

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

**IMUNIDADE HUMORAL AOS AGENTES DA BABESIOSE
DURANTE O SEGUNDO ANO DE VIDA DE BOVINOS EM ÁREA
MARGINAL AO VETOR *Boophilus microplus***

REGINA CELIS PEREIRA REINIGER

PELOTAS, 2008

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

R372i Reiniger, Regina Celis Pereira

Imunidade humoral aos agentes da babesiose durante o segundo ano de vida de bovinos em área marginal ao vetor *Boophilus microplus* / Regina Celis Pereira Reiniger ; orientador Nara Amélia da Rosa Farias ; co-orientador Ana Maria Sastre Sacco, Magda Vieira Benavides. – Pelotas, 2008. – 56f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2008.

1.Parasitologia. 2.*Babesia bovis*. 3.*Babesia bigemina*.
4.Anticorpos. 5.Epidemiologia. 6.*Boophilus microplus*.
I.Farias, Nara Amélia da Rosa. II.Sacco, Ana Maria Sastre.
III.Benavides, Magda Vieira. IV.Título.

CDD: 636.2089

Regina Celis Pereira Reiniger

**IMUNIDADE HUMORAL AOS AGENTES DA BABESIOSE
DURANTE O SEGUNDO ANO DE VIDA DE BOVINOS EM ÁREA
MARGINAL AO VETOR *Boophilus microplus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Parasitologia).

Orientador (a): Prof^a Dr^a Nara Amélia da Rosa Farias

Co-Orientador (a): Dr^a Ana Maria Sastre Sacco

Co-Orientador (a): Dr^a Magda Vieira Benavides

Pelotas, 2008

Dedico este trabalho ao meu esposo,
Cezar Augusto, a meus filhos, Ana
Paula e Rodrigo e minha mãe Gleci,
como forma de agradecimento pelo
amor, incentivo e compreensão nesta
caminhada.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso de Pós-Graduação.

À Embrapa Pecuária Sul, pela disponibilidade para o desenvolvimento dos experimentos.

À Prof^a Dr^a Nara Amélia da Rosa Farias, pela amizade, ensinamentos, dedicação e orientação durante este estudo.

À Dr^a Ana Maria Sastre Sacco e Dr^a Magda Benavides, pela amizade, confiança, incentivo e pelo exemplo de profissionalismo e orientação deste trabalho.

A todos os professores do curso de Pós Graduação em Parasitologia pela seriedade e aos ensinamentos transmitidos, e em especial ao Prof. Dr. Telmo Vidor e Prof. Dr. Fabio Leivas Leite pelos ensinamentos de Imunologia que muito contribuíram para minha formação. A Prof^a Dr^a Maria Elizabeth Aires Berne pela confiança e indicação dos caminhos corretos que deveria seguir.

À equipe do Laboratório de Hemoparasitologia da Embrapa Pecuária Sul, ao técnico Bernardo Macke Franck, as bolsistas Gizele Lima de Sá e Diene de Borba Pacheco, pelo auxílio, amizade e companheirismo.

Aos colegas de mestrado, em especial a Charlene Nascimento dos Santos Trindade, Sabrina Rodrigues Quadro de Freitas e Beatriz Gonzáles Cademartori, pela amizade incondicional que muito contribuiu para que os momentos se fizessem alegres de tudo.

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Biologia da UFPel, Niltinho e Felipe, que sempre mostraram-se disponíveis para elucidar qualquer dúvida e ajudar no que fosse preciso.

Ao Diretor do Centro de Ciências Rurais da Urcamp, Professor Derli João Siqueira, e o Coordenador do Curso de Medicina Veterinária, Professor José Carlos Lucena da Rosa, pelo apoio e incentivo. E não poderia esquecer de agradecer a todos os meus alunos, que de forma direta ou indiretamente, me instigaram a buscar novos conhecimentos.

A minha amiga colega de trabalho, companheira de idas e vindas do campus rural, Ana Luiza Risch que sempre me incentivou, apoiou e acreditou que esse sonho era possível. Aos colegas de trabalho, Marco Antônio Blota da Fonseca e Luciano Fagundes Avancini, profissionais que vibram quando falam em carrapatos e moscas ou nematódeos e trematódeos, e que sem dúvida muito contribuíram nesta conquista.

A equipe de estagiários do Laboratório de Histologia: Ana Claudia Bamberg, Ana Claudia do Couto, Carla Marques, Gabriele Guarenti, Josiane Ayres, Luciano Santos, Roger Martins e Valquiria Freire pelo auxílio em todos os momentos desta caminhada.

A colega Luciane Suñe, pelo início de tudo, onde suas dicas preciosas levaram-me a achar o caminho. Nossas viagens para disciplina de Entomologia ficarão na lembrança pra toda a vida.

Aos meus três irmãos Marcus e “quase irmã” Ana Lucia, meus tios Alfeu e Gelni juntamente com meu primo Mauro, pelo apoio, incentivo e a confiança que sempre depositaram nessa jornada.

A Deus por ter me oferecido a chance de crescer não só profissionalmente ----- espiritualmente.

*"Nunca encontrei uma pessoa da qual não
tivesse nada a aprender".*

(A. de Vigny)

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Prof. Dr. Jerônimo Ruas

Dr. João Ricardo Martins

Prof^a Dr^a Nara Amélia da Rosa Farias
(Orientadora)

RESUMO

REINIGER, Regina Celis Pereira. **Imunidade humoral aos agentes da babesiose durante o segundo ano de vida de bovinos em área marginal ao vetor *Boophilus microplus***. 2008. 55 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Avaliou-se, através da reação de imunofluorescência indireta, a presença de imunoglobulinas (classe IgG) anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* no soro de 31 bovinos de um rebanho de corte naturalmente infectado, dos 13 aos 24 meses de vida, em uma propriedade localizada ao sul do Rio Grande do Sul. As coletas mensais de sangue foram acompanhadas de observação da presença do *Boophilus microplus*, bem como de dados climatológicos durante o ano do experimento. A temperatura e a umidade relativa do ar mantiveram-se superiores às normais ao longo do ano, favorecendo a constância do carrapato no rebanho. A sorologia revelou que 100% dos bovinos mantiveram-se positivos para *B. bigemina* durante todo o período experimental, enquanto para *B. bovis*, esse índice só foi obtido a partir dos 17 meses de idade, após a infestação pela terceira geração de carrapatos (outono). Isso revela que foi mantida a situação de estabilidade enzoótica na propriedade, constatada durante o primeiro ano de vida destes animais, o que é atípico para região. Os bovinos mantiveram títulos de anticorpos significativamente inferiores aos observados durante o seu primeiro ano de vida, tanto para *B. bovis* ($P=0,0002$) como para *B. bigemina* ($P<0,0001$). A titulação de anticorpos para *B. bigemina* foi significativamente ($P=0,0001$) superior à verificada para *B. bovis*. Os resultados obtidos revelam a existência de situação de estabilidade enzoótica em uma área de instabilidade enzoótica para a babesiose bovina, e fornece subsídios para o entendimento da maior frequência de casos clínicos causados por *B. bovis* na região.

Palavras chaves: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, anticorpos, epidemiologia, imunofluorescência indireta.

ABSTRACT

REINIGER, Regina Celis Pereira. **Humoral immunity to cattle babesiosis-causing pathogens during the second year of life of cattle maintained in marginal areas for *Boophilus microplus*** 2008. 55 f. Thesis (Master of Science in Parasitology) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

The presence of anti-*Babesia bovis* and anti-*B. bigemina* immunoglobulins (IgG class) were evaluated, by indirect fluorescent antibody test, in bovine sera from a naturally tick-infected beef cattle herd. Samples were collected from 31 heifers, from 13 to 24 months of age, from a farm located South of Rio Grande do Sul, Brazil. Blood samples were monthly collected followed by observing the presence of *Boophilus microplus* ticks in cattle. Climatic data were also observation. Mean temperature and relative humidity showed to be higher than their climate normal (1971-2000), allowing constant tick infestations throughout the year. Serologic tests showed that 100% of the animals remained positive for *B. bigemina* during the experimental period. For *B. bovis*, however, this condition was only reached from 17 months of age onwards, after the classical third tick generation infestation (autumn). These results showed that the enzootic stability was maintained in this farm, as observed earlier when these same animals were monitored in their first year of age. This epidemiological condition being unusual for this region. The experimental animals showed lower anti-*B. bovis* ($P=0,0002$) and anti-*B. bigemina* ($P<0,0001$) specific-immunoglobulins when compared to their first year averages. Anti-*B. bigemina* specific-immunoglobulins were significantly higher than anti-*B. bovis* specific-immunoglobulins ($P=0,0001$). These results reveal a situation of enzootic stability in geographical areas early described as of enzootic instability for cattle babesiosis, and provide information to better understand the high frequency of *B. bovis* outbreaks in this region.

Key-words: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, epidemiology, antibodies, indirect fluorescent antibody test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Percentual de animais infestados por <i>Boophilus microplus</i> ao longo do ano (dezembro 2000 a novembro 2001).....	35
Figura 2 -	Normais climatológicas de (a) temperaturas médias, mínimas, máximas, (b) umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica na região sul do Rio Grande do Sul no período de 1971 a 2000, comparadas com as médias mensais observadas em 2001.....	37
Figura 3 -	Frequência mensal de bovinos soropositivos para <i>Babesia bovis</i> , durante o segundo ano de vida (2000/20001).....	39
Figura 4 -	Variações dos títulos de anticorpos (Imunofluorescência Indireta) anti- <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i> dos 7 aos 24 meses de idade, em bovinos naturalmente infectados (2000/2001).....	40
Figura 5 -	Variações mensais dos títulos de anticorpos (após transformação logarítmica) anti- <i>B. bovis</i> pela técnica de imunofluorescência em bovinos naturalmente infectados, na faixa etária de 7 aos 24 meses.....	42
Figura 6 -	Variações mensais dos títulos de anticorpos (após transformação logarítmica) anti- <i>B. bigemina</i> pela técnica de imunofluorescência em bovinos naturalmente infectados, na faixa etária de 7 aos 24 meses.....	42
Figura 7 -	Variação mensal da titulação de anticorpos anti- <i>Babesia bovis</i> pela técnica de imunofluorescência de quatro animais cuja soroconversão foi mais tardia, no período de 24 meses. Dados dos 12 primeiros meses segundo Krolow (2002).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação mensal da média do hematócrito de bovinos durante o segundo ano de vida, nascidos em 2000.....	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA	Etilenodiaminocetato
ELISA	Ensaio imuno enzimático
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
NK	Células matadoras naturais
PBS	Tampão Fosfato-Salino
RS	Rio Grande do Sul
TPB	Tristeza Parasitária Bovina
TCR	Teste de Conglutinação rápida
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
μ	Mícron

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	15
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 – Agente etiológico.....	18
2.2 – Ciclo biológico.....	19
2.3 – Transmissão.....	20
2.4 – Patogenia.....	20
2.5 – Sinais clínicos.....	22
2.6 – Imunidade.....	23
2.7 – Diagnóstico.....	25
2.7.1 – Sorologia – Imunofluorescência Indireta (IFI).....	26
2.8 – Epidemiologia.....	27
2.8.1 – Prevalência de babesiose bovina.....	29
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 – Material.....	31
3.2 – Coleta e análise de amostras.....	31
3.2.1 – Dados da infestação por <i>Boophilus microplus</i>	32
3.2.2 – Sorologia – Imunofluorescência Indireta (IFI).....	32
3.2.3 – Hematócrito.....	33
3.3 – Dados climatológicos.....	33
3.4 – Análise Estatística.....	33
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 – Presença de <i>Boophilus microplus</i>	35

4.2 – Dados climatológicos.....	36
4.3 – Hematócrito.....	36
4.4 – Sorologia – Imunofluorescência Indireta (IFI).....	38
5 – CONCLUSÕES.....	44
6 – REFERÊNCIAS	45
ANEXO.....	55

INTRODUÇÃO

A babesiose bovina no Brasil é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* sendo uma das doenças que fazem parte do complexo Tristeza Parasitária Bovina. Esses agentes são parasitos intraeritrocitários do hospedeiro causando destruição das células na corrente circulatória e levando o animal a uma anemia intensa (MAHONEY, 1977).

Na América do Sul a babesiose é transmitida exclusivamente pelo carrapato *Boophilus microplus*, sendo um dos problemas sanitários de maior impacto econômico para a bovinocultura devido aos altos índices de morbidade e mortalidade. Além dos custos para combater esses parasitos, existem as perdas produtivas, pois os animais apresentam diminuição na produção de leite e carne e problemas reprodutivos, como aborto e diminuição da fertilidade (MARTINS, 2005).

Como o vetor dos agentes dessa enfermidade é o carrapato, sua presença, constância e permanência determinam o aparecimento ou não da doença (MAHONEY e ROSS, 1972). Esse ixodídeo apresenta uma ampla distribuição geográfica, encontrando condições favoráveis de desenvolvimento entre os paralelos 32°N e 32°S, e quanto mais próximo desses limites menor são suas condições de desenvolvimento e sobrevivência, o que acontece no extremo sul do Estado do Rio Grande do Sul, parte sul do Uruguai, Argentina e outros países que se encontram entre os paralelos citados (GUGLIELMONE, 1995).

Nas regiões onde os bovinos são naturalmente parasitados pelo carrapato desde o nascimento, há uma inoculação natural e gradual dos hemoparasitos, o que possibilita a esses bovinos o desenvolvimento da imunidade aos agentes causadores

da babesiose (BROWN et al., 2006b). Assim, nessas regiões, cria-se uma condição conhecida como de estabilidade enzoótica, ou seja, existem os agentes, mas é pouco provável que ocorra a doença. Entretanto, em regiões onde os bovinos não convivem com o carrapato constantemente desde o nascimento, a inoculação de hemoparasitos e o conseqüente desenvolvimento de imunidade ficam comprometidos. Nestas regiões, ocorre a condição conhecida como de instabilidade enzoótica, onde existem os agentes e é grande a possibilidade de que ocorram surtos da doença. Estes conceitos, assim como as condições para que determinadas regiões passem a ser caracterizadas como de estabilidade ou instabilidade, estão definidos em MAHONEY (1962) e MAHONEY & ROSS (1972), e a partir de então, exaustivamente descritos por vários autores.

O Rio Grande do Sul é considerado como área de instabilidade enzoótica, devido às estações climáticas serem bem definidas, e as baixas temperaturas não favorecerem o ciclo de vida livre do vetor (GONZALES, 2003). Nestas áreas são freqüentes os surtos da doença, sendo preciso estar atento ao problema para se fazer o diagnóstico e tratamento imediatos e corretos a fim de evitar ou minimizar as perdas. Entretanto, mais importante que controlar os surtos é adotar medidas que visem à profilaxia e o controle da doença.

Para a tomada de decisões e de ações neste sentido, é imprescindível que se tenha o diagnóstico epidemiológico do problema na região e mais especificamente, na propriedade (SACCO, 2002). Esse diagnóstico epidemiológico é baseado no conhecimento do clima, manejo da propriedade, animais e pastagens, intensidade e a freqüência da presença do carrapato vetor, raça dos animais, e principalmente, a presença de bovinos portadores sadios no rebanho. Portadores sadios são aqueles animais que abrigam o patógeno em seu organismo e não apresentam a doença; normalmente indicam a presença do agente no meio ambiente e são fontes de infecção.

A identificação de animais portadores sadios tem sido feita ao longo dos anos com a determinação da presença e a intensidade de anticorpos anti-*Babesia* no soro dos bovinos através de técnicas de imunodiagnóstico como, por exemplo, a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizada por muitos anos e ainda hoje como ferramenta importante para estudos de epidemiologia.

O objetivo do presente trabalho foi delinear a situação epidemiológica da babesiose durante o segundo ano de vida de bovinos de uma propriedade localizada em área marginal para o vetor *Boophilus microplus*. Para tanto, foram analisados mensalmente a titulação de anticorpos anti- *B. bovis* e anti-*B. bigemina*, a presença ou não do carrapato vetor e os dados climáticos da região ao longo do experimento, com posterior comparação com os dados referentes ao primeiro ano de vida dos animais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agente etiológico

Conforme Levine (1988) a babesiose é causada por parasitos do filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Piroplasmida, família Babesiidae, gênero *Babesia*, e as principais espécies causadoras da babesiose bovina são: *Babesia bovis* (BABÈS, 1888) e *Babesia bigemina* (SMITH & KILBORNE, 1893). Estas espécies são transmitidas pelos carrapatos *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887), sendo um dos fatores limitantes ao crescimento da bovinocultura mundial em áreas tropicais e subtropicais (YOUNG e MORZARIA, 1986; BROWN, 1997). Conforme Levine (1985), *Babesia* e babesiose ocorrem em muitas partes do mundo onde existem carrapatos.

Segundo Kuttler (1988), estas espécies de protozoários ocorrem juntas e com grande incidência entre latitudes 32ºN e 32ºS, sendo este o local de ocorrência do carrapato vetor. Nos carrapatos, estes protozoários são transmitidos por passagem transovariana, sendo o número de carrapatos no ambiente um importante fator determinante na incidência de babesiose (MAHONEY, 1969; GUGLIELMONE, 1995).

Babesia bovis (sinonímia: *B. argentina* e *B. berbera*) apresenta forma redonda (1 a 2,5µ) ou piriforme (2 a 2,5µ), podendo suas formas unidas orientarem-se em posições variadas dentro dos eritrócitos (SOLORIO-RIVERA e RODRÍGUEZ-VIVAS, 1997b). *Babesia bigemina* é mais larga e irregular e necessita ficar em ângulo agudo no interior da célula (MAHONEY, 1973), a forma piriforme mede em torno de 3 a 4µ de extensão por 0,8 a 1,2µ de largura (SOLORIO-RIVERA e RODRÍGUEZ-VIVAS, 1997a).

2.2 Ciclo biológico

Segundo Young e Morzaria (1986) e Friedhoff (1988), o ciclo das babesias se desenvolve da seguinte forma: a infecção do hospedeiro invertebrado ocorre devido este ingerir eritrócitos infectados com gametócitos. No estômago deixam os eritrócitos e atingem a luz do intestino. Diferenciam-se em corpos raiados, considerados gametas iniciando a gametogonia. Após dois a quatro dias, os gametas feminino e masculino se fundem e formam uma célula esférica chamada zigoto, que se transforma em uma célula chamada cineto primário ou oocineto. O início da esporogonia ocorre quando o oocineto invade as células epiteliais basófilas do intestino e inicia as divisões assexuadas, formando mais cinetos, que são liberados das células intestinais para a hemolinfa, invadindo os hemócitos e outros órgãos, até mesmo os ovários e oócitos. Nestas células o processo de divisão assexuada continua, produzindo os esporocinetos que invadem novas células e seguem se multiplicando durante o período de pré-postura e postura, até a teleógina morrer. Quando as larvas se fixam no hospedeiro vertebrado, ocorre novamente a esporogonia e os esporocinetos invadem as glândulas salivares sofrendo uma outra forma de reprodução assexuada, formando esporozoítos, sendo estes as formas infectantes para o bovino.

No hospedeiro vertebrado ocorre a merogonia: os esporozoítos inoculados, junto com a saliva, no momento que o vetor suga o sangue dos bovinos penetram nas hemácias e transformam-se em trofozoítos, sofrem divisão formando duas células chamadas de merozoítos (merogonia), que rompem as hemácias ao saírem. Os merozoítos invadem novas hemácias pelo seguinte processo: o merozoíto entra em contato com um novo eritrócito e segue a orientação do pólo apical deste merozoíto com a superfície do eritrócito, ocorrendo então a fusão das membranas e a liberação do conteúdo das roptrias do merozoíto e após a invaginação das membranas do eritrócito o merozoíto está dentro da célula. O merozoíto fica em um vacúolo parasitóforo e se diferencia em trofozoíto, rompe o vacúolo, ficando em contato direto com o citoplasma da hemácia. O trofozoíto apresenta uma única membrana, que permite o contato direto com o citoplasma da hemácia e por difusão e osmose, alimenta-se de substâncias do citoplasma (FARIAS, 1995). A divisão do trofozoíto ocorre por brotamento ou fissão binária, formando novamente as paredes internas e o

complexo apical, originando novos merozoítos ou gametócitos. Os merozoítos estão prontos para deixarem as hemácias, e ao saírem, provocam ruptura da célula vermelha (FARIAS, 1995). O carrapato, ao se alimentar no bovino, ingere os eritrócitos contendo os parasitos, e a partir dos gametócitos, há o recomeço do ciclo.

2.3 Transmissão

A transmissão de *B. bovis* e *B. bigemina* ocorre em diferentes estágios de vida do carrapato (MAHONEY e ROSS, 1972). *B. bigemina* é transmitida por ninfas e adultos (machos e fêmeas). Caso a infecção se torne patente no bovino haverá a reinfecção destes carrapatos através da alimentação das teleóginas (infecção alimentar). As teleóginas também poderão manter a infecção para a próxima geração de carrapatos caracterizando uma transmissão ou infecção vertical.

Segundo Freidhoff & Smith (1981) e Freidhoff (1988), o protozoário *B. bovis* é transmitido exclusivamente por larvas, e isso ocorre por estarem localizadas no tecido glandular, que sofre histólise total durante a muda para ninfa, levando estas a perderem a capacidade de infecção após ter ocorrido à transmissão. As teleóginas não possuem formas capazes de infectar seus ovos, apenas se o ingurgitamento destas teleóginas ocorrer em um hospedeiro infectado. Desta forma, a infecção da população de carrapatos é baseada somente na infecção alimentar da fêmea ingurgitada.

2.4 Patogenia

O processo patológico em babesiose está relacionado ao crescimento e multiplicação de *Babesia* dentro dos eritrócitos (MAHONEY, 1973).

Segundo Mahoney (1977), dois eventos ocorrem no hospedeiro parecendo ter um papel central na patogenia da babesiose: a destruição dos eritrócitos e o aumento de substâncias farmacologicamente ativas. A anemia ocorre pela destruição e/ou seqüestro dos eritrócitos pelo sistema reticulo endotelial, pois a adesão do protozoário à superfície dos mesmos provoca um reconhecimento de corpo estranho. Segundo BROWN et al. (2006a) as hemácias parasitadas expõem na superfície de sua membrana antígenos que auxiliam a fagocitose e ativação do sistema imune.

O hematozoário *B. bigemina* comumente causa alta parasitemia resultando em anemia hemolítica e hemoglobinúria (YOUNG e MORZARIA, 1986). O principal efeito patogênico de *B. bigemina* é a hemólise resultante da multiplicação dos parasitos e da sua saída para parasitar novas células. No início esta lise é diretamente proporcional a parasitemia, sendo que com o agravamento da doença, mesmo eritrócitos não parasitados passam a ter maior fragilidade osmótica (WRIGHT, 1981).

O protozoário *B. bovis* secreta um poderoso ativador de calicreína, enzima sérica existente em forma precursora não ativada, que quando ativada converte cininogênio em cinina que é um poderoso vasodilatador (MAHONEY et al., 1979). A liberação de substâncias farmacologicamente ativas com a ativação dos sistemas de complemento, da cinina, fatores de coagulação e da fibrinólise, provoca vasodilatação, aumento da permeabilidade dos vasos sangüíneos, levando a obstrução da circulação local (WRIGHT et al., 1989; BOCK et al., 2004).

Conforme Wright e Goodger (1988), a síndrome do choque hipotensivo que ocorre na infecção aguda por *B. bovis* é caracterizada por baixo número de parasitas circulantes, mas com alta percentagem de eritrócitos parasitados nos capilares do cérebro, músculos e rins. Durante a infecção por *B. bovis*, a calicreína plasmática é ativada logo após os parasitos começarem a multiplicação no sangue, antes da destruição dos eritrócitos começar a aparecer.

Wright et al. (1989) citam que *B. bovis* tem como característica principal o seqüestro de eritrócitos parasitados no leito dos capilares, principalmente do cérebro. Os capilares cerebrais são ocupados por eritrócitos infectados que se agrupam uns aos outros e também no endotélio (BOCK et al., 2004). A membrana dos eritrócitos infectados apresenta uma maior rigidez com dificuldade em percorrer capilares estreitos o que somado a alterações nos componentes plasmáticos, tais como fibrina solúvel, leva a uma diminuição do fluxo no sistema microvascular, culminando na estase total e oclusão dos pequenos vasos (COMMINS et al., 1988).

Mudanças macroscópicas encontradas em lesões pós-morte em bovinos infectados por *B. bovis* nos pulmões, coração e mucosa do abomaso, descritas por Patarroyo et al. (1982), são comparadas às lesões descritas na síndrome do choque anafilático, sugerindo que a morte é devido ao choque.

A patogenia é maior nos animais adultos que comumente são levados a óbito. Os animais mais jovens são mais resistentes (LEVINE, 1985; ZINTL et al., 2005). Conforme Soares et al. (2000), babesias desencadeiam anemia, principalmente, pela destruição eritrocítica decorrente dos aspectos biológicos dos agentes em realizarem parte de seu ciclo no interior destas células.

Conforme Mahoney et al. (1979), a destruição de eritrócitos geralmente é maior do que atribuído à saída dos parasitos destas células, sendo que *B. bigemina* aumenta a fragilidade osmótica dos eritrócitos em geral e *B. bovis* aumenta a fragilidade dos eritrócitos não parasitados, provocando hemólise. Também ocorre um aumento indiscriminado de fagocitose (MAHONEY, 1973).

2.5 Sinais Clínicos

Há grande variação nos sinais clínicos devido a diferença de patogenicidade entre as espécies e mesmo entre cepas da mesma espécie. A susceptibilidade do hospedeiro pode estar alterada pela idade, raça e anticorpos colostrais (MAHONEY et al., 1979). Benavides e Sacco (2007) citam que as características genéticas também provocam variações nos sinais clínicos, onde dentro de um grupo homogêneo de animais desafiados com *B. bovis* constatou-se três diferentes fenótipos: animais suscetíveis, intermediários e resistentes. As respostas individuais irão ocasionar maior ou menor intensidade aos sinais clínicos característicos da doença.

As manifestações clínicas começam quando o parasito se torna detectável no esfregaço sanguíneo (MAHONEY et al., 1973). Segundo Donnelly (1973), Mahoney (1994) e Zintl et al. (2005), a doença é caracterizada por febre e hemoglobinúria. A febre está associada ao aparecimento do parasito na corrente circulatória e é o primeiro sinal clínico da enfermidade (MAHONEY, 1977; SOLORIO-RIVERA, 1997). Do 8° ao 15° dia após a infecção por *B. bigemina*, os bovinos apresentam intensa parasitemia e a destruição dos eritrócitos é responsável pela anemia hemolítica e hemoglobinúria (YOUNG e MORZARIA, 1986). Segundo Levine (1985) os animais tornam-se apáticos, comem menos e ocorre parada da ruminação, ficando magros e ictéricos. As fezes apresentam coloração marrom amarelada e a anemia severa é causada pela invasão e destruição dos eritrócitos, onde até 75% das células podem ser

destruídas. A morte pode ocorrer em quatro a oito dias nos casos agudos, sendo que a mortalidade chega a atingir 50 a 90% dos casos não tratados (LEVINE, 1985).

O período de incubação por *B. bovis* é de seis a 15 dias, e o primeiro sinal clínico é o aumento da temperatura que normalmente dura dois a três dias (REIK, 1966; MAHONEY, 1977). *B. bovis* determina um quadro de anemia branda, palidez de mucosas, febre, sialorréia, depressão, distúrbios neurológicos e tremores, muitas vezes mimetizando sintomas de outras enfermidades como a raiva dos bovinos e intoxicações por plantas causadoras de doenças neurológicas (SOARES et al., 2000).

Tem sido observado que na infecção por *B. bovis* em bovinos, ocorre seqüestro de eritrócitos parasitados nos capilares da substância cinzenta do encéfalo (CALLOW e McGAVIN, 1963; ROGERS, 1971; PATARROYO et al., 1982; SOLANO, 1986). Isso provoca eventos químicos e imunológicos que induzem manifestações clínicas distintas, caracterizadas por sinais neurológicos e conhecidas como babesiose cerebral (CALLOW e McGAVIN, 1963; RODRIGUES et al., 2005).

2.6 Imunidade

Conforme Ulevitch et al. (2004), a imunidade inata é a primeira linha de defesa, formada por células fagocíticas, células matadoras naturais (NK) e citocinas, sendo uma resposta não específica. O sistema imune inato ativa as células via seus receptores que reconhecem os padrões moleculares encontrados em muitos diferentes microorganismos. Para que a defesa seja duradoura e eficaz é necessário o desenvolvimento da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T e B (BOCK et al., 2004). Desta forma a imunidade inata é essencial para ignição da resposta imune adquirida por meio da ativação dos macrófagos e células NK e a produção de suas respectivas citocinas (MADRUGA et al., 2001).

Segundo Brown e Palmer (1999), quando ocorre a primo-infecção, os macrófagos fagocitam os eritrócitos parasitados e merozoítos livres, processam e apresentam os antígenos de babesia para as células T CD4⁺ através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Este mecanismo é fundamental, pois os eritrócitos não possuem MHC, necessitando, portanto das células apresentadoras de antígenos, para que estas promovam o desenvolvimento de uma resposta imune

adquirida, (BROWN e PALMER, 1999; MACHADO et al., 2004). Stich et al. (1998) e Goff et al. (2001) e Goff et al. (2002) relataram que o IFN- γ secretado por macrófagos ativados frente a merozoítos de babesia, representa um papel chave na resposta imune e supressão desse parasito, e as células NK também produzem IFN- γ em resposta aos estímulos de IL-12 e IL-18. Os macrófagos ativados pelos eritrócitos parasitados produzem óxido nítrico e derivados, inibindo assim as atividades intracelulares, facilitando a fagocitose das células vermelhas parasitadas, e também atuando como células apresentadoras de antígenos em conjunto com linfócitos T auxiliares (Th) (STICH et al., 1998; HOPE et al., 2005). Isto resultará no controle da parasitemia e, portanto, superação da fase aguda da infecção (MADRUGA et al., 2001). Segundo Allred e Al-Khedery (2004), o controle da infecção é mediado pela destruição de eritrócitos infectados por ativação de macrófagos esplênicos e a neutralização promovida pelos anticorpos direcionados contra merozoítos extracelulares e antígenos variáveis existentes na superfície de eritrócitos infectados por *B. bovis* definidos como VESA 1 (variant erythrocyte surface antigen-1). Esses mecanismos imunes são dependentes das células T CD4⁺ (BROWN et al., 2006a).

Brown et al. (2006b) descrevem que bovinos sobreviventes a uma infecção inicial com *B. bovis*, naturalmente ou seguido de quimioterapia, ficam persistentemente infectados e resistentes à doença clínica. A imunidade relacionada à idade para infecção inicial com *B. bovis* está bem estabelecida, caracterizada pela forte imunidade inata em terneiros jovens (SHODA et al., 2000; GOFF et al., 2001). Terneiros resistem à infecção por *B. bovis* por expressar precocemente níveis mais altos de IL-12, IFN- γ e óxido nítrico (ESTES e BROWN, 2002; BROWN, 2006a).

Brown et al. (2006b) descreveram que terneiros jovens são relativamente resistentes para desenvolver a forma severa da doença típica observada em adultos suscetíveis no início da infecção com *B. bovis*. Essa resistência relativa à idade não é unicamente devido ao efeito protetor dos anticorpos maternos, pois a duração da resistência excede àquela transferida passivamente por anticorpos e terneiros nascidos em regiões livres, quando infectados experimentalmente com o parasito, também se mostraram resistentes.

De acordo com O'Donoghue et al. (1985), os níveis de anticorpos aumentam durante a fase aguda da infecção e depois declinam durante a fase crônica, a cinética da produção de anticorpos contra *B. bigemina* mostraram que a IgM é detectada sete dias após a inoculação desse hemoparasito, alcançando um pico no 12º dia e persistindo em um platô até o 22º dia, declinando até baixos níveis no 28º dia pós-inoculação. A IgG também é detectada no sétimo dia pós-infecção, alcançando títulos mais altos no 12º dia e permanecendo, assim, por sete semanas. Os níveis de anticorpos anti-*Babesia* caem, em média, quatro a cinco meses após a ausência do agente (FARIAS, 1995). A presença de títulos detectáveis de anticorpos não significa, necessariamente, imunidade protetora, entretanto é um indicador eficaz de infecção recente, quer naturalmente adquirida ou por vacinação (BOCK et al., 2004).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico deve ser baseado em uma anamnese completa e no exame clínico, auxiliado pelo exame laboratorial através da determinação de volume globular e esfregaço sangüíneo (FARIAS, 1995). Esses procedimentos permitem somente que se resolva um problema específico de momento, um caso clínico que deverá ser tratado ou um surto que deverá ser debelado.

Já o diagnóstico epidemiológico, baseado em uma anamnese completa e na determinação de animais portadores sadios em diferentes faixas etárias do rebanho estudado, permite que se estabeleça, quando necessário, um programa de profilaxia, ou seja, que se evite ou que se amenize o problema. Conforme Mahoney (1977); Torodovic e Long (1976); Solorio-Rivera e Rodríguez-Vivas (1997a); Figueroa et al. (1994); Osaki et al. (2002), o que permite fazer o diagnóstico epidemiológico é o conhecimento de portadores sadios, para isto existem as seguintes ferramentas:

- **Ferramentas diretas:** determinação da presença de *Babesia* nos animais sadios do rebanho, feito através de esfregaço grosso de sangue, técnicas de biologia molecular, a presença de *Babesia* é detectada através de seu DNA.
- **Ferramentas indiretas:** determinação da presença de anticorpos anti-*Babesia* nos animais sadios do rebanho (se positivo, estes animais têm ou

já tiveram *Babesia* em seu organismo, o patógeno está presente no ambiente); feito através de testes sorológicos.

As infecções clínicas por *Babesia spp.* são diagnosticadas pela visualização direta do parasito em esfregaços sanguíneos examinados em microscópio óptico. Como em infecções subclínicas ou latentes, no caso de portadores sadios, o grau de parasitemia é muito baixo, tornando extremamente difícil a demonstração do parasito em esfregaço sanguíneo (KESSLER et al., 1998), a detecção de anticorpos específicos no soro dos portadores foi uma alternativa encontrada para identificar bovinos nestas condições (ROSS e LÖHR, 1968; MARTINS et al., 1996).

2.7.1 Sorologia - Imunofluorescência Indireta (IFI)

Ross e Löhr (1968) consideraram o teste de imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos anti-*B. bigemina* em soro bovino, altamente específico e suficientemente sensível para detectar uma resposta positiva em animais infectados por dois anos.

Torodovic (1975) e Morzaria et al. (1992) citam uma variedade de testes sorológicos que tem sido empregados ao longo dos anos, por muitos pesquisadores para detectar anticorpos específicos anti-*Babesia spp.* em bovinos, tais como: fixação de complemento, hemaglutinação indireta, precipitação em gel e imunofluorescência indireta. Morzaria et al. (1992) citam outros métodos de diagnóstico como ELISA e ELISA de captura, sendo que estes superam em sensibilidade e especificidade o teste de IFI. Martins et al. (1996), Araújo et al. (1997), Araújo et al. (1998), Oliveira et al. (1999), Madruga et al. (2000) e Santos et al. (2001), comparando os testes de congutinação rápida (TCR), IFI e ELISA, observaram concordância nos resultados dos testes.

Martins et al. (1996), através de comparações entre os testes de ELISA e IFI, constataram concordância nos resultados, citando vantagens do ELISA pela capacidade de realização de um número maior de testes em um mesmo período, avaliação quantitativa e maior sensibilidade. O fator limitante para o uso de ELISA é a dificuldade na obtenção de antígenos de alta qualidade (BÖSE et al., 1995). As provas

de ELISA e IFI são as mais utilizadas como rotina de laboratório para o diagnóstico sorológico (WRIGHT, 1990; MACHADO, 1995; MADRUGA et al., 1997).

2.8 Epidemiologia

No Brasil, em regiões de clima tropical a presença constante do carrapato no rebanho permite a indução natural e a manutenção da imunidade contra os agentes do complexo da tristeza parasitária bovina. Desta forma é importante conviver com o parasito, porém em níveis capazes de manter essa imunidade e amenizando ao máximo as perdas econômicas causadas pelos agentes da TPB (FURLONG, 1993).

Conforme Mahoney (1973), o que acontece na babesiose em alguns rebanhos sob condições naturais depende inteiramente da freqüência com que a *Babesia* é transmitida. Isto depende da relação numérica existente entre carrapatos e o gado neste meio ambiente. A epidemiologia da babesiose não é meramente uma aplicação prática de pequenas observações, pois envolve conhecimentos da complexa interação de três sistemas populacionais: hospedeiro, *Babesia* e vetor (MAHONEY, 1977).

Segundo Mahoney (1962), Mahoney e Ross (1972), Friedhoff e Smith (1981), a prevalência sorológica de infecção aos nove meses de idade é a base para descrever um modelo epidemiológico clássico determinando três situações básicas: até 12% de animais positivos, os surtos são pouco prováveis, mas se ocorrer haverá grande prejuízo; de 12 a 80% de animais positivos, é uma situação de máximo risco, considerada como instabilidade enzoótica; e acima de 80% de animais positivos, existe pouca probabilidade de ocorrência de surtos, considerada como área de estabilidade enzoótica.

Os agentes de babesiose acompanham a distribuição geográfica do vetor e existem três situações diferenciadas:

- **Áreas livres** - locais em que o carrapato não ocorre devido às condições climáticas não permitirem o desenvolvimento do ixodídeo, como no extremo sul do Brasil e em regiões do Uruguai e da Argentina (abaixo do paralelo 32ºS), conseqüentemente não havendo babesiose (FARIAS, 1995).
- **Áreas de instabilidade enzoótica** (ou marginais) – locais em que o número de carrapatos flutua ao longo do ano, causando incidência reduzida

ou variável de infecções nos bovinos, resultando em que muitos animais escapem da infecção durante seu primeiro ano de vida, ocasionando freqüentemente consequências severas como sua não imunização (MAHONEY, 1969). Geralmente são regiões próximas aos paralelos 32ºN e 32ºS, onde ocorre uma estação fria bem definida, onde os bovinos podem permanecer longos períodos sem o contato com o carrapato e os agentes (*Babesia* spp.) por eles transmitidos, levando a uma queda nos níveis de anticorpos (FARIAS, 1995; VANZINI & RAMIREZ, 1995). Nestas áreas a taxa de inoculação nem sempre é suficientemente elevada para assegurar uma transmissão contínua do parasito entre o vetor e a população animal, podendo ocorrer surtos de babesiose (RAMÍREZ-CRUZ et al., 1997). Quando a infecção latente cessa antes que o hospedeiro desenvolva sua imunidade, este se torna um adulto indefeso contra a reinfecção, que geralmente levará a uma doença clínica aguda, geralmente fatal (JOYNER & DONNELLY, 1979).

- **Áreas de estabilidade enzoóticas** (ou endêmicas) – locais caracterizados pela presença constante do carrapato durante todo o ano, suficiente para causar infecção em terneiros nos primeiros meses de vida e parasitemia persistente, com raros casos clínicos de babesiose, pois os animais ficam protegidos imunologicamente (FRIEDHOFF e SMITH, 1981). Existe uma elevada taxa de transmissão (taxa de inoculação) do parasito entre o vetor e o hospedeiro (RAMÍREZ-CRUZ et al., 1997).

Conforme Guglielmone (1995) e D'andrea et al. (2006), dependendo da raça explorada, manejo, níveis de infestações do carrapato *B. microplus* e tratamentos com carrapaticidas de longo período residual, será possível transformar áreas consideradas estáveis em instáveis e vice-versa. Vieira et al. (2003) descrevem que em regiões no sul do Brasil, com três gerações de carrapatos ao ano, o método utilizado para controlar o carrapato poderá interferir na estabilidade enzoótica da babesiose bovina.

Segundo Madruga et al. (2000), os estudos de prevalência destes hemoparasitos são importantes para a determinação da situação epidemiológica em uma região, indicando uma situação de instabilidade ou de estabilidade endêmica e,

conseqüentemente indicando a necessidade ou não de adoção de medidas preventivas.

2.8.1 Prevalência de babesiose bovina

No Brasil, devido à sua grande extensão geográfica e à grande diversidade de condições climáticas, de vegetação, de raças criadas e de manejo desta criação, a prevalência da babesiose bovina é bastante diversificada, conforme as condições de cada um destes fatores e a combinação entre eles.

Estudos epidemiológicos indicam situação de estabilidade enzoótica em grande parte do território nacional, como na Zona da Mata em Minas Gerais (SALCEDO et al., 1987), nas microrregiões em Feira de Santana, Jequié, Ilhéus-Itabuna, e Vitória da Conquista no Estado da Bahia (ARAÚJO et al., 1997) e planalto norte de Santa Catarina (SOUZA et al., 2002). Isto ocorre devido a maior parte do território nacional se encontrar em região geográfica com condições ambientais e climáticas favoráveis à biologia do carrapato vetor, permitindo seu desenvolvimento constante ao longo de todo o ano, e à predominância de raças zebuínas combinada com um manejo extensivo nestas regiões. Entretanto, mesmo em regiões do sudeste como cita Souza et al., 1999a e centro-oeste onde fatores específicos de clima, raças e manejo fogem a estas características, criam-se situações de instabilidade como as estabelecidas na região sul do Rio Grande do Sul, em função de localização geográfica, clima, manejo e raças (PATARROYO et al., 1982; MADRUGA et al., 1984; MARTINS et al., 1994; VIDOTTO et al., 1995). Nestas regiões de instabilidade enzoótica a doença assume caráter de maior importância, sendo um sério problema e um entrave ao desenvolvimento da pecuária bovina.

Patarroyo et al. (1984) verificaram a soroprevalência de babesiose, pela IFI, em bovinos com mais de dois anos de idade, na região da Zona da Mata, Minas Gerais, variando de 61,7% a 97,2% e 59,5% a 88,9% para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Olivé Leite et al. (1989) observou no sul do Rio Grande do Sul, ao redor da cidade de Pelotas (considerada como área de instabilidade enzoótica para o carrapato bovino), que 76,4% dos terneiros com idade de oito a dezoito meses eram positivos para *B. bovis* e 80,36% para *B. bigemina*.

Artiles et al. (1995) no município de Bagé, RS, analisaram soros de terneiros e constataram uma prevalência de 74% para *B. bovis* através da técnica de ELISA e 87% para *B. bigemina* através da técnica de IFI. Krolow (2002) avaliou animais de uma propriedade rural no município de Pedro Osório, RS, durante seu primeiro ano de vida e constatou uma situação de estabilidade enzoótica. Aos nove meses de idade 90,3% e 100% dos animais apresentavam anticorpos contra *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta.

Souza et al. (2002) buscaram conhecer a prevalência de anticorpos específicos para *B. bovis* e *B. bigemina* no Planalto Norte de Santa Catarina e observaram que animais da faixa etária de 12 a 24 meses, avaliados sorologicamente pela IFI, estavam em situação de estabilidade enzoótica. Os percentuais de animais soropositivos para ambos protozoários aumentaram com a faixa etária até os 24 meses, explicado pela maior oportunidade que tiveram os animais de serem inoculados por babesias no decorrer do tempo.

Estes trabalhos em prevalência demonstram a importância de se conhecer a situação epidemiológica de cada região, localidade e propriedade para determinar as ações a serem tomadas e delinear programas de controle e profilaxia. Conforme Guglielmone (1995); Vieira et al. (2003) e D'andrea et al. (2006) citam que mesmo dentro de uma região considerada estável ou instável em função de suas características geográficas e climáticas, a situação epidemiológica de uma propriedade pode ser alterada em função de manejo dos animais e dos campos, como por exemplo: introdução de raças européias onde havia apenas zebuínos, lavouras e/ou pastagens cultivadas onde havia campo nativo, a introdução, em campos livres de carrapato, de animais vindos de zonas infestadas e os métodos de controle do carrapato vetor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilereiros (CPPSUL/EMBRAPA), na cidade de Bagé, RS.

3.1 Material

Foram utilizados soros de bovinos com idade de 13 a 24 meses, filhos de vacas da raça Santa Gertrudis e touro Polled Hereford, coletados no ano de 2001, na Fazenda Curupira, situada no município de Pedro Osório, RS, tendo como situação geográfica: latitude 32° 01' 28'', longitude 52° 55' 01'' e altitude média de 68 metros. A localização da propriedade, por estar próximo ao paralelo 32°S, apresenta condições climatológicas que favorecem a infestação de carrapatos nos bovinos por alguns meses do ano, e outros não. Essa situação geralmente determina o estado de instabilidade enzoótica para TBP.

3.2 Coleta e análise de amostras

O trabalho constou de um estudo descritivo da resposta sorológica de bovinos em uma propriedade em região de instabilidade enzoótica. Não houve alteração do manejo normal da propriedade, somente foram realizadas coletas mensais de sangue, com e sem anticoagulante, dos animais para a obtenção de soro e determinação de hematócrito, além de obtidas informações de manejo, presença e controle de carrapatos nestes animais.

O sangue para a obtenção de soro, coletado sem anticoagulante, foi centrifugado a 3000g por 10 minutos e o soro foi armazenado a -20°C até o

processamento. O soro foi submetido à técnica de Imunofluorescência Indireta para detecção de imunoglobulinas (IgG) anti-*B. bovis* e *B. bigemina*. O sangue com anticoagulante foi utilizado para a determinação do hematócrito.

3.2.1 Dados da Infestação por *Boophilus microplus*

A avaliação da infestação por *Boophilus microplus* dos animais do experimento foi realizada mensalmente, quando da coleta de sangue, onde apenas foi observada a presença ou ausência dos ixodídeos.

3.2.2 Sorologia - Imunofluorescência Indireta (IFI)

Os soros bovinos foram descongelados e submetidos à técnica de Imunofluorescência Indireta para detecção de imunoglobulinas anti *B. bovis* e *B. bigemina* (anticorpos da classe IgG). Esta técnica tem como princípio tornar visível a reação antígeno-anticorpo por meio de uma antiimunoglobulina marcada com fluorocromos (IICA, 1984). O fluorocromo utilizado foi o isotiocianato de fluoresceína (FITC), o qual emite fluorescência verde.

Os soros controles positivo e negativo para *B. bovis* e *B. bigemina* foram diluídos a 1:80 em PBS. O soro negativo foi obtido de animais experimentais da CPPSUL/EMBRAPA – Bagé, RS, nascidos e mantidos em área livre de carrapatos. Os soros positivos foram obtidos de animais infectados experimentalmente com *B. bovis* e *B. bigemina*. Os soros-teste sofreram diluições dobradas, a partir de 1:80 (conforme rotina do Laboratório de Hemoparasitologia da Embrapa Pecuária Sul), sendo o título final a última diluição na qual foi observada fluorescência.

A técnica foi realizada segundo IICA (1984), com algumas modificações. Os antígenos, armazenados a -20°C, foram fornecidos pelo Laboratório de Saúde Animal do CNPGC-Embrapa – Mato Grosso do Sul – MS. As lâminas de antígeno foram retiradas do congelador, transferidas para estufa a 37°C e deixadas em repouso por dez minutos. Imediatamente após eram confeccionados os círculos com esmalte sobre a distensão (21 círculos por lâmina). Logo, os soros foram colocados nos círculos e as lâminas incubadas em câmara úmida por trinta minutos a 37°C. Após, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS sob fraca agitação por dez minutos, e secas no ventilador.

O conjugado¹ foi diluído em PBS (1:320 conforme indicação do fabricante), distribuído nos círculos e as lâminas incubadas novamente nas mesmas condições descritas. Após, as lâminas foram lavadas em PBS, duas vezes sob fraca agitação por dez minutos cada, e por cinco minutos em solução A + B (anexo), e secas em local escuro. A leitura foi realizada em microscópio de fonte de luz UV, com ocular de 10X e objetiva de 40X.

3.2.3 Hematócrito

O sangue coletado com EDTA foi utilizado para determinar o hematócrito através da técnica do microhematócrito. O sangue foi colocado em tubos capilares, centrifugado a 13.000g por 7 minutos e o resultado foi lido no cartão de leitura (SINK e FELDMAN, 2006).

3.3 Dados Climatológicos

Os dados utilizados foram obtidos da Estação Agroclimatológica Capão do Leão – RS (EMBRAPA/ETB – Campus da UFPel), das normais climatológicas que referem-se a um período de 30 anos e as médias mensais do ano de 2001 obtidos do Boletim Climatológico (<http://www.cpact.embrapa.br/agromet/estacao/boletim.html>) da mesma Estação. As médias normais foram comparadas com as médias mensais do período de 2001. As variáveis analisadas foram: temperaturas médias, mínimas e máximas, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar.

3.4 Análise Estatística

Foram realizadas análises de estatística descritiva das titulações como o cálculo de média, moda, mediana, bem como frequências (de dados não transformados). Para a análise dos níveis de anticorpos *anti-B. bovis* e *anti-B. bigemina* foi necessária a transformação das titulações através de logaritmo decimal+1, para que os dados apresentassem distribuição normal. A comparação entre os meses do ano foi realizada através de análise de variância e a comparação entre grupos de meses realizada

¹ Anti-Bovine IgG (whole molecule) FITC conjugate. Sigma Chemical Company.

através da opção de contrastes ortogonais dentro da análise de variância no programa estatístico SAS (1989). Para uma melhor comparação entre os resultados de sorologia dos terneiros no primeiro ano de idade, foram utilizados os resultados obtidos por Krolow (2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Presença de *Boophilus microplus*

Os dados da infestação por carrapatos nos animais do experimento e as épocas de aplicação de carrapaticidas estão expressos na Figura 1.

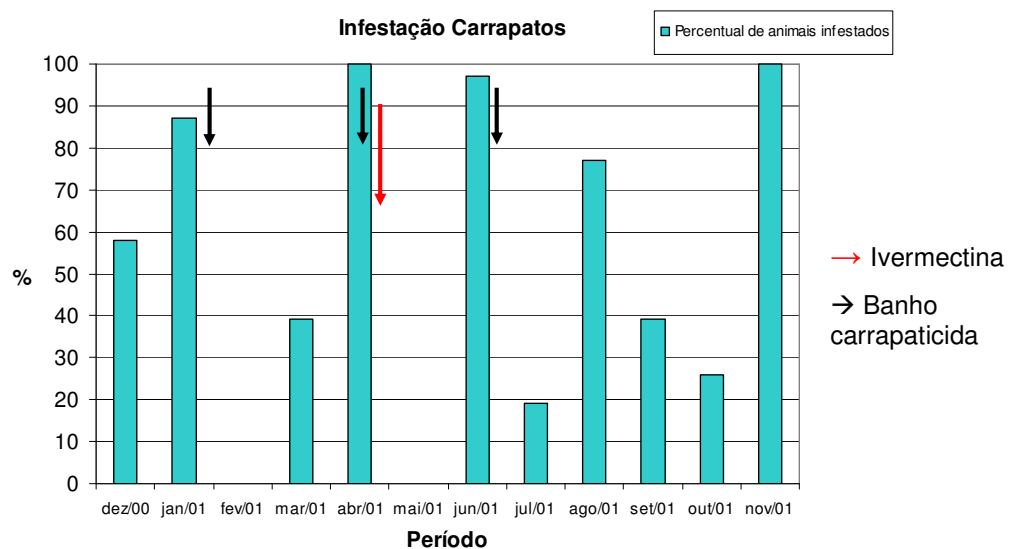


Figura 1. Percentual de animais infestados por *Boophilus microplus* ao longo do ano (dezembro 2000 a novembro 2001).

A ausência do carrapato nos animais foi detectada apenas nos meses de fevereiro e maio, devido a tratamentos carrapaticidas, estando presente nos demais meses. Esse fato não foi observado em outros experimentos realizados na região, nos quais a infestação dos bovinos desaparece durante os meses de inverno,

reaparecendo em meados da primavera (BRUM et al., 1987). Gonzalez (2003) descreve o modelo populacional de carrapatos no sul do Brasil, onde os primeiros ixodídeos surgem após os meses de julho e agosto sendo esta população considerada como primeira geração pós-inverno. A presença do carrapato em quase todo o ano deve-se provavelmente às condições climáticas, descritas a seguir.

4.2 Dados Climatológicos

A biologia de *B. microplus* é fortemente influenciada pela temperatura e seus diferentes tempos de evolução das diferentes etapas da fase de vida livre são encurtados pelas altas temperaturas e prolongados pelas baixas temperaturas (GLORIA et al., 1993).

Avaliando as variáveis de temperatura dos últimos trinta anos, observou-se que durante o ano em que foi realizado o experimento, as temperaturas médias foram superiores às normais, sendo que nos meses de inverno as médias de mínima, média e máxima estavam acima do esperado, favorecendo o ciclo de vida livre do carrapato (Figura 2). Apenas no mês de julho as temperaturas médias atingiram valores inferiores a 15°C, inviabilizando o que seria o fator limitante mais importante ao ciclo de vida livre do carrapato, que é o frio prolongado (GONZALES, 2003).

A umidade relativa do ar manteve-se superior à média dos últimos 30 anos, o que, juntamente com a temperatura elevada, também favoreceu o desenvolvimento do carrapato, pois as larvas podem sobreviver até oito meses sob estas condições de umidade próximas e ou superiores a 80% (HITCHCOCK, 1955 apud VIEIRA, 2002).

4.3 Hematócrito

O hematócrito ou volume globular (VG) é um dado clínico que se altera quando os parasitos se multiplicam e destroem as hemácias, ocasionando uma diminuição do eritrôn circulante (KERR, 2003), e conseqüentemente baixando seus valores. Como não houve casos clínicos durante a realização do experimento, não ocorreu alteração dos níveis normais do hematócrito para espécie bovina (Tabela 1).

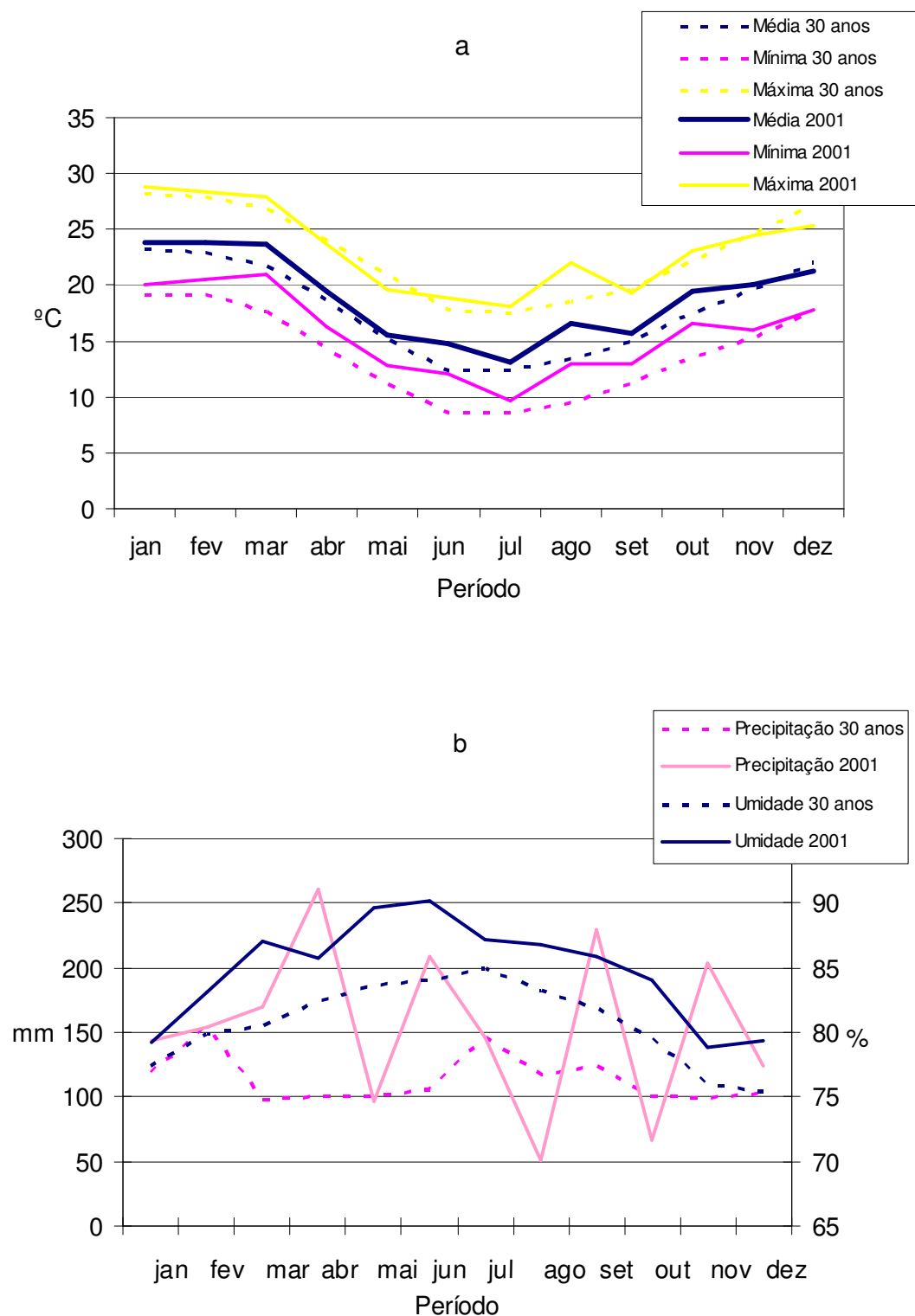


Figura 2 - Normais climatológicas de (a) temperaturas médias, mínimas, máximas, (b) umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica na região sul do Rio Grande do Sul no período de 1971 a 2000, comparadas com as médias mensais observadas em 2001.

Pode-se observar que mesmo os bovinos estando carrapateados e sendo inoculados com os protozoários (confirmado pela sorologia) os animais não entraram em fase clínica da doença, embora tenham tido um caso de queda do hematócrito (fevereiro, Tabela 1), que evoluiu para a estabilização, devido ao equilíbrio entre o inóculo recebido e o nível de anticorpos dos bovinos (MAHONEY et al., 1972; SOLARIO-RIVERA, 1989; FARIAS, 1995). Os valores normais para espécie bovina, segundo Silveira (1988) variam de 24 a 48%.

Tabela 1. Variação mensal da média do hematócrito (%) de bovinos durante o segundo ano de vida, nascidos em 2000.

Meses	Média	Variação
Dezembro	36,5	31 – 43
Janeiro	35,5	25 – 41
Fevereiro	32,6	14 – 41
Março	37,2	29 – 48
Abril	39,8	32 – 50
Maio	35,5	27 – 50
Junho	38,5	25 – 46
Julho	37,1	32 – 45
Agosto	37,1	29 – 47
Setembro	37,0	26 – 47
Outubro	37,1	31 – 45
Novembro	38,1	32 – 48

4.4 Sorologia - Imunofluorescência Indireta

Os resultados das provas sorológicas demonstraram que, aos dois anos de idade, 100% dos animais apresentaram anticorpos anti-*B. bovis* (Figura 3), e mantiveram-se neste percentual para *B. bigemina* enfatizando a situação de estabilidade enzoótica já constatada nesta propriedade por Krolow (2002), apesar desta estar localizada em região definida como de instabilidade enzoótica por Olivé Leite et al. (1989) e Artiles et al. (1995). Este fato deve estar relacionado com o manejo

da propriedade, no qual permite infestações baixas e constantes de carrapatos, ao longo dos anos.

Comparando os resultados destes mesmos animais em seu primeiro ano, analisado por Krolow (2002) dos sete até os 13 meses de idade, as titulações variaram, mas dos 14 meses em diante observou-se uma diminuição das titulações tanto para *B. bigemina* como *B. bovis* (Figuras 4, 5 e 6).

A análise de contrastes demonstrou que as titulações durante o primeiro ano de vida dos bovinos foram significativamente superiores quando comparadas ao segundo ano para *B. bovis* ($P=0,0002$) e para *B. bigemina* ($P<0,0001$). Pelo mesmo método observou-se que as titulações para *B. bigemina* mostraram diferenças significativas entre as estações do ano, sendo que as médias do verão foram superiores às das demais estações ($P<0,05$) para esta espécie.

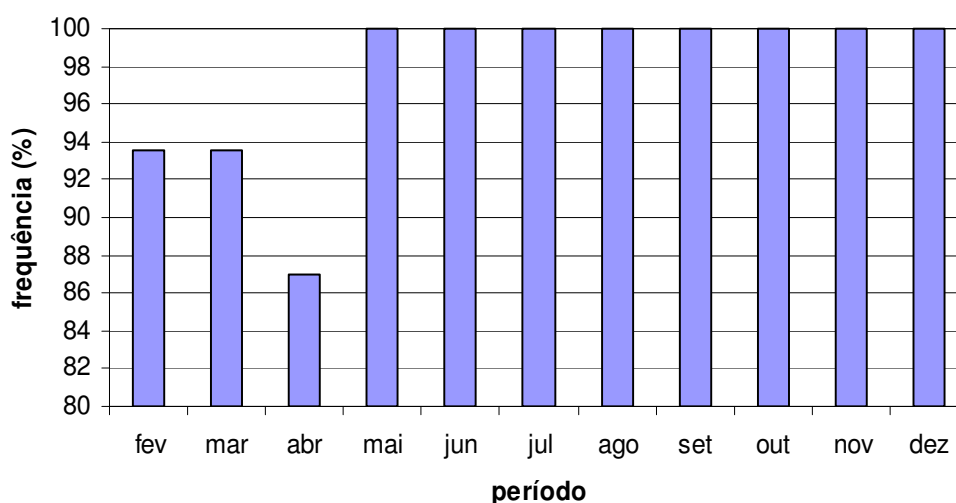


Figura 3 - Frequência mensal de bovinos soropositivos para *Babesia bovis*, durante o segundo ano de vida (2000/2001).

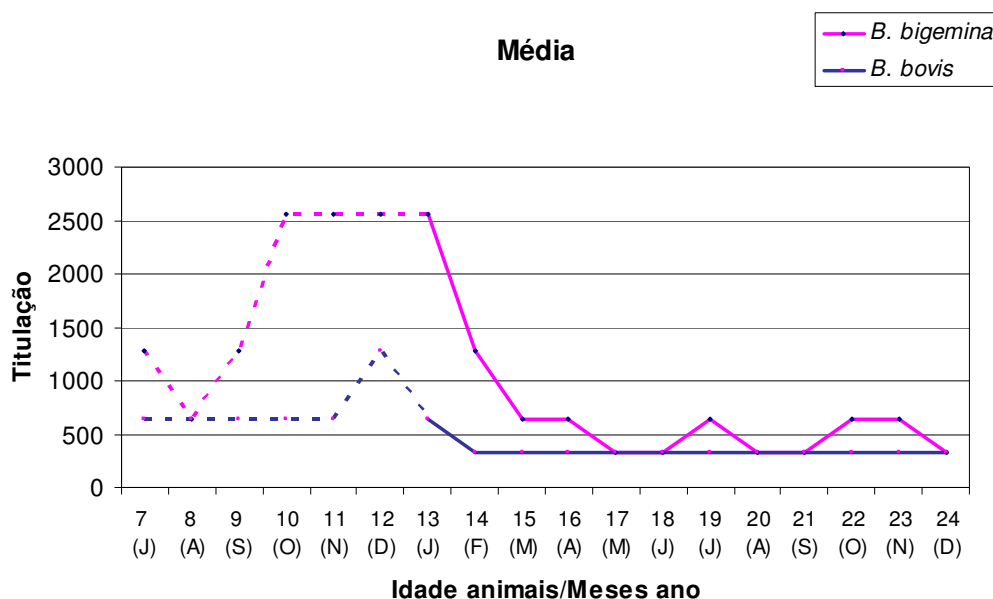


Figura 4 - Variações dos títulos de anticorpos (Imunofluorescência Indireta) anti-*B. bigemina* e *B. bovis* dos 7 aos 24 meses de idade, em bovinos naturalmente infectados (2000/2001).

Estas variações poderiam ser explicadas pela queda gradual dos níveis de anticorpos obtidos da primo-infecção (MELENDEZ & FORLANO, 1997; SOARES et al., 2000). No entanto, para *B. bovis* não houve esta diferença, talvez pela persistência maior dos anticorpos contra este protozoário. Já os anticorpos anti-*B. bigemina* não permanecem muito tempo circulantes no organismo hospedeiro, onde os bovinos necessitam novas inoculações pelos vetores para manter os níveis de anticorpos no organismo (MAHONEY et al., 1973).

As titulações de anticorpos anti-*B. bigemina* foram significativamente mais altas que anti-*B. bovis*, provavelmente devido a alguns fatores: a *B. bigemina* tem como característica, além da transmissão alimentar, a transmissão vertical, ou seja, as teleóginas poderão manter a infecção para próxima geração (MAHONEY e ROSS, 1972), representando um potencial reprodutivo superior (SMITH, 1982). Já com *B. bovis* a infecção da população de carrapatos é baseada somente na infecção alimentar da fêmea ingurgitada (FREIDHOFF e SMITH, 1981). Desta forma, há evidências de que *B. bigemina* esteja mais difundida no ambiente do que *B. bovis* (OLIVÉ LEITE et al., 1989; ARTILES et al., 1995; ALMEIDA et al., 2006). Geralmente esta maior prevalência de anticorpos específicos anti-*B. bigemina* é devido ao seu maior potencial

reprodutivo, além de ser transmitida por várias gerações sem necessidade de reinfecção (SMITH, 1982).

Ainda que a propriedade rural estudada neste trabalho tenha sido descrita como em situação de estabilidade (KROLOW, 2002), quatro animais (13%) apresentaram títulos baixos e inconstantes para *B. bovis* durante seu primeiro ano de vida e somente demonstraram soroconversão durante o seu segundo ano, quando mantiveram um platô após a reinfestação por carrapatos (Figura 7). Este fato se observou no outono, onde normalmente ocorre a terceira geração deste ixodídeo (GONZALES, 2003). Estes resultados podem ter sido causados devido a suas mães apresentaram títulos no pré-parto de 1:80 (N=1), 1:160 (N=2), e 1:640 (N=1), e seus terneiros mostraram títulos colostrais máximos de 1:80 (N=2) e 1:320 (N=2) (KROLOW, 2002). Ao longo dos meses (0-12) os níveis de anticorpos dos terneiros variaram de zero a 1:640, permanecendo assim até 17 meses de idade. Estes resultados estão em concordância com Souza et al. (2002) e podem ser explicados pela maior oportunidade do contato dos bovinos com o carrapato.

Estes mesmos animais, no seu primeiro ano de vida, foram infestados com *B. microplus*, conforme descrito em Krolow (2002) e houve soroconversão apenas para *B. bigemina*. Segundo Mahoney e Mirre (1971), a taxa de inoculação de *B. bigemina* pelo *B. microplus* é uma consequência da maior infectividade deste protozoário para o ixodídeo, o que a torna mais difundida no ambiente, sendo de maior prevalência no sul do Rio Grande do Sul (OLIVÉ LEITE et al., 1989). Osaki et al. (2002), constataram que terneiros infestados com carrapatos desde os 30 dias de idade permaneceram soronegativos para *B. bovis* até os seis meses de idade, em propriedade localizada no Paraná.

De fato se observa que, mesmo em propriedade com situação de estabilidade enzoótica, alguns animais podem escapar da imunização natural nos seus primeiros nove meses de idade, principalmente no que se refere *B. bovis*, levando a ocorrência de casos isolados de doença clínica. Almeida et al. (2006) observaram que os surtos de TPB ocorridos no sul do Rio Grande do Sul, no período de 1978 a 2005, foram na

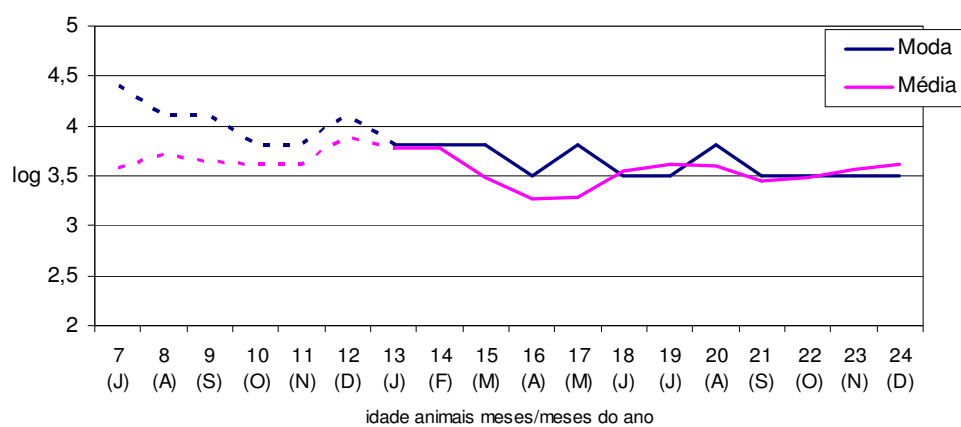


Figura 5 - Variações mensais dos títulos de anticorpos (após transformação logarítmica) anti-*B. bovis* pela técnica de imunofluorescência em bovinos naturalmente infectados, na faixa etária de 7 aos 24 meses.

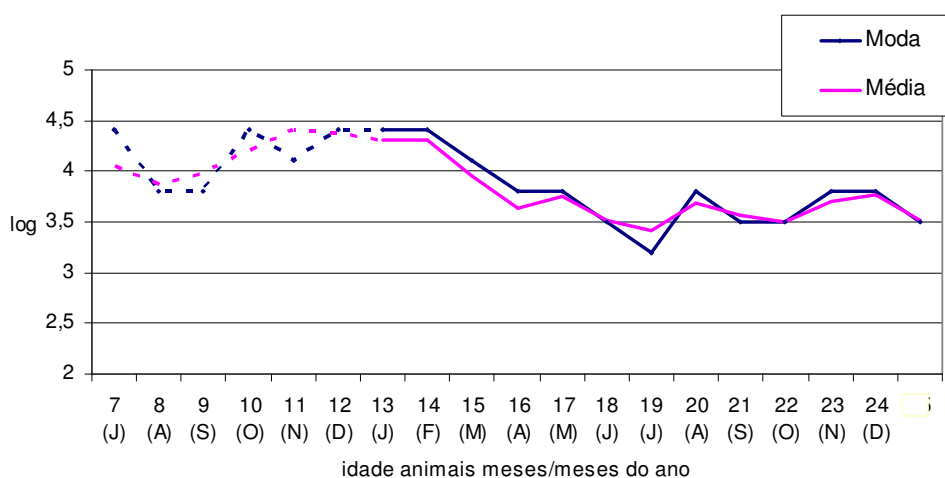


Figura 6 – Variações mensais dos títulos de anticorpos (após transformação logarítmica) anti-*B. bigemina* pela técnica de imunofluorescência em bovinos naturalmente infectados, na faixa etária de 7 aos 24 meses.

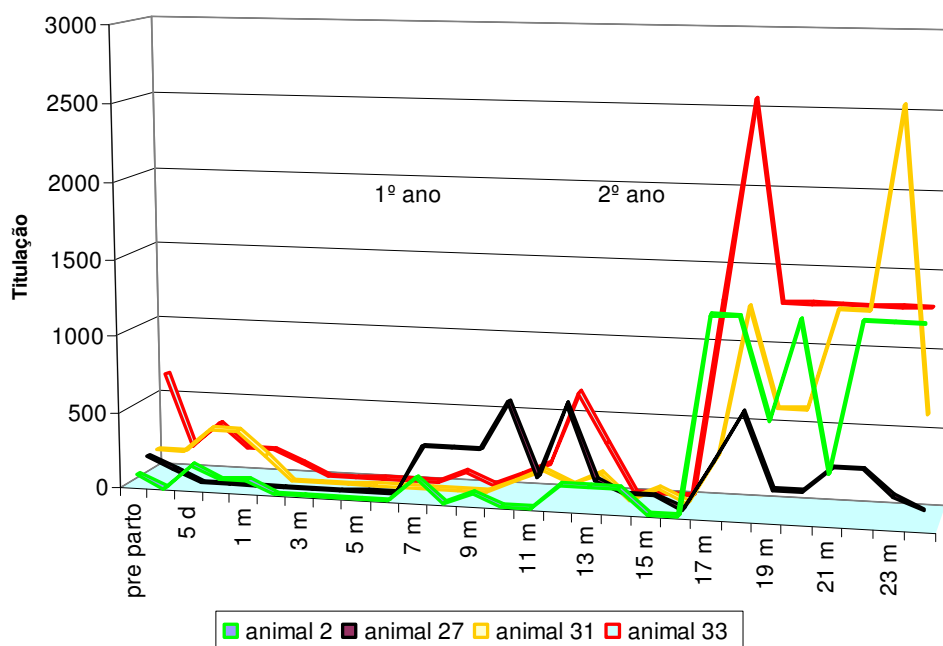


Figura 7 - Variação mensal da titulação de anticorpos anti- *Babesia bovis* pela técnica de imunofluorescência de quatro animais cuja soroconversão foi mais tardia, no período de 24 meses. Dados dos 12 primeiros meses segundo Krolow (2002).

maior parte dos casos nos meses de outono e verão, e os animais afetados apresentavam de um a três anos de idade e destes, 41% foram de *B. bovis* e 4,9% de *B. bigemina*, o que reforça os dados verificados no presente estudo. Em experimento no Uruguai, Solari et al., 1992, observaram que 90% dos surtos foram causados por *B. bovis* devido a estes protozoários estarem distribuídos de forma esparsa no país.

Portanto, manter os animais em contato com o carrapato de forma constante e em níveis baixos, é essencial para manutenção da imunização natural de babesias.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- a propriedade estudada encontra-se em situação de estabilidade enzoótica para babesiose bovina, mesmo estando localizada em área típica de instabilidade;
- as titulações de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* verificadas no segundo ano de vida dos bovinos são inferiores às aquelas produzidas após a primo-infecção (durante o primeiro ano);
- no rebanho estudado, os animais sofrem maior inoculação de *B. bigemina*, uma vez que 100% mantiveram-se soropositivos durante todo o segundo ano de vida,
- mesmo diante da situação de estabilidade, alguns animais não apresentam níveis estáveis de anticorpos anti-*B. bovis* ao longo do seu segundo ano de vida, o que justifica ser essa espécie a maior causadora de surtos e casos clínicos isolados na região.

6 REFERÊNCIAS

- ALLRED, D. R.; AL-KHEDERY, B. Antigenic variation and cytoadhesion in *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: different logics achieve the same goal. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 27-35, 2004.
- ALMEIDA, M.B.; TORTELLI, F.P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J.L.M.; SOARES, M.P.; FARIAS, N.A.F.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 237-242, 2006.
- ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; ALMEIDA, M.A.O.; LEAL, C.R.B.; MIGUITA, M. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de congutinação rápida. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 111-115, 1997.
- ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; LEAL, C.R.B.; SCHENK, M.A.M.; KESSLER, R.H.; MARQUES, A.P.C.; LEMAIRE, D.C. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid congutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. **Veterinary parasitology**, v. 74, p. 101-108, 1998.
- ARTILES, J.; ALVES BRANCO, F.P.; MARTINS, J.R.; CORREA, L.B.; SAPPER, M.F.M. Prevalência de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 4, n. 2, s. 1, p. 179, 1995.
- BENAVIDES, M.V.; SACCO, A.M.S. Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 54-64, 2007.
- BOCK, R.; JACKSON, L.; de VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, p. 247-269, 2004.
- BÖSE, R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEDHOFF, K.T.; De VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 61-74, 1995.

BROWN, C.G.D. Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 29, p. 15-35, 1997.

BROWN, W.C.; PALMER, G.H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 275-281, 1999.

BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; GOFF, W.L.; SUAREZ, C.E.; McELWAIN, T.F. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 315-327, 2006.

BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D.P.; GOFF, W.L. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary parasitology**, v. 138, p. 75-87. 2006.

BRUM, J.G.W.; COSTA, P.R.P.; RIBEIRO, P.B.; GONZALES, J.C. Flutuação sazonal de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) no município de Pelotas, RS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, n. 6, p. 891-896, 1987.

CALLOW, L.L.; McGAVIN, M.D. Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. **Australian Veterinary Journal**. v. 39, p. 15-21, 1963.

COMMINS, M.A.; GOODGER, B.V.; WALTISBUHL, D.J.; WRIGHT, I.G. *Babesia bovis*: studies of parameters influencing microvascular stasis of infected erythrocytes. **Veterinary Science**, v. 44, p. 226-228, 1988.

D'ANDREA, L.A.Z.; SARTOR, I.F.; MADRUGA, C.R.; FREITAS, S.B.Z.; KROLL, L.B.; KRONKA, S.N. Condição imunológica de bovinos das raças Holandesa e Nelore frente a *Babesia bovis* e *B. bigemina* em duas regiões do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 74-78, 2006.

DONNELLY, J. Epidemiology of babesia infection in cattle. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 66, p. 10-11, 1973.

ESTAÇÃO AGROCLIMATOLÓGICA DE PELOTAS (CAPÃO DO LEÃO). Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/agromet/estacao/boletim.html>> Acesso em: 16 jan. 2008.

ESTES, D.M.; BROWN, W.C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 90, p. 1-10, 2002.

FARIAS, N.A.R. **Diagnóstico e controle da Tristeza Parasitária Bovina**. Editora Agropecuária, Guaíba-RS, 1995.

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; GOOF, W.L.; BUENING, G.M. Polymerase chain reaction-based diagnostic assay to detect cattle chronically infected with *Babesia bovis*. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v. 36, n. 1, p. 47-55, 1994.

FRIEDHOFF, K. T.; SMITH, R.D. Transmission of *Babesia* by ticks. In: RISTIC, M., KREIER, J.P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, Inc., 1981. Cap. 9, p. 267-321.

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1988. Cap. 2, p. 23-52.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG**, Belo Horizonte, n. 8, p. 49-61, 1993.

GLORIA, M.A.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H.; GRISI, L. Influência de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (CAN., 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 2, n. 2, p. 85 -91, 1993.

GOFF, W.L.; JOHNSON, W.C.; PARISH, S.M.; BARRINGTON, G.M.; ELSASSER, T.H.; DAVIS, W.C.; VALDEZ, R.A. IL-4 and IL-19 inhibition of IFN- γ - and TNF- α -dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 84, p. 237-251, 2002.

GOFF, W.L.; JOHNSON, W.C.; PARISH, S.M.; BARRINGTON, G.M.; TUO, W.; VALDEZ, R.A. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite immunology**, v. 23, p. 463-471, 2001.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. UPF editora, Universidade de Passo Fundo-RS, 128 p., 2003.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in south and central america. **Veterinary Parasitology**. v. 57, p. 109-119, 1995.

HILDEBRANDT, P. K. The organ and vascular pathology of babesiosis. In: RISTIC, M., KREIER, J.P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, Inc., 1981. Cap.15, p. 459-471.

HOPE, M.; RIDING, G.; MENZIES, M.; COLDITZ, I.; REVERTER, A.; WILLADSEN, P. Potencial for recombinant *Babesia bovis* antigens to protect against a highly virulent isolate. **Parasite Immunology**, v. 27, p. 439-445, 2005.

IICA-INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA. **Técnicas para el diagnostico de babesiosis y anaplasmosis bovina**. Costa Rica: IICA, 1984. (Serie Salud Animal, Publicación Científica n. 8).

JOYNER, L.P.; DONNELLY, J. The epidemiology of babesial infections. **Advances in Parasitology**, v. 17, p. 115-140, 1979.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária**. 2ªed, Editora ROCA, São Paulo, 2003, 436 p.

KESSLER, R.H.; SACCO, A.M.S.; MADRUGA, C.R.; MÜLLER, M.; MIGUITA, M. Teste Crítico de vacinas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em novilhas da raça holandesa. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 7, n. 1, p. 1-5. 1998.

KROLOW, R.C.P. **Imunidade passiva e ativa contra *Babesia bovis* (BABÈS, 1888) e *Babesia bigemina* (SMITH & KILBOURNE, 1893) em terneiros nascidos na primavera em área marginal para o vetor *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887)**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária-Sanidade Animal), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., Capítulo 1, 1988. p.1-15.

LEVINE, N.D. Apicomplexa: The piroplasms. In: LEVINE, N.D. (ed.). **Veterinary Protozoology**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1985, p. 291-328.

LEVINE, N.D. Blood parasites: the piroplasms. In: LEVINE, N.D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., VII, capítulo 13, 1988. p. 35-45.

MACHADO, P.R.L.; ARAUJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. In: Educação Médica Continuada. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MACHADO, R.Z. Emprego do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA teste) no estudo da resposta imune humoral de bovinos importados e premunidos contra a tristeza parasitária. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, suplemento 1, p. 217, 1995.

MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; KESLLER, R.M.; SCHENK, M.A.M.; FIGUEREDO, G.R.; CURVO, J.B.E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 19, p. 1163-1168, 1984.

MADRUGA, C.R.; SCHENK, M.A.M.; KESSLER, R.H.; MIGUITA, M. Desenvolvimento de um teste de imunoadsorção enzimática (ELISA) para detecção de anticorpos contra *Babesia bigemina*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, suplemento 1, p. 298, 1997.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; MARQUES, A.P.C.; CARVALHO, C.M.E.; CUSINATO, F.Q.; CROCCI, A.J.; KESSKER, R.H.; MIGUITA, M. Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 4. p. 167-170, 2000.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Embrapa-CNPGC, Campo Grande, MS, 2001. 360 p.

MAHONEY, D.F. The epidemiology of babesiosis in cattle. **The Australian Journal of Science**, v. 24, p. 310-313, 1962.

MAHONEY, D.F. Bovine babesiasis: a study of factors concerned in transmission. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 63, n. 1, 1969.

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G.B. Bovine babesiasis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 309-317, 1971.

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

MAHONEY, D. F. Babesiosis of cattle. **Australian Meat Research Committee**. v. 23, p. 1-21, 1973.

MAHONEY, D.F.; WRIGHT, I.G.; MIRRE, G.B. Bovine babesiasis: The persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. Bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 67, p. 197-203, 1973.

MAHONEY, D. F. **Babesia of Domestic Animals**. New York, Academic Press, v. IV, p. 1-52, 1977.

MAHONEY, D.F.; WRIGHT, I.G.; GOODGER, B.V. Immunity in cattle to *Babesia bovis* after single infections with parasites of various origin. **Australian Veterinary Journal**. v. 55, p. 10-12, 1979.

MAHONEY, D.F. The development of control methods for tick fevers of cattle in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, n. 9, 1994.

MARTINS, J.R.; CORRÊA, B.L.; CERESÉR, V.H.; ARTECHE, C.C.P.; GUGLIELMONE, A.A. Some aspects of the epidemiology of *Babesia bovis* in Santana do Livramento, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 75-78, 1994.

MARTINS, J.R.; CORRÊA, B.L.; CERESÉR, V.H. Estudo comparativo entre as provas de ELISA e imunofluorescência indireta (IFI) para detectar anticorpos contra *Babesia bovis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 26, n. 1, p. 115-118, 1996.

MARTINS, J.R. Tristeza parasitária bovina. In: Carrapatos: problemas e soluções. **Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora, p. 39-49, 2005.

MELENDEZ, R.D.; FORLANO, M. Seroprevalence and incidence of babesiosis and anaplasmosis in a Carora breed herd from Venezuela. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 105-109, 1997.

MORZARIA, S.; KATENDE, J.; KAIRO, A.; NENE, V.; MUSOKE, A. New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, suplemento III, p. 201-205, 1992.

O'DONOGHUE, P.J.; FRIEDHOFF, K.T.; VIZCAINO, O.G.; WEYRETER, H. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using semi-defined antigens in enzyme immunoassays. **Veterinary Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 1985.

OLIVEIRA, J.B.; MADRUGA, C.R.; MASSARD, C.I.; MACHADO, E.H.L.; ROCHA, J.M.; MENDONÇA, C.; BASTOS, J.A. Premunition immunity against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* evaluated by indirect fluorescent antibody technique and rapid agglutination test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, n. 1, p. 41-44, 1999.

OLIVÉ LEITE, A.M.; ARNONI, J.V.; SILVA, S.S.; FARIAS, N.A.; CRUZ, H.; NISHIKAWA, H. Serological study of bovine babesiosis in a marginal area of Brazil. In: NATIONAL VETERINARY HAEMOPARASITE DISEASES CONFERENCE, 8. St. Louis. **Proceedings...** april 10-12, p. 632-628, 1989.

OSAKI, S.C.; VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M.; VIDOTTO, M.C.; YOSHIHARA, E.; PACHECO, R.C.; IGARASHI, M.; MINHO, A.P. Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça Nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 77-83, 2002.

PATARROYO, J.H.; VARGAS, M.I.; BICUDO, P.L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 11, p. 301-308, 1982.

PATARROYO, J.H.; SANTOS, J.L.; RIBEIRO, M.F.B. ; FARIA, J.E. Diagnóstico da situação sanitária bovina do Estado de Minas Gerais, **VI Aspectos epidemiológicos na “Zona da Mata”** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19, 1994. Belém, Anais. Belém, p. 226, 1984.

RAMÍREZ-CRUZ, G.T.; DOMÍNGUEZ-ALPIZAR, J.L.; SIERRA, E.M. La inmunización contra *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* como método de control da babesiose bovina. **Revista Biomédica**, v. 8, p. 240-246, 1997.

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

RODRIGUES, A.; RECH, R.R.; BARROS, R.R.; FIGHERA, R.A.; BARROS, C.S.L. Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 121-125, 2005.

ROGERS, R.J. Observations on the pathology of *Babesia argentina* infections in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, p. 242-247, 1971.

ROSS, J.P.J.; LÖHR, K.F. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. **Research Veterinary Science**, v. 9, p. 557. 1968.

SACCO, A.M.S. Profilaxia da tristeza parasitária bovina: Por quê, quando e como fazer. **Circular Técnica, EMBRAPA-CPPSul**, Bagé, RS. ISSN 0100-8625, 2002.

SALCEDO, J.H.P.; RIBEIRO, M.F.B.; SANTOS, J.L.; FARIA, J.E. Epidemiologia das babesioses no Estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos fluorescentes na Zona da Mata-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, n. 3, p. 423-429, 1987.

SANTOS, H.Q.; LINHARES, G.F.C.; MADRUGA, C.R. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e ELISA. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 133-137, 2001.

SAS. SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, vol 2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 1989.

SHODA, L.K.M.; PALMER, G.H.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; GODSON, D.L.; BROWN, W.C. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1 β , interleukin-12, tumor necrosis factor alpha,

and nitric oxid and inhibit parasite replication in vitro. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 5139-5145. 2000.

SILVEIRA, J.M. **Patologia clínica veterinária: teoria e interpretação**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1988, 196 p.

SINK, C.A., FELDMAN, B.F. **Urianálise e hematologia laboratorial para o clínico de pequenos animais**. Editora ROCA, São Paulo, 2006, 111 p.

SMITH, R. Epidemiologia de la anaplasmosis y babesiosis bovina. **Salud Animal**, Publicación Científica 1, p. 267-278, 1982.

SOARES, C.O.; SOUZA, J.C.P.; MADRUGA, C.R.; MADUREIRA, R.C.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.

SOLANO, M. Babesiosis cerebral bovina. **Ciências Veterinárias**, VIII, 1, Costa Rica, 1986.

SOLARI, M.A.; NARI, A.; CARDOZO, H. Impact of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* on the production of beef cattle in uruguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, suppl. III, p. 143-149, 1992.

SOLORIO-RIVERA, J.L.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I. Epidemiologia de la babesiosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos. **Revista Biomédica**, v. 8, n. 1, p. 37-47, 1997.

SOLORIO-RIVERA, J.L.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I. Epidemiologia de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. **Revista Biomédica**, v. 8, n. 2, p. 95-105, 1997.

SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; CUNHA, N.C.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C.R.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bigemina* (SMITH & KILBRONE, 1893) (APICOMPLEXA: BABESIIDAE) em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, v. 11, p.198-199, Salvador. **Anais...Itabuna**, 1999.

SOUZA, A.P.; SURKAMP, V.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; FARIAS, L.M. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia* em bovinos no planalto norte de Santa Catarina. **Revista de Ciência Agroveterinária**, v. 1, n. 1., p. 21-23, 2002.

STICH, R.W.; SHODA, L.K.M.; DREEWEA, M.; ADLER, B.; JUNGI, T.W.; BROWN, W.C. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4130-4136, sept. 1998.

TORODOVIC, R.A. Serological diagnosis of babesiosis: a review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 7, p. 1-14, 1975.

TORODOVIC, R.A.; LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia spp* infections in Colombian cattle. **Tropenmed. Parasitology**, v. 27, p. 169-181, 1976.

ULEVITCH, R. J.; MATHISON, J. C.; CORREIA, J. S. Innate immune responses during infection. **Vaccine**, v. 22S, p. 25-30, 2004.

VANZINI, V.R.; RAMIREZ, L.M. Babesiosis y anaplasmosis bovina, diagnóstico epidemiologia y control. **Veterinária Argentina**, v. 3, n. 25, p. 137-190, 1995.

VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M.H.; ANDRADE, G.M.; BARBOSA, C.S.; FREIRE, R.L., VIDOTTO, M.C. Ocorrência de *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, suplemento 1, p. 184, 1995.

VIEIRA, M.I.B. **Resposta imune humoral contra *Babesia bovis* (BABES, 1888), *Babesia bigemina* (SMITH & KILBORNE, 1893) e *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) em bovinos submetidos a distintos métodos de controle do carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) na região de Bagé, RS.** 2002. 62f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VIEIRA, M.I.B.; LEITE, R.C.; SACCO, A.M.S.; SILVA, J.G.C. Estratégias de controle do carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) e influência na estabilidade enzoótica da babesiose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 4, p. 139-144, 2003.

ZINTL, A.; JEREMY, S.G.; SKERRETT, H.E.; MULCAHY, G. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. **Parasite immunology**, v. 27, p. 115-120, 2005.

YOUNG, A.S.; MORZARIA, S.P. Biology of *Babesia*. **Parasitology Today**, v. 2, n. 8, p. 211-217, 1986.

WRIGHT, I.G. Biochemical characteristics of *Babesia* and physicochemical reactions in the host. In: RISTIC, M.; KREIER, J.P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, Inc., cap. 6, 1981. p. 171-205.

WRIGHT, I.G.; GOODGER, B.V.; BUFFINGTON, G.D.; CLARK, I.A.; PARRODI, F.; WALTISBUHL, D.J. Immunopathophysiology of babesial infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, supplement, 11-13, 1989.

WRIGHT, I.G.; GOODGER, B.V. Pathogenesis of Babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., Cap. 6, 1988. p. 99-118.

WRIGHT, I.G. Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. **Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizooties**, v. 9, n. 2, p. 345-356, 1990.

ANEXO

Fórmulas das soluções utilizadas na IFI:

a) Solução A

Na₂HPO₄ 9,46 g
H₂O destilada 1000 ml

b) Solução B

KH₂PO₄ 11,34 g
H₂O destilada 1000 ml

c) Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2

Solução A 112,5 ml
Solução B 28 ml
NaCl 8,5 g
H₂O destilada q.s.p. 1000ml

Ajustar o pH para 7,2 com ácido clorídrico.

d) Solução A + B

Solução A 100 ml
Solução B 50 ml