecção permaneceram isolados e foram infestados com carrapatos livres de *Babesia*, apresentaram maior taxa de infecção das teleóginas no início da infecção do hospedeiro, estando de acordo com as observações de Mahoney (1969). Posteriormente, ocorreu queda gradativa da taxa de infecção das teleóginas embora os animais ainda estivessem portadores da infecção. Quanto aos bezerros de área endêmica, que sofrem constantes inoculações de esporozoítas pelos carrapatos, estes permaneceram infectantes para as teleóginas durante os seis meses de observação. Esses dados sugerem que a formação de gamontes no hospedeiro vertebrado está relacionada com a inoculação de esporozoítas, havendo necessidade do ciclo do parasito no carrapato. Após vários ciclos de multiplicação no hospedeiro vertebrado, provavelmente, o parasito perca a capacidade de formar gamontes e conseqüentemente sofra redução em sua capacidade de infectar o *B. microplus*.

Com relação ao número médio de esporocinetos encontrados por campo microscópico, foi verificado que a maioria das teleóginas infectadas encontrava-se com uma carga parasitária baixa, com menos de um esporocineto por campo, e só uma pequena proporção das mesmas encontravam-se altamente parasitadas (Tabela 2). Estes achados estão de acordo com o trabalho de Guglielmone et al. (1995), e caracterizam uma variável de distribuição binomial negativa. No entanto, no aspecto epidemiológico, a avaliação qualitativa (presença ou não de esporocinetos na hemolinfa) é mais importante do que a avaliação quantitativa (número médio de esporocinetos por campo), por não existir uma correlação positiva entre a taxa de infecção das teleóginas e a taxa de infecção dos ovos e larvas por essas produzidos (Guglielmone et al., 1997). Friedhoff & Smith (1981) verificaram que teleóginas de *B. microplus* com alta taxa de infecção por *B. bigemina* apresentaram redução na sua capacidade de oviposição. Estes constataram que o grau de infecção na hemolinfa não influencia na taxa de infecção dos ovos, sendo que os carrapatos com baixo grau de infecção produzem mais ovos infectados do que os fortemente parasitados com *Babesia*

sp. Estes fatos sugerem que as cargas parasitárias que ocorrem nos carrapatos em condições naturais não seriam prejudiciais aos carrapatos. Neste caso, a transmissão transovariana nesses carrapatos seria mais eficiente do que naqueles fortemente infectados.

Por outro lado, as teleóginas infectadas com baixa carga parasitária restringem o uso do exame de hemolinfa devido à possibilidade de apresentarem resultado falsos negativo. Segundo Mahoney & Mirre (1971) o exame de hemolinfa seria capaz de detectar menos de 50% das teleóginas infectadas por *B. bovis* e um percentual maior das infectadas por *B. bigemina*. No entanto, estes autores realizaram o exame da hemolinfa no quinto dia após o desprendimento das teleóginas dos bovinos hospedeiros. Guglielmone et al. (1985) verificaram que a probabilidade de se detectar infecção por *Babesia* sp em teleóginas de *B. microplus* é maior quando se examina a hemolinfa no nono ou décimo dia após a queda das teleóginas alimentadas em animais com baixa parasitemia, e no sexto dia naquelas alimentadas em animais com parasitemia moderada. No presente trabalho, optou-se por realizar o exame do esfregaço de hemolinfa no oitavo dia após a coleta das teleóginas, baseado em estudo prévio, período no qual foi constatado maior percentual de teleóginas parasitadas.

É interessante observar que 19,4% das teleóginas de *B. microplus* coletas de bezerras com menos de um mês de idade estavam infectadas por *Babesia* sp. Este fato está de acordo com os trabalhos realizados em áreas endêmicas de estabilidade enzoótica, nas quais os animais, geralmente, sofrem a primeira infecção pelos protozoários nas primeiras semanas de vida (Corrier & Guzman, 1977; Madruga et al., 1987).

Na região estudada são observadas duas estações climáticas bem definidas: uma chuvosa, entre outubro a março e outra seca, de abril a setembro. A temperatura durante o período experimental manteve-se entre 19,5^oC e 24,4^oC, sendo que os valores mais baixos foram observados nos meses mais secos e os valores mais altos nos meses chuvosos.

Esses dados coincidem com os observados por Magalhães (1989) (ANEXO 3), que estudou a sazonalidade do *B. microplus* na mesma localidade. Este autor

verificou que as variações climáticas registradas no período experimental foram, primariamente, responsáveis pela grande diferença entre os tamanhos das populações e o número de gerações para cada ano, em especial a precipitação pluviométrica. Lima et al. (2000) também citam que o índice pluviométrico constitui o principal fator climático que influencia na variação sazonal e intensidade de infestação de *B. microplus* em Minas Gerais. Durante a estação seca, quando há pouca chuva e temperatura mais baixa, há redução da infestação de *B. microplus*. No início da estação chuvosa ocorre aumento do nível de infestação, o qual permanecerá elevado até fevereiro.

A taxa de infecção das teleóginas de *B. microplus* por *Babesia* sp, apresentou o mesmo padrão de distribuição entre as teleóginas coletadas de bezerras e de vacas, como pode ser observado nas Figuras 3 e 5, sendo que naquelas incubadas em BOD as taxas de infecção foram maiores do que nas mantidas em temperatura ambiente. Esse fato deve-se, provavelmente, às condições controladas de temperatura e de umidade, as quais foram favoráveis para o desenvolvimento dos estádios de *Babesia* sp observados nos carrapatos.

Entretanto, de acordo com as Figuras 4 e 6, que representam a média da taxa de infecção ao longo de dois anos de observação, pode-se observar uma inversão da taxa de infecção entre as teleóginas incubadas em BOD ou ambiente, tendo estas últimas se mostrado mais elevadas. É possível que as condições ambientais observadas entre os meses de fevereiro, novembro e dezembro de 2000, para as teleóginas coletadas de bezerras, e fevereiro e março de 2000, janeiro e fevereiro de 2001 para as teleóginas coletadas de vacas, tenham sido mais favoráveis ao desenvolvimento da *Babesia* sp do que as condições controladas da BOD. Nestes meses observam-se as taxas de precipitação pluviométrica mais elevada.

É interessante observar que os valores encontrados no presente trabalho referentes às taxas de infecção das teleóginas de *B. microplus* por *Babesia* sp também sofreram variações em decorrência das variações climáticas (Figuras 1 e 3). Foi observado que a precipitação pluviométrica foi o principal fator determinante destas variações, uma vez que os picos de infecção acompanharam

os picos de maior precipitação. A temperatura não apresentou variações significativas e parece não influir nas taxas de infecção das teleóginas.

Em um estudo realizado na Venezuela, Melendez & Forlano (1996), trabalhando em uma área com duas estações climáticas bem definidas: uma chuvosa, entre os meses de maio a novembro, e outra seca, de dezembro a abril, verificaram que a população de carrapatos diminuiu durante a estação chuvosa e atingiu altos níveis durante a estação seca. Estes autores observaram que a incidência da infecção dos carrapatos por *Babesia* sp foi maior durante a estação seca do que durante a estação chuvosa.

Embora os picos de infecção das teleóginas tenham ocorrido durante a estação seca no trabalho de Melendez & Forlano (1996), tendo se mostrado diferentes dos encontrados no presente trabalho, quando estes picos ocorreram durante os meses de maior precipitação, houve uma coincidência entre o aumento na taxa de infecção das teleóginas com a época em que foram observadas as maiores populações do carrapato e os mais altos índices de parasitemia sanguínea nos bovinos daquela região. Este fato sugere que haja uma adaptação entre os carrapatos e os agentes locais da babesiose bovina, o que permite a formação de um sistema de transmissão eficiente da doença.

Apesar das propriedades estudadas por estes autores e a aqui analisada se situarem em regiões de clima tropical, e de ter-se concluído que a precipitação seria o fator climático que mais interfere nas taxas de infecção dos carrapatos, existem diferenças nas estações climáticas nos dois países, inclusive com inversão entre os meses de maior e menor precipitação observados. Outros estudos deverão ser propostos para tentar explicar que outras variáveis estariam influenciando no desenvolvimento da *Babesia* sp no vetor. Outro ponto a ser esclarecido é o fato da taxa de infecção das teleóginas ter sido maior na estação seca no estudo realizado por Melendez & Forlano (1996) e no presente trabalho esta taxa ter sido mais elevada durante a estação chuvosa.

O conhecimento detalhado destes fatores poderia ajudar no desenvolvimento de programas de controle estratégico dos carrapatos, dando

ênfase aos meses em que as taxas de infecção dos mesmos fossem mais elevadas, objetivando controlar a babesiose.

A avaliação da presença da infecção das teleóginas por *B. bigemina* e/ou *B. bovis*, exclusivamente, por meio das diferenças morfológicas dos esporocinetos detectados no exame de hemolinfa é discutível (Riek, 1964,1966; Morzaria et al., 1976). Visto que existem esporocinetos cujos tamanhos e formas permitem sua classificação em qualquer uma das duas espécies (Guglielmone, et al. 1996). Outra maneira de diferenciar, especificamente, a infecção das teleóginas, seria por meio de ensaios biológicos, utilizando-se bovinos. O isolamento das espécies por meio infestação de bovinos esplenectomizados com as larvas derivadas de teleóginas de campo, permite a definição do agente infeccioso e da capacidade de transmissão transovariana de cada espécie pelo vetor (Farias, 1994). No entanto, esta técnica é trabalhosa, onerosa e os resultados são obtidos em longo prazo.

A alta sensibilidade e especificidade das técnicas de diagnóstico baseadas em amplificação de DNA foram destacadas como sendo de grande utilidade em estudos epidemiológicos conduzidos a campo (Fahrimal, et al., 1992; Persing et al., 1992; Figueroa et al., 1994).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada no presente trabalho por ser uma técnica descrita como sendo de alta sensibilidade e especificidade, além de permitir a diferenciação entre as espécies, como descrito por Buening & Figueroa (1996). Outro objetivo na utilização da PCR foi o de realizar uma comparação entre esta técnica e o exame do esfregaço direto de hemolinfa.

A maioria dos trabalhos nos quais se utiliza a PCR para detecção de *Babesia* sp, foram realizados nos hospedeiros vertebrados. A literatura é pobre em citações referentes à pesquisa de *B. bovis* e *B. bigemina* no carrapato. Este fato estimulou o desenvolvimento deste trabalho, no qual foi proposta uma PCR múltipla, através da qual fosse possível pesquisar as espécies de *Babesia* responsáveis pela infecção das teleóginas coletadas em uma área endêmica do estado de Minas Gerais.

Para o controle positivo da reação de PCR, foram utilizadas amostras de DNA extraídas do sangue de animais experimentalmente infectados com *B. bovis* ou *B. bigemina*. A obtenção do DNA destas amostras foi realizada por meio da lise com um tampão contendo saponina, NaCl e EDTA, seguida de extração utilizando fenol/clorofórmio (Sambrook et al., 1989). Segundo os trabalhos de Figueroa et al. (1993) e Smeenk et al. (2000) a amostra de DNA utilizada como molde para a realização da PCR foi submetida somente a lise como descrito acima e o “pellet” resultante foi digerido com proteinase K. No presente trabalho, a extração com fenol/clorofórmio foi acrescida para otimizar o processo e reduzir o risco de inibição da PCR, que ocorre na presença de hemoglobina, como descrito no trabalho de Schwartz et al. (1997).

Após a extração do DNA, foram realizadas diluições sucessivas do mesmo em água mili-Q estéril, para estimar a menor diluição em que a PCR detectava parasitos no sangue, nas condições utilizadas. Isto foi feito para que fosse utilizada a menor quantidade possível de DNA, e o controle positivo fosse o mesmo em todas as reações, uma vez que as amostras de sangue das quais este DNA foi extraído eram originárias de outra instituição e foram gentilmente cedidas para este trabalho.

Resultados falso negativos podem ocorrer durante a execução da PCR, devido a substâncias inibidoras, as quais podem ser extraídas diretamente do sangue ou dos tecidos, juntamente com o DNA alvo (Al-Soud & Radstrom, 2001). Esses autores citam a hemoglobina e a lactoferrina como potentes inibidoras da PCR, estando estas substâncias presentes nos eritrócitos e leucócitos, respectivamente.

A extração do DNA das teleóginas foi realizada segundo o protocolo de extração descrito por Figueroa (1997), utilizando um Kit para extração (GENTRA SYSTEMS, D-5500^A, PUREGENE), proposto pelo mesmo. A utilização desse KIT foi importante para a obtenção de um DNA alvo de boa qualidade e livre de possíveis substâncias inibidoras.

Altas concentrações de DNA alvo podem diminuir a eficiência da amplificação devido à hibridização das fitas matriz (Syvanen et al., 1988). Hoelzle

et al. (2003), trabalhando com *Mycoplasma suis* observaram falsas reações negativas à PCR quando utilizaram DNA extraído de animais na fase aguda da doença. Entretanto, quando o DNA foi diluído a 1:10 e 1:100 a reação tornava-se positiva. Estes autores citam também que os resultados falso positivos da PCR são causados principalmente pela contaminação com produtos previamente amplificados.

Para garantir a qualidade da PCR, evitando a ocorrência de falsos positivos, foram utilizados cinco diferentes ambientes para processamento das amostras de sangue, das teleóginas, extração do DNA, pré-mix, amplificação e análise dos produtos da PCR, além dos processos rotineiros de descontaminação das áreas de trabalho (Persing, 1991).

Os iniciadores utilizados neste trabalho para amplificar os fragmentos do DNA de *B. bigemina* e *B. bovis* foram propostos, respectivamente, por Figueroa et al. (1992) e Figueroa et al. (1993), e foram utilizados anteriormente em outros estudos sobre *Babesia* sp (Smeenk et al., 2000; Oliveira, 2002).

Os produtos das amplificações do DNA das amostras examinadas foram inicialmente analisados em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio. Posteriormente, optou-se pela análise destes produtos em gel de poliacrilamida a 5%, corado pela prata. Os fatores que justificam esta mudança são a menor quantidade de DNA utilizado no gel de poliacrilamida e a maior capacidade de resolução desta técnica, uma vez que as bandas específicas amplificadas por meio da PCR possuem um número de pares de bases próximos (350 bp para *B. bovis* e 278 bp para *B. bigemina*). Todas as amostras que tinham sido analisadas por meio do gel de agarose, foram repetidas no gel de poliacrilamida.

Para a execução da PCR foram selecionadas, aleatoriamente, 90 teleóginas coletadas no período seco e 90 coletadas no período chuvoso, sendo que nos dois grupos, 45 estavam positivas e 45 negativas ao exame do esfregaço direto de hemolinfa. As 180 teleóginas utilizadas eram provenientes de bezerras e foram incubadas em BOD.

A PCR permitiu a detecção de DNA de *Babesia* sp em todas as teleóginas que estavam positivas ao exame do esfregaço direto de hemolinfa. Este resultado

era esperado, uma vez que por meio do exame direto é possível visualizar o parasito no esfregaço corado. Porém, dentre as 90 amostras negativas ao exame da hemolinfa, 25 (27,8%) estavam positivas quando foram examinadas por meio da PCR (Tabela 7). Estes resultados evidenciam a maior sensibilidade da PCR quando comparado com o exame direto de hemolinfa (78%). Provavelmente, estas teleóginas apresentavam uma taxa de infecção baixa, não sendo possível a visualização dos parasitos na porção de hemolinfa extraída e examinada. Porém quando as mesmas foram partidas e submetidas à extração do DNA e, posteriormente à PCR utilizando “primers” específicos, a infecção por *Babesia* sp se tornou evidente.

Como já discutido anteriormente, uma grande vantagem da PCR em relação ao exame de hemolinfa, além da maior sensibilidade, foi a possibilidade de diferenciar especificamente a infecção das teleóginas por *Babesia* sp. A partir dos resultados obtidos, ficou evidente a maior prevalência da infecção das teleóginas por *B. bigemina*. Dentre as 115 teleóginas positivas por meio da PCR, 73% estavam infectadas somente com *B. bigemina*, 19% apresentavam infecção associadas por *B. bovis* e *B. bigemina* e apenas 8% apresentavam-se infectadas somente por *B. bovis*. A infecção das teleóginas por *B. bigemina* foi significativamente maior do que por *B. bovis* ($p < 0,05$), tanto no período seco como no período chuvoso, concordando com os dados encontrados na literatura.

Na Austrália, apenas 7% a 10% das teleóginas coletadas de bovinos a campo, naturalmente portadores, estavam infectadas por *B. bigemina* e 0,27% a 0,36% por *B. bovis* (Johnston, 1967). Assim constatou-se que são raros os carrapatos infectados com *B. bovis* e sua transmissão pode ocorrer em muito menor frequência do que *B. bigemina*.

O menor percentual de teleóginas infectadas com *B. bovis*, verificado em todas as situações experimentais, reflete uma menor capacidade dessa espécie de infectar o vetor. Além de provocar parasitemias menores, com conseqüente menor chance de infecção do carrapato, *B. bovis* infecta menor número de células intestinais da teleóquina e produz menor número de vermículos na hemolinfa (Riek, 1966).

Mahoney & Mirre (1971) verificaram que a taxa de infecção das larvas de *B. microplus* de campo é, no máximo, de 0,04% para *B. bovis* e de 0,23% por *B. bigemina*. No entanto, em condições de laboratório essas taxas variam de 0,5% a 2,5% e de 20% a 44%, respectivamente.

Discutindo sobre a infectividade das espécies de *Babesia* para as teleóginas, Farias (1994) cita que em condições de infecção clínica do bovino, *B. bovis* revelou uma capacidade de infecção do carrapato similar à de *B. bigemina*. Em fase subclínica, no entanto, foi notória a diferença entre teleóginas segundo os respectivos graus de infecção com as duas espécies testadas. *B. bovis* infectou um número reduzido de teleóginas (7%) e *B. bigemina* causou infecção em um percentual similar ao observado em infecção em fase clínica (98,6%). Com relação à atuação sobre o potencial reprodutivo do carrapato, tanto em teleóginas ingurgitadas em bovinos durante a fase clínica quanto na fase subclínica da babesiose, o efeito da infecção por *B. bigemina* foi mais intenso do que o verificado para *B. bovis*.

Riek (1966) observou que o número de esporocinetos produzidos em cada célula intestinal invadida da teleógina, bem como o número de esporozoítos nas glândulas salivares infectadas, são maiores nas infecções por *B. bigemina* que por *B. bovis*.

Quando as duas espécies coexistem em uma mesma população de carrapatos, a maior infectividade de *B. bigemina* ao carrapato pode ser compensada em parte pelo fato de que o bovino transmite *B. bovis* ao vetor até um ano após a infecção, enquanto a transmissão de *B. bigemina* ocorre apenas durante quatro a sete semanas após a infecção do bovino (Mahoney, 1969).

Como já foi discutido anteriormente, a maioria das teleóginas examinadas apresentou um baixo número médio de esporocinetos por campo de hemolinfa examinado e este fato pode resultar em um diagnóstico falso-negativo quando as mesmas são examinadas por meio do esfregaço direto. Este fato justifica a utilização de uma PCR específica para detectar com maior segurança a infecção das teleóginas, uma vez que apesar desta técnica ser mais elaborada e onerosa, pode propiciar resultados mais sensíveis, que poderiam ser valiosos nos estudos

epidemiológicos para determinar a presença de instabilidade ou estabilidade enzoótica em uma determinada região e na instituição de programas de controle da babesiose.

Os dados observados no presente trabalho confirmam a proposição de Buening & Figueroa (1996), sobre a necessidade do desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais sensíveis do que o exame direto de hemolinfa, e que permitam diferenciar especificamente a infecção das teleóginas de *B. microplus* por *Babesia* sp. A utilização de uma PCR múltipla neste estudo, permitiu identificar as espécies que infectavam os carrapatos e ainda, por meio de uma única reação identificar a infecção de uma mesma teleóquina pelas duas espécies de *Babesia* sp.

A despeito da técnica de PCR ser mais sensível em detectar *Babesia* sp em teleóginas coletadas em bovinos em área endêmica, esta técnica é complexa, tem custo elevado e requer para a sua execução infra-estrutura adequada e pessoal treinado, não estando disponível para uso na rotina nos países onde é maior a prevalência da babesiose. Esta é uma técnica que pode ser usada com excelentes resultados em estudos epidemiológicos e poderia subsidiar maiores conhecimentos sobre a babesiose, permitindo assim, avanços na adoção de medidas mais eficazes para o controle desta doença.

8 - CONCLUSÕES

- A taxa de infecção das teleóginas de *Boophilus microplus* colhidas de bezerras e de vacas, em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, foi de 9,0%.
- As taxas de infecção das teleóginas de *B. microplus* por *Babesia* sp se mostram mais elevadas nos meses em que foram registrados os maiores índices de precipitação pluviométrica.
- As teleóginas colhidas de bezerras e de vacas e mantidas em estufa climatizada do tipo BOD, apresentam taxas de infecção mais elevadas do que as mantidas no meio ambiente.
- As taxas de infecção das teleóginas colhidas de bezerras são significativamente maiores do que de teleóginas colhidas de vacas, quando os animais são provenientes de áreas endêmicas para a babesiose.
- A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é mais sensível do que o exame direto do esfregaço de hemolinfa para a detecção de teleóginas de *B. microplus* infectadas por *Babesia* sp.
- A PCR permite a diferenciação específica da infecção de teleóginas de *B. microplus* por *B. bovis* e por *B. bigemina*.
- Num rebanho onde ocorrem as duas espécies, a taxa de infecção de teleóginas de *B. microplus* por *B. bigemina* é maior do que por *B. bovis*.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBEDE, R.I.S., KEMP, D.H., HOYTE, H.M.D. *Babesia bovis* infection of secretory cells in the gut of the vector tick *Boophilus microplus*. *Int. J. Parasitol.*,16, 109-114, 1986.
- AKIMBOADE, O. A. & DIPEOLU, O. O. Detection of *Babesia bovis* infection in *Boophilus geigyi* with egg crushing larval smears, and haemolymph puncture. *Vet. Q.*, 3, 43-147, 1981.
- ALONSO, M., ARELLANO-SOTA, C., CERESER, V.H., CORDOVES, C.O., GUGLIELMONE, A.A., KESSLER, R., MANGOLD, A.J., NARI, A., PATARROYO, J.H., SOLARI, M.A., VEGA, C.A., VIZCAÍNO, O., CAMUS, C.A. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin American and the Caribbean. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 11, 713-733, 1992.
- AL- SOUD, W.A., RADSTROM, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* 39,485-493, 2001.
- ANTHONY, D.W., JOHNSON, A.J., HOLBROOK, A.A. Some effects of parasitism by *Babesia caballi* on the tropical horse tick *Dermacentor* (= *Anocentor*) *nitens*. *J. Invert. Pathol.*, 15, 113-117, 1970.
- BABES, V. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *C R Acad. Sci.*, 107, 692-694, 1888.
- BUENING, G. M. & FIGUEROA, J. V. Use of polymerase chain reaction in bovine babesioses research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 791, 466-468, 1996.

- BURGDORFERR, W. Hemolymph teste. A technique for detection of rickettiose in ticks. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 19 (6), 1010-1014, 1970.
- BUSCHER, G. The infection of various ticks species with *Babesia bigemina*, its transmission and identification. *Parasitol. Res.*, 74, 324-330, 1988.
- CALLOW, L. L. The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. *Parasitology*, 58, 370-663, 1968.
- CALLOW, L.L. Some aspects of the epidemiology and control of bovine babesiosis in Austrália. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 50 (4), 353-356, 1979.
- CALLOW, L.L., EMMERSON, F.R., PARKER, R.J., KNOTT, S.G. Infection rates and outbreaks of diseases due to *Babesia argentina* in unvaccinated cattle on 5 beef proprieties in South-eastern. Queensland. *Aust. Vet. J.*, 52,446-450, 1976.
- CALLOW, L.L., HOYTE, H.M.D. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. and the tick, *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.*, 37, 381-390, 1961.
- CALLOW, E.W., MCGREGOR, W., PARKER, R.J., DALGLIESH, R.J. Immunity of cattle to *Babesia bigemina* following its elimination from the host, with observatinos an antibody levels detected by the indirect fluorescent antibody test. *Aust. Vet. J.*, 50, 12-15, 1974.

- CORRIER, D.R., GUZMAN, S. The effect of natural exposure to *Anaplasma* and *Babesia* infections on native calves in an endemic area of Colombia. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 9, 47-51, 1977.
- CRAWLEY, H. Stage of *Piroplasma bigemina* and *Margaropus annulatus*. *J. Parasitol.*, 2, 87-92, 1915.
- DALGLIESH, R.J.; STEWART, N.P. & DUNCALPE, F. Reducion in pathogenicity of *Babesia bovis* for its tick vetor *Boophilus microplus* after rapid blood passage in splenectomized calves. *Z. Parasitenkd*, 64, 347-351, 1981a.
- DALGLIESH, R.J.; STEWART, N.P. & RODWELL, B.J. Increased numbers of strahlenkorper in *Boophilus microplus* ticks ingesting a blood passage strain of *Babesia bigemina*. *Rev. Vet. Sci.*, 31, 350-352, 1981b.
- DALLWITZ, M.J.; YOUNG, A.S.; MAHONEY, D.F. & SUTHERST, R.W. Comparative epidemiology of tick-borne diseases of cattle with emphasis on modelling. *Int. J. Parasitol.*, 17, 629-6370, 1987.
- DAVEY, R.B. Effects of *Babesia bovis* on the ovipositional success of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 74, 331-333, 1981.
- d'OLIVEIRA, C., WEIDE, M., HABELA, M.A., JACQUIET, P., JONGEJAN, F. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2665-2669, 1995.
- d'OLIVEIRA, C., WEIDE, M., JACQUIET, P., JONGEJAN, F. Detection of *Theileria annulata* by the PCR in ticks (Acari: Ixodidae) collected from cattle in Mauritània. *Experimental & Applied Acarology*, 21, 279-291, 1997.
-

EL ALLAWY, T.A. Detection of piroplasmae in the tick vector haemolymph and eggs smears of tick with special reference to the effect of inoculation time on infectivity of tick eggs. *Agric. Res. Ver.*, 55, 9-13,1977.

FAO Yearbook Annuaire, 1998, 52, FAO. Rome. 186 – Cattle, 1998.

FAHRIMAL, Y.; GOFF, W.L. & JASMER, D.P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J. Clin. Microbiol.* June, 1374-1379, 1992.

FARIAS, N.A.R. *Efeito diferencial de Babesia bovis (Babés, 1888) e Babesia bigemina (Smith; Kilbourne, 1893) sobre a capacidade reprodutiva do vetor Boophilus microplus (Canestrini, 1887).* Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. 1994. 124 p. (Tese de Doutorado).

FIGUEROA, J.V. In: ICTTD Concerted Action Project Workshop on PCR-Based Detection and identification of Pathogens in Tropical Ticks. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, The Netherlands, 18-22, 1997.

FIGUEROA, J.V.; ALVAREZ, J.A.; CANTO, G.J.; RAMOS, J.A.; MOSQUEDA, J.J. & BUENING, G.M. Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 791, 117-127, 1996.

FIGUEROA, J.V. & BUENING, G.M. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. *Vet. Parasitol.*, 75, 75-92, 1995.

-
- FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S. & BUENING, G.M. Detection of *Babesia bigemina* - infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.*, Oct., 2576-2582, 1992.
- 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.*, 50, 69-81, 1993.
- FIGUEROA, J.V., CHIEVES, L.P., JOHNSON, G.S., GOFF, W.L., BUENNING, G.M. Polymerase chain reaction-based diagnostic assay to detect cattle chronically infected with *Babesia bovis*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 36,47-55, 1994.
- FLETCHER, R.H. & FLETCHER, S.W. **Epidemiologia Clínica**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1989, 312p.
- FORERO, S.H., VERGEL, B.N., CARDONA, H., VISCINO, G.O. Observación de vermículos de *Babesia* spp. en hemolinfas y huevos de *Boophilus microplus*. *Rev. Acoves*,10, 4-9, 1986.
- FRIEDHOFF, K.T. Interaction between parasite and tick vector. *Intern. J. Parasitol.* 20, 525-535, 1990.
- FRIEDHOFF, K. T. Morfology and development of *Babesia* species from domestic animals: A review. In: *Congresso Brasileiro de Parasitologia*, 7., Porto Alegre, 20, 1982.
- FRIEDHOFF, K.T., BUSCHER, G. Rediscovery of koch's strahlenkorper of *Babesia bigemina*. *Z. Parasitenk.*, 50, 345-347, 1976.
-

- FRIEDHOFF, K. T. & SMITH, R. D. Transmission of *Babesia* by ticks. In: *RISTC, M; KREIER, J.P. Babesioses. New York, Academic Press, Inc., Cap. 9, 267-321, 1981.*
- GAIDO, A.B., GUGLIELMONE, A.A. Infection dynamics of *Babesia* spp. Kinetes in naturally infected, engorged, female *Boophilus microplus*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 89,3,309-311,1995.
- GONZALES, J.C.; SILVA, N.R. & WAGNER, E.M. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (CAN. 1887) em bovinos estabulados. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 2, 1, 25-34, 1974.
- GUGLIELMONE, A.A.. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.*, 57, 109-119, 1995.
- GUGLIELMONE, A.A.; GAIDO, A.B.; AGUIRRE, D.H. & CAFRUNE, M.M. Some quantitative aspects of natural babesial infection in the haemolymph of *Boophilus microplus* engorged female ticks. *Parasite*, 4, 337-341, 1997.
- GUGLIELMONE, A.A.; GAIDO, A.B.; MANGOLD, A.J. Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. *Vet. Parasitol.*, 61, 15-20, 1996.
- GUGLIELMONE, A.A.; GAIDO, A.B.; MANGOLD, A.J. AGUIRRE, D.H. El diagnóstico de micro-organismos en la hemolinfa de la garrapata *Boophilus microplus* y su aplicación en la epizootiología de la babesiosis bovina. *Mem. 3rd. Reunión Asoc. Arg. Vet. Lab. Diag. Balcarce*, 18-19, 1988.
-

- GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J. AGUIRRE, D.H.; GAIDO, A.B.; De OLSEN, A.A. The effect of infection by *Babesia* sp. on the some biological parametres of engorged females of *Boophilus microplus*. *Folia Parasitol.*, 36, 1-6, 1989.
- GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; BERMUDEZ, A. C. & HADANI, A. - Detection de merozoitos grandes (vermículos) de *Babesia* en teleoginas de *Boophilus microplus* alimentadas sobre terneros com distintos niveles de parasitemia de *Babesia* y *Babesia bovis* (= *B. argentina*). *Rev. Iber. Parasitol.*, 45, 303-311, 1985.
- HOELZLE, L.E., ADEL, D. HOELZLE, K., HEINRITZI, K., WITTENBRINK, M.M. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. *Veterinary Microbiology*, 93, 185-196, 2003.
- HOFFMANN, G. Infizierbarkeit verschiedener Boophilusstämme mit *Babesia bigemina* sowie beeinflussung der zecken durch wirt oder parasit. *Zeltschrfft für Tropenmedizin und Parasitologie*, v.22, p. 270-284, 1971.
- JOHNSTON, L.A.Y. Epidemiology of bovine babesiosis in Northern Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 43, 427-432, 1967.
- JOHNSTON, L.A.Y., LEATCH, G., JONES, P.N. The duration of latent infection and functional immunity in Droughtmaster and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. *Aust. Vet. J.* 54, 14-18, 1978.

- KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. Babesiosis of domestic animals and man. *Boca Raton, Florida*. Press, Inc., Capítulo 1, 1-22, 1988.
- KESSLER, R.H., MADRUGA, C.R., SHENCK, M.A.M., RIBEIRO, O.C. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babes, 1888, Starcovici, 1983) em bezerros do estado do Mato Grosso do Sul. *Pesq. Agrop. Bras.*, 22, 1225-1230, 1983.
- KOCH, R. Beitrag zur entwicklungsgerchichte der piroplasmen. *Z. Hyg. Infekt. Kr.*, 54, 1-9, 1906.
- LAL, A.A., PATTERSON, P.S., SACCI, J.B., VAUGHAN, J.A., COLLINS, W.E., WIRTZ, R.A., AZAD, A.B. Anti-mosquito midgut antibodies block development of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in multiple species of *Anopheles* mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 5228-5233, 2001.
- LIMA, W.S., RIBEIRO, M.F.B., GUIMARÃES, M.P. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Tropic. Anim. Health Prod.* 32, 375-380, 2000.
- McCOSKER, P.J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M. & KRIER, P.J. **Babesiosis**. *Academic Press*, New York. P. 1-24, 1981.
- MACKENSTEDT, U., GAUER, M., FUCHS, P., ZAPF, F., SCHEIN, E., MEHLHORN, H. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitol. Res.* 81, 595-604, 1995.
-

- MADRUGA, C.R., HONER, M.R., SCHENK, M.A.M., CURVO, J.B.E. Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da tristeza parasitária bovina no Mato Grosso do Sul. Campo Grande, EMBRAPA-CNPGC, 1987. 7p. (EMBRAPA-CNPGC. Pesquisa em andamento, 38).
- MAGALHÃES, F.E.P. *Aspectos biológicos, ecológicos e de controle do Boophilus microplus (Canestrini, 1887) no Município de Pedro Leopoldo, MG.* Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 1989. 115 p. (Tese de Doutorado em Parasitologia).
- MAHONEY, D. F. Bovine babesiosis: an assessment of the significance of complement fixing antibody based experimental infection. *Aust. Vet. J.*, 40, 369-375, 1964.
- MAHONEY, D.F. Bovine babesiosis: a study of factors concerned in transmission. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 63, 1-14, 1969.
- MAHONEY, D.F. *Babesia* of domestic animals. In: Kreier, J.P. (ed) *Parasitic Protozoa.* Academic Press, San Diego, 1-52, 1979.
- MAHONEY, D. F. & MIRRE, G.B. Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the vetor *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 65, 309-317, 1971.
- MAHONEY, D. F. & ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.*, 48, 292-298, 1972.
- MAHONEY, D.F., WRIGHT, I.G., MIRRE, G.B., 1973. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* in calves
-

(*Bos taurus*) after naturally acquired infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 67, 197-203, 1973.

MAHONEY, D.F., WRIGHT, E.G., GOODGER, B.V. Immunity in cattle to *Babesia bovis* after single infection with parasites of various origin. *Aust. Vet. J.*, 55, 10-12, 1979.

MATTHEWSON, M.D. The future tick control: A review of the chemical and non-chemical options. Impact of disease on livestock production in the tropics. Ed. by P. Ricmann and M.J. Burridge, *Elsevier Science*, 559-567, 1984.

MELHORN, H. & SCHEIN, E. The piroplasma: cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.*, 23, 37-103, 1984.

MELENDEZ, R.D., FORLANO, M. Incidence and intensity of *Babesia* spp. Sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* from a dairy herd in Venezuela. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 791, 148-156, 1996.

MORZARIA, S.P., BROCKLESBY, D.V. A differential diagnostic criterion for *Babesia major* and *Babesia bigemina* vermicules from tick haemolymph. *Z. Parasitenk.*, 52, 241-243, 1977.

MORZARIA, S.P., BLAND, P., BROCKLESBY, D.W. Ultrastructure of *Babesia major* in the tick *Haemaphysalis punctata*. *Research in Veterinary Science*, 21, 1-11, 1976.

MURATOV, E.A., KHEISIN, E.M. The development of *Piroplasma bigeminum* in the tick *Boophilus microplus*. *Zool. Zh.* 38, 970-986, 1959.

- OLIVEIRA, M.C.S. Avaliação da taxa de infecção por *Babesia bigemina* em bovinos mestiços leiteiros e em fêmeas e ovos de *Boophilus microplus* provenientes de área endêmica do estado de São Paulo. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002. 96 p. (Tese, Doutorado).
- PERSING, D.H. Polymerase Chain Reactin: Trench to Benches. *Journal of Clinical Microbiology*, 1281-1285, 1991.
- PERSING, D.H., MATHIESEN, D., MARSHALL, W.F., TELFORD, S.R., SPIELMAN, A., THOMFORD, J.W., CONRAD, P.A. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 2097-2103, 1992.
- PETER, T.F., DEEM, S.L., ARBET, A.F., NORVAL, R.A.I., SIMBI, B.H., KELLY, P.J., MAHAN, S.M. Development and evaluation of PCR assay for detection of low levels of *Cowdria ruminantium* infection in *Anaplasma* ticks not detected by DNA probe. *J. Clin. Microbiol.* Jan., 166-172, 1995.
- RIBEIRO, M.F.B., PATARROYO, J.H.S. Ultrastructure of *Babesia bigemina* gametes obtained in "in vitro" erythrocyte cultures. *Vet. Parasitol.*, 76, 19-25, 1998.
- RIEK, R. F. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Aust. Vet. Agr. Res.*, 16, 802-821, 1964.
- RIEK, R. F. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Aust. J. Agric. Res.*, 17, 247-254, 1966.
-

- ROSENBUSCH, F. Estudios sobre la tristeza; evolution del *Piroplasma bigemina* en la garrapata (*Boophilus microplus* Can.). *Rev. Univ. B. Aires*, 5, 862-867,1927.
- SAMBROOCK, J.; FRITCHES, E.F. & MANIATIS, T. Molecular cloning. A Laboratory Manual, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Press Cold Spring Harbor, NY, 6-15, 9-31,1989.
- SANTOS, F.R., PENA, S.D.J. & EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.*, 90, 655-656, 1993.
- SCHWARTZ, I.; VARDE, S.; NADELMEN, R.B.; WORMSER, G.P. & FISH, D. - Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56, 3, 339-342, 1997.
- SILVA, M.G.Q., RIBEIRO, M.F.B., RANGEL, F.F. Freqüência da infecção de *Boophilus microplus* por *Babesia* sp. no município de Pedro Leopoldo, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 16, 1999, Poços de Caldas. **Anais ...** Poços de Caldas: CBPV, p.57, 1999.
- SMEENK, I; KELLY, P.J.; WRAY,K.; MUSUKA, G.; TRESS, 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. Ass.*, 71, 1, 21-24, 2000.

- SMITH, E. & KILBORNE, F.L. Investigations into the nature causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. *USDA Bur. Anim. Ind. Bull.*, 1, 7-269, 1893.
- STEWART, N.P. Differences in the cycle between a vaccine strain and an unmodified strain of *Babesia bovis* (Babes, 1888) in the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *J. Protozool.*, 25, 497-501, 1978.
- STEWART, N.P., DALGLIESH, R.J. Life cycles of the cattle tick and tick fever parasites. *Queens. Agric.* 107, 305-308, 1981.
- STEWART, N.P., DALGLIESH, R.J., DE VOS, A.J. Effect of different methods of maintenance on the development and morphology of *Babesia bigemina* in the gut of *Boophilus microplus*. *Res. Vet. Sci.*, 40, 94-98, 1986.
- STICH, R.W.; BANTLE, J.A.; KOCAN, K.M. & FEKETE, A. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) Bin Hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction. *J. Med. Entomol.*, 30, 4, 781-788, 1993.
- SUAREZ, C.E., PALMER, G.H., JASMER, D.P., HINES, S.A., PERRYMAN, L.E., McELWAIN, T.F. Characterization of the gene encoding a 60-Kilodalton epitopes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 43, 45-52, 1991.
- SYVANEN, A.C., BENGTSTROM, M., TENHUNEN, J., SODERLUND, H. Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection. *Nucleic Acids Res.* 16, 11327-11338, 1988.
- WATT, D.; SPARAGANO, O.; BROWN, C.G.D. & WALKER, A.R. - Use of polymerase chain reaction for identification and quantification of *Theileria*
-

parva protozoa in *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasitol. Res.*, 83, 359-363, 1997.

YOUNG, A.S., MORZARIA, S.P. Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*, 2, 8, 211-218, 1986.

ANEXO 1

Tabela 1– Frequência mensal de teleóginas positivas colhidas de bezerras e mantidas em BOD no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

BEZ / BOD	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F
Total de teleóginas	64	47	46	48	48	48	71	48	44	29	10	48	21	47	10	48	47	64	48	31	30	27	36	23
Teleóginas +	05	14	08	07	10	06	09	04	11	03	05	07	03	06	0	09	12	20	09	05	12	05	02	0
%	7,8	29,8	17,4	14,6	20,8	12,5	12,7	8,3	25,0	10,3	50,0	14,6	14,3	12,8	0	18,7	25,5	31,3	18,8	16,1	40,0	18,5	5,6	0

Tabela 2– Frequência mensal de teleóginas positivas colhidas de bezerras e mantidas em temperatura ambiente no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

BEZ / AMB	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F
Total de teleóginas	51	47	41	48	48	48	63	39	20	25	0	47	0	47	0	41	46	24	20	24	06	19	21	0
Teleóginas +	02	06	04	03	09	06	04	01	02	01	0	12	0	8	0	01	01	01	03	01	04	04	04	0
%	3,9	12,8	9,8	6,3	18,8	12,5	6,3	2,6	10,0	4,0	0	25,5	0	17,0	0	2,3	2,2	4,2	15,0	4,2	66,7	21,1	19,0	0

ANEXO 2

Tabela 3 – Frequência mensal de teleóginas positivas colhidas de vacas e mantidas em BOD no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

Vacas / BOD	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	J	A	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F
Total de teleóginas	63	47	46	47	48	44	72	48	22	30	48	36	43	48	47	48	48	48	58	47	48	47	47	67	24
Teleóginas +	0	0	0	02	0	03	01	09	0	01	05	0	09	0	0	0	0	01	02	0	0	02	0	03	02
%	0	0	0	4,3	0	6,8	1,4	18,8	0	3,3	10,4	0	20,9	0	0	0	2,1	3,4	0	0	4,3	0	4,5	8,3	

Tabela 4 – Frequência mensal de teleóginas positivas colhidas de vacas e mantidas em temperatura ambiente no período de março de 1999 a fevereiro de 2001, Pedro Leopoldo, MG.

Vacas / AMB	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F
Total de teleóginas	61	42	36	47	40	21	72	47	18	48	48	36	22	24	24	24	48	48	48	48	28	24	39	37	48	24
Teleóginas +	0	0	0	0	0	0	02	0	0	0	06	0	11	0	0	0	01	0	0	0	0	0	02	01	11	16
%	0	0	0	0	0	0	2,8	0	0	0	12,5	0	50,0	0	0	0	2,1	0	0	0	0	0	5,1	2,7	22,9	66,7

Nota - As colheitas foram realizadas a cada 14 dias, portanto, cada valor mensal representa a soma de duas colheitas, exceto nos meses de março e setembro de 1999, março e agosto de 2000 e janeiro de 2001, nos quais foram realizadas 3 colheitas. No dia 11/11/1999 não foram colhidas teleóginas de vacas e no dia 02/03/2000 não foram colhidas teleóginas de vacas nem de bezerras,

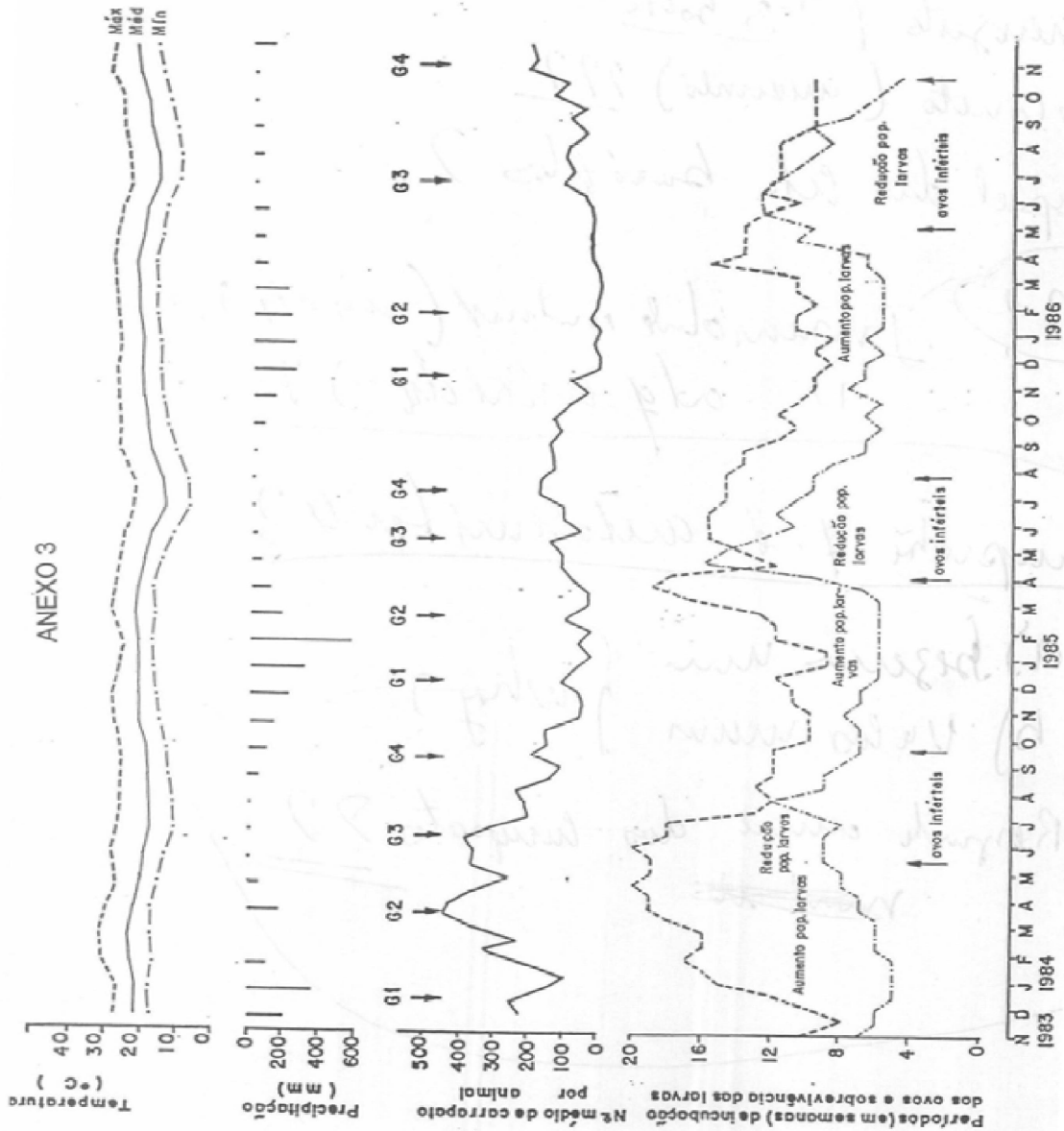


FIGURA 22 - Evolução da fase parasitária, do período de incubação dos ovos e da sobrevivência de larvas do *B. microplus*, durante três anos de observação, no município de Pedro Leopoldo-MG, de novembro de 1983 a novembro de 1986