



UFSCAR – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

NÍVEIS DE INFECÇÃO DE *Babesia bovis*, *B. bigemina* E *Anaplasma marginale* EM BÚFALOS CRIADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO

Thalita Athiê Néo
Bióloga

São Carlos
2016

**UFSCAR – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

NÍVEIS DE INFECÇÃO DE *Babesia bovis*, *B. bigemina* E *Anaplasma marginale* EM BÚFALOS CRIADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO

Thalita Athiê Néo

Orientadoras: Dra. Fernanda de Freitas Anibal – DMP/UFScar

Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira - EMBRAPA

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N438n Néo, Thalita Athiê
Níveis de infecção de Babesia bovis, B. bigemina e
Anaplasma marginale em búfalos criados no estado de
São Paulo / Thalita Athiê Néo. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
93 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Babesioses. 2. Anaplasmoses. 3. qPCR. 4.
Búfalo. 5. Biossensores. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Thalita Athiê Néo, realizada em 29/06/2016:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Prof. Dr. Rodrigo Gigliotti
IBILCE/UNESP

Profa. Dra. Ana Carolina Urbaczek
USP

Prof. Dr. Clóvis Westey Oliveira de Souza
UFSCar

Prof. Dr. Milton Duffles Capelato
UFSCar

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por essa conquista. Pela sabedoria, saúde e fé que me fez chegar até aqui. A força nos momentos difíceis, que somente o Senhor na sua paz descomunal pôde me oferecer. Pelas bênçãos diárias, que através da sua graça se fez presente em todos os momentos da minha vida. Glória a Deus!

Aos meus Pais, Jorge Erasmo Néó e Marinez Alves Domingos Néó, pelo incentivo, amor e confiança depositada em mim, durante todos esses anos.

Ao meu irmão Lucas Erasmo Néó, pelo carinho e apoio em toda minha jornada acadêmica.

Ao meu namorado Adriano de Souza Alvares, pelo amor, companheirismo, paciência e força em todos os momentos desta caminhada, que me fez crescer cada dia mais tanto pessoal quanto profissionalmente. Obrigada meu amor!

À minha vó Henriqueta pelo amor, carinho e fé depositada em mim durante todos esses anos, e por nunca me deixar desistir dos meus sonhos.

Às minhas orientadoras Dra. Fernanda de Freitas Anibal e Dra. Márcia Cristina de Sena Oliveira, pela orientação, amizade, apoio, dedicação e ensinamentos, que, sem dúvida, essa pesquisa seria impossível sem a participação de vocês. Muito Obrigada!

À toda Embrapa Pecuária Sudeste de São Carlos – SP, em especial o Laboratório de Sanidade Animal, onde foi realizado a maior parte desta pesquisa.

Aos colegas de laboratório, Talita, Clarissa, Thuane e Amanda pela ajuda, amizade e momentos inesquecíveis na nossa convivência diária.

Aos queridos Rodrigo Giglioti, Wilson Malagó Junior e Flávia Aline Bressani pela dedicação e ensinamentos para a realização deste projeto.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), a estrutura física, operacional e pela oportunidade dada em concretizar o doutorado e seguir o caminho da pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da UFSCar, pela contribuição em minha formação profissional.

À secretária Claudia Pastega do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (UFSCar), pela atenção, disposição e amizade em todas as vezes que precisei de você.

Aos meus queridos amigos: Genoveva, Rick, Carla, Felipe, Bianca, Rafael, Rebeca e Luciani pelo incentivo, amizade e momentos especiais que me fizeram muito feliz durante esta caminhada.

À amiga querida Dra. Ana Carolina Urbaczek pela amizade, ensinamentos e por estar presente em toda a minha jornada acadêmica.

Ao casal Luciano e Renata, pelas orações nos momentos difíceis e apoio incondicional ao longo desta etapa.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pela disponibilização de seus equipamentos e receptividade em seu grupo de pesquisa Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano), do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP- São Carlos/SP).

Ao Grupo GNano onde foi realizado a parte do experimento com biossensores, em especial os pesquisadores Nirton e Idelma pela disposição e auxílio durante os meses que passamos juntos no laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado (2012-2016) concedida durante os quatro anos de curso.

À todos que de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

DEDICO

**Aos meus pais, Jorge Erasmo Néó e
Marinez Alves Domingos Néó, ao meu irmão
Lucas Erasmo Néó, pelo apoio, carinho,
amor e incentivo em todos esses anos de
caminhada acadêmica. Obrigada por
acreditarem em mim. Amo muito vocês!**

“...tudo posso naquele que me fortalece” (Filipenses 4.13)

RESUMO

A babesiose e anaplasnose bovina são enfermidades distintas, que constituem o complexo chamado de Tristeza Parasitária Bovina (TPB), caracterizada por infecção das células vermelhas do sangue. Sua distribuição nos rebanhos ocasiona redução na produtividade e grandes perdas econômicas para a pecuária mundial. *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* são as espécies prevalentes no Brasil. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o vetor biológico das babesioses, e a anaplasnose, além do carrapato pode ser transmitida por moscas hematófagas ou fômites. Sabe-se que, os búfalos podem se infectar com os agentes da TPB, porém pouco é conhecido a extensão dessa infecção e como ela afeta a saúde desses animais. Assim o presente estudo teve o objetivo de determinar a frequência e o nível de infecção por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* em 108 búfalos d'água (50 bezerros e 58 fêmeas adultas), naturalmente infestados com o carrapato *R. (B). microplus*, oriundos de fazendas localizadas em áreas endêmicas para as babesioses no estado de São Paulo. Foram colhidas amostras de sangue dos capilares auriculares para confecção de esfregaços em lâminas de vidro e sangue da veia caudal para extração de DNA e determinação do volume globular (VG) pela técnica do microhematócrito. A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foi realizada com o soro dos bovinos, com o objetivo de diferenciar animais saudáveis dos animais infectados com *B. bovis*. Para tanto, antígenos provenientes de cultura foram imobilizados em eletrodos de ouro (150 nm de espessura) dando origem a um dispositivo biossensor utilizando o composto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como prova redox. Os esfregaços de sangue periférico foram corados com May Grunwald-Giemsa para a pesquisa dos hemoparasitas por meio de microscopia óptica. As extrações de DNA foram feitas usando o Easy-DNA™ Kit (Invitrogen). Foram testados protocolos de amplificação do DNA com *primers* específicos para *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* por meio de Nested PCR (nPCR) e PCR em tempo real quantitativo (qPCR), usado para estimar o número de cópias (NC) do gene do *citocromo b* (mt-cytB) de ambas as babesias e do gene de superfície 1b (*msp1b*) de Anaplasma em todas as amostras. Foram visualizados merozoítas de *B. bigemina* nos esfregaços sanguíneos de três bezerros do rebanho de Alambari (todos com menos de 0,1 de parasitemia). As técnicas moleculares, nPCR e qPCR foram mais sensíveis para a detecção dos parasitas que o exame direto das lâminas, sendo que as frequências de infecção foram de 20.37% e 100% para *B. bovis* e 59.26% e 100% para *B. bigemina*, respectivamente. O NC do gene do mt-cytB de *B. bovis* e *B. bigemina* mostrou efeitos significativos ($p < 0.05$) para rebanho-idade, espécies e sua interação. Os valores de NC foram superiores ($p \leq 0.05$) para *B. bovis* (2.81 ± 0.07) quando comparado a *B. bigemina* (2.61 ± 0.07) e *A. marginale* (0.57 ± 0.07). Estes dados sugerem uma elevada frequência de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* na população de búfalos estudada. Os testes preliminares do dispositivo de diagnóstico da infecção por *B. bovis* mostraram alterações na impedância do sistema usado e evidenciaram claramente que o biossensor é capaz de diferencia/detectar os animais infectados, podendo ser explorado para a detecção rápida da *B. bovis* e estendido também para a detecção de outros parasitas.

PALAVRAS CHAVE: babesioses, anaplasmoses, qPCR, búfalo, biossensores

ABSTRACT

Bovine babesiosis and anaplasmosis are distinct diseases, which constitute the syndrome called tick fever, characterized by infection of red blood cells. Its distribution in herds causes the reduction in productivity and high economic losses to livestock worldwide. *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* are the predominant species in Brazil. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is the biological vector of babesiosis and anaplasmosis may be transmitted by ticks, hematophagous flies, and fomites. It is known that the water buffalo can become infected with *Babesia* and *Anaplasma*, but little is known the extent of the infection and how it affects the health of these animals. Thus, the present study aimed to determine the frequency and the level of infection by *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* in 108 water buffalo (50 calves and 58 adult females), naturally infested with the tick *R. (B). microplus* raised in farms located in areas of endemic stability in São Paulo state. From each animal, a blood sample from the jugular vein was taken for DNA extraction and packed cell volume (PCV) determination. Samples from auricular vessels were taken for blood smears. The body temperature was measured with a mercury thermometer column. Electrochemical impedance spectroscopy technique was used to differentiate the serum of uninfected animals from the serum of animals infected with *B. bovis*. To this end, antigens derived from culture were immobilized on gold electrodes (150 nm thick) to give a biosensor device using the compound [Fe (CN) 6] 3- / 4-proof redox. The peripheral blood smears were stained with May-Grunwald-Giemsa for research of hemoparasites by optical microscopy. DNA extractions were performed using the Easy DNA TM Kit (Invitrogen). DNA amplification protocols were tested with primers specific to *B. bigemina*, *B. bovis*, and *A. marginale* using nested PCR (nPCR) and quantitative real-time PCR (qPCR). qPCR was used to estimate the number of copies of the gene cytochrome b (mt-cytB) of both babesias and *Anaplasma msp 1b* gene in all samples. Merozoites of *B. bigemina* were seen in blood smears of three calves from the Alambari herd (all less than 0.1 of parasitemia). Molecular techniques, nPCR, and qPCR, were more sensitive in the detection of parasites than direct examination of the blood smears and the frequencies of infection were 20:37% and 100% for *B. bovis* and 59.26% and 100% to *B. bigemina*, respectively. CN of the mt-cytB gene of *B. bovis* and *B. bigemina* showed significant effects ($p < 0.05$) of herd age, species, and their interaction. The CN values were higher ($p \leq 0.05$) for *B. bovis* ($2.81 \pm 0:07$) when compared to *B. bigemina* ($2.61 \pm 12:07$) and *A. marginale* ($0:57 \pm 0:07$). These data suggest a high frequency of infection by *B. bovis* and *B. bigemina* in the population of water buffalo studied. Preliminary testing of diagnosing infection with *B. bovis* device showed changes in the impedance in the system used and clearly demonstrated that the biosensor can detect infected animals, which can be exploited for rapid detection of *B. bovis* infections and also extended for the test to other parasites.

key words: *babesiosis*, *anaplasmosis*, qPCR, water buffalo, biosensors

Sumário

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE QUADROS	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Tristeza Parasitária Bovina	12
2.2 <i>Anaplasma</i> spp.	14
2.3 <i>Babesia</i> spp.	18
2.4 Biossensores	23
2.4.1 Configuração experimental dos biossensores/imunossensores eletroquímicos	24
2.5. Búfalos d'água	25
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Animais Experimentais e colheita das amostras	28
4.2 Técnicas hematológicas	29
4.3 Extração de DNA das amostras de sangue	29
4.4 Avaliação do DNA	30
4.4.1 Otimização das reações de PCR e Nested-PCR (nPCR) para <i>B.bigemina</i> ...	30
4.4.2 Otimização das reações de PCR e nPCR para <i>B.bovis</i>	31
4.4.3 Otimização das reações de PCR e nPCR para <i>Anaplasma marginale</i>	32
4.5 Padronização das reações da PCR em Tempo Real quantitativo (qPCR)	33
4.5.1 Otimização das reações de qPCR para <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i>	33
4.6 Construção da Curva de Calibração para qPCR de <i>Babesia bovis</i> , <i>Babesia bigemina</i> e <i>A. marginale</i>	35
4.6.1 Sensibilidade analítica para detecção <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i> e <i>A. marginale</i> .	37
4.7 Determinação do Número de cópias a partir da qPCR.....	37
4.8 Cálculo de Eficiência (E) da qPCR para a Quantificação de <i>Babesia bovis</i> ,.....	38
<i>Babesia bigemina</i> e <i>A. marginale</i>	38
4.9 Purificação do produto de PCR para clonagem	39
4.10 Clonagem do produto de PCR	39
4.11 Transformação em bactéria.....	40
4.12 Seleção das colônias recombinantes	40
4.13 Extração de DNA plasmidial	42
4.14 Sequenciamento dos plasmídeos recombinantes	42
4.15 Espectroscopia de impedância eletroquímica	42
4.15.1 Preparação do eletrodo	44
4.15.2 Detecção de anticorpos anti- <i>B. bovis</i>	45
5. RESULTADOS.....	47

5.1 Dados hematológicos	47
5.2 Resultados dos testes de PCR e nPCR para as amostras de DNA extraídas de sangue dos animais.....	48
5.2.1 <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i>	48
5.2.2 <i>A. marginale</i>	51
5.3 Especificidade e sensibilidade da qPCR	51
5.4 Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)	54
5.5 Resultados do Biossensor	58
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Corpúsculos intra-eritrocitários de *Anaplasma marginale* (setas) em esfregaço sanguíneo corado com Giemsa. 15
- Figura 2:** Merozoítas de *Babesia bovis* em esfregaço de sangue corado por Giemsa. 19
- Figura 3:** Merozoítas de *Babesia bigemina* em esfregaço de sangue corado com Giemsa. 23
- Figura 4:** Apresentação de um biossensor. O antígeno presente na amostra de interesse interage com o anticorpo imobilizado no transdutor, resultando em um sinal que pode ser visualizado em um computador acoplado no sistema (HOLFORD et al., 2011). 24
- Figura 5:** Reação de clivagem do X-gal pela β -galactosidase. (1) 5-bromo-4-cloro-3hidroxiindol, (2) 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo (AZUL). 41
- Figura 6:** Representação de uma célula eletroquímica típica com 3 eletrodos. Eletrodo de trabalho (ouro), contra-eletrodo (placa de platina) e eletrodo de referência (Ag/AgCl). 43
- Figura 7:** Lâminas de vidro (5 cm x 5 cm) contendo 8 conjuntos de eletrodos e eletrodo individual após o corte da lâmina. Cada conjunto de eletrodos é formado por um eletrodo de platina (contra eletrodo central) e dois eletrodos de ouro (eletrodo de trabalho e contra eletrodo). 43
- Figura 8:** Merozoíta de *B.bigemina* em eritrócito de sangue de búfalo corado por Giemsa (1000 X). 47
- Figura 9:** Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *B. bovis* por Nested PCR. Poço 1= padrão de pares de bases; poços 2 4 = amostras positivas na PCR; poços 5-7 =amostras positivas na nPCR,, poço 8= controle negativo da reação. 48
- Figura 10:** Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *B. bigemina* por Nested PCR. Poço 1= padrão de pares de bases; poços 2 4 = amostras positivas na PCR; poços 5-7 =amostras positivas na nPCR,, poço 8= controle negativo da reação. 49

- Figura 11:** Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *A. marginale*. Poço 1= padrão de pares de bases, poços 2-4= PCR positivo, poço 5= controle negativo da reação. 50
- Figura 12:** Curva de dissociação para determinação dos amplicons de DNA de mt-cyB de *B. bovis* e *B. bigemina* e do fragmento do gene MSP1b de *A. marginale* testadas para isolados de cada espécie analisadas em triplicatas. *B. bigemina*= 76,0°C; *B. bovis*=77,5°C; *A. marginale*=83°C. 51
- Figura 13:** Curvas de calibração construídas à partir de amostras de DNA diluídas de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* para determinação do ponto de corte. . 52
- Figura 14:** Amplificações dos produtos da qPCR de *B. bovis* e *B. bigemina*. Para ambas espécies, todas as amostras foram consideradas positivas baseadas no ponto de corte (Cq=39). Não houveram amplificação dos controles negativos. 54
- Figura 15:** Amplificações dos ensaios de qPCR para detecção e quantificação de *A. marginale*. Para este ensaio, nota-se que mais da metade das amostras de DNA foram negativas para esta espécie, pois amplificaram após o ponto de corte estabelecido para sua detecção (Cq=36). 55
- Figura 16:** Diagrama de Nyquist (impedância imaginária x impedância real) obtidos utilizando o eletrodo proposto para o eletrodo de trabalho sem modificação (preto) e após a imobilização de antígenos de BB e bloqueio com monoetanolamina no mesmo eletrodo de trabalho (vermelho). 58
- Figura 17:** Diagramas de Nyquist (impedância imaginária x impedância real) (b) para os soros positivo e negativo de *Babesia bovis* em diferentes eletrodos com o tempo de exposição dos eletrodos ao soro de 20 minutos. 59
- Figura 18:** Diferença entre a resistência de transferência de carga calculada (via software do equipamento) para cada eletrodo antes e após a exposição a cada tipo de soro. Três soros positivos de diferentes animais foram testados e um soro negativo foi medido em três eletrodos diferentes. 59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Médias gerais e os erros padrão do volume globular (VG%) em bubalinos em função da idade e do rebanho. 46
- Tabela 2:** Resumo da detecção molecular de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bubalinos determinados por nPCR e qPCR de acordo com o rebanho e idade..... 49
- Tabela 3:** Valores médios da eficiência da reação (E), coeficiente de determinação e slope para determinado para cada espécie estudada. 53
- Tabela 4:** Resumo da detecção molecular de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *A. marginale* em búfalos d'água determinado por nPCR e qPCR, de acordo com o rebanho e idade. 56
- Tabela 5:** Médias e erros padrão do número de cópias (NC) do gene Mt-cyt B de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *A. marginale* de qPCR em amostras de sangue de búfalos d'água, de acordo com a região e categoria estudada. 57

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Sequência dos nucleotídeos dos *primers* utilizados na amplificação do DNA de *Babesia* spp. e *B. bigemina* com o tamanho dos produtos de amplificação. 31
- Quadro 2:** Sequência de nucleotídeos dos *primers* para *B. bovis* e com os respectivos tamanhos dos produtos de amplificação na PCR e nPCR. 32
- Quadro 3:** Sequências iniciadoras externas *primers* para amplificação de DNA de *Anaplasma marginale*. 33
- Quadro 4:** Sequências iniciadoras utilizados na quantificação do DNA de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* pela técnica de qPCR. 34
- Quadro 5:** Ciclos adotados para as reações de qPCR. 35
- Quadro 6:** Sequência do fragmento de 308 pares de bases do gBloks® sintetizado para confecção da curva de calibração para *A. marginale*. Em negrito a sequência de 95 pares de bases do amplicon de *A. marginale*. 36

1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e as doenças que ele transmite se constituem em uma das principais causas de prejuízos para os produtores de bovinos em toda a América Latina (NARI, 1995). As babesioses bovinas são provocadas por duas espécies de protozoários do gênero *Babesia*, *B. bovis* e *B. bigemina*. Estes parasitas têm como vetor biológico o carrapato *R. (B.) microplus*, ácaro com ampla distribuição no território brasileiro.

As perdas econômicas ocasionadas pela Tristeza Parasitária Bovina (TPB) no Estados Unidos no início do século XX levaram a investigações que demonstraram, pela primeira vez, o envolvimento de um artrópode na transmissão de doenças. Além da grande importância dessa descoberta para os estudos epidemiológicos de várias enfermidades, esse conhecimento possibilitou a erradicação da babesiose bovina nos Estados Unidos, por meio da erradicação do transmissor, *Boophilus annulatus* (KREIER, 1977). No Brasil, devido a sua grande extensão territorial, a erradicação do carrapato não é viável e desse modo, o conhecimento da relação parasita hospedeiro e da epidemiologia da TPB torna-se muito importante para que novas técnicas de controle possam ser desenvolvidas.

As áreas de ocorrência da TPB são classificadas como livres, de estabilidade ou de instabilidade endêmica, dependendo, da dinâmica da população dos carrapatos vetores (MAHONEY e ROSS, 1972). A estabilidade endêmica, situação que ocorre na maior parte do Brasil, caracteriza-se pela transmissão frequente das babesias para os bovinos, sendo que a infecção primária ocorre logo após o nascimento quando estão protegidos pela imunidade passiva conferida pelos anticorpos colostrais e por fatores não específicos (presença de timo, hemoglobina fetal, etc.). As áreas de instabilidade caracterizam-se pela ocorrência mais tardia da primeira infecção e prolongados períodos sem a presença dos carrapatos, o que reduz os níveis de anticorpos dos animais. Nessa situação, a exposição a carrapatos infectados pode originar surtos graves de babesioses (De WALL, 1996).

Sabe-se que os bovinos após a infecção primária pelos agentes da TPB tornam-se portadores sadios, e o diagnóstico por meio de exame direto de esfregaços de sangue periférico não apresenta sensibilidade suficiente para que os parasitas possam ser detectados. Os estudos epidemiológicos são feitos geralmente usando-se testes sorológicos, que detectam anticorpos específicos contra os parasitas. Segundo WAGNER et al., 1992, uma das limitações desses testes é que eles indicam a exposição ao agente, mas não informam sobre o estágio da infecção. Usualmente as técnicas moleculares são sensíveis o suficiente para detectar bovinos portadores (OLIVEIRA et al., 2008).

Em áreas de estabilidade endêmica, onde os bovinos estão frequentemente na presença do ectoparasita, taxas de 100% da doença foram identificadas, através da técnica de amplificação do DNA do parasita tanto em vacas, como em bezerros. Estes estudos, evidenciaram que bovinos de raças zebuínas, apesar de apresentarem uma resistência à TPB, permanecem infectados e servem como reservatórios para essa enfermidade (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005).

A transmissão transovariana de *Babesia* em *R. (B.) microplus*, é considerada um fator de grande importância para a manutenção desta endemia, e explica a sua vasta distribuição geográfica (MEHLHORN & SCHEIN, 1984).

Usando técnicas moleculares Oliveira et al. (2005) estudaram a parasitemia por babesias em uma região endêmica do estado de São Paulo, e mostraram que, bovinos adultos são portadores sadios dos agentes da TPB e somente animais jovens apresentavam sinais clínicos da infecção. Pôde-se também verificar que os carrapatos que se alimentaram do sangue dos bezerros, foram mais eficazes na transmissão da babesiose para seus descendentes.

Poucos estudos foram realizados com bubalinos, mas sabe-se que eles podem se contaminar com os agentes da TPB. Em estudos conduzidos por Rajput et al. (2005) no Paquistão, búfalos e bovinos criados no mesmo sistema, foram comparados através da técnica de esfregaço sanguíneo, quanto à prevalência de infecção por *Anaplasma marginale*. As taxas de infecção verificada para os bovinos, foram 26,82% superiores quando comparadas aos bubalinos. Segundo Gomes et al. (2008), estudos realizados com búfalos criados na região de Selvíria (MS), mostraram soro conversão para a

anaplasmosose e babesioses, devido a transmissão dos anticorpos presentes no colostro aos bezerros.

De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Bubalinos, o rebanho nacional de búfalos atualmente está estimado em 2,3 milhões, e o Brasil apresenta um grande potencial para a produção, principalmente de leite. Os animais da raça Mediterrâneo (origem italiana), possuem aptidão para a produção de carne e leite e são considerados os mais numerosos no Brasil, seguido das raças Murrah e Jafarabadi.

De forma geral, os bubalinos são animais de fácil adaptação, devido a sua rusticidade, além de apresentarem uma elevada resistência aos parasitas e doenças. Apesar dos efeitos das doenças sobre os búfalos serem muitas vezes pouco evidentes, não se conhece a real extensão e dos efeitos da infecção pelos agentes da TPB nesses animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tristeza Parasitária Bovina

A Anaplasmosose e babesiose formam o complexo denominado no Brasil de Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (GREENDA, 2008), que têm como agentes os protozoários do gênero *Babesia* e a bactéria *Anaplasma marginale*. Estes parasitas são responsáveis por grandes perdas econômicas no Brasil quando acometem bovinos (GRISI et al., 2002). No território brasileiro, além de *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910), ocorrem *B. bigemina* (SMITH & KILBORNE, 1893) e *B. bovis* (BABES, 1888). Os protozoários são transmitidos pelo carrapato ixodídeo *R. (B.) microplus* (BERENQUER, 2006), que é o único vetor biológico conhecido no Brasil. Esses hemoparasitas provocam reduções drásticas na produtividade dos rebanhos mesmo que não se considere os gastos com acaricidas. A sua distribuição localiza-se entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul, sendo encontradas em várias regiões da África, Ásia, Europa, América do Sul e Central, Ilhas do Caribe e do Pacífico (KUTLER, 1998). O carrapato *R. (B.) microplus* encontra condições climáticas favoráveis para seu desenvolvimento no Brasil, do extremo Sul em direção ao Norte ou Nordeste, possibilitando completar até 5 gerações por ano, em locais com temperaturas médias anuais acima de 17°C. Estações secas rígidas podem reduzir a sobrevivência do carrapato, pela redução da postura, já que os estágios de vida livre são muito dependentes das condições de umidade ambiental (FURLONG E EVANS, 1991).

Estima-se, que as perdas econômicas devido ao *R. (B.) microplus*, relativa à redução da produção de leite e da carne bovina no Brasil transcende a ordem de US\$ 3 milhões (GRISI et al., 2014).

A distribuição geográfica da TPB é dependente da presença do ectoparasita vetor, que precisa de condições climáticas favoráveis para finalizar seu ciclo biológico (MADRUGA et al., 1993, SACCO, 2002). A doença é mais prevalente em países tropicais e subtropicais, afetando indústrias de gado e causando um enorme impacto econômico no mundo todo (NAYEL et al., 2012).

MAHONEY e ROSS (1972) classificaram a ocorrência das babesioses em áreas livres, área de instabilidade ou estabilidade endêmica, de acordo com a dinâmica

populacional dos carrapatos. As áreas livres caracterizam-se pela ausência do carrapato vetor, devido as condições climáticas que impedem o seu desenvolvimento (MADRUGA et al., 1993, SACCO, 2002). Nas áreas de instabilidade endêmica têm-se a presença de uma estação fria ou seca que acaba impedindo o desenvolvimento da fase de vida livre do ácaro durante uma época do ano. Com isso, os animais passam um longo tempo sem contato com o carrapato e os protozoários inoculados por ele e assim, os títulos de anticorpos caem a níveis incapazes de conferir proteção contra os hemoparasitas, quando a população de carrapatos volta a crescer na estação quente (De WALL, 1996). Pesquisas realizadas no Brasil mostraram áreas de instabilidade endêmica na região de Londrina-PR (VIDOTTO et al., 1997) e também a mesorregião norte Fluminense-RJ para *B. bigemina* (SOUZA et al., 2000b).

Áreas de estabilidade endêmica são evidenciadas pela presença do vetor durante todos os meses do ano, sendo raros os casos de doença clínica (MADRUGA et al., 1993, SACCO, 2002). Um estudo realizado por Oliveira-Sequeira e pesquisadores (2005), através do uso de técnicas de amplificação de DNA, verificou-se que em áreas endêmicas as taxas de infecção das duas espécies de *Babesia* são semelhantes em bovinos jovens e adultos. Assim, os agentes da TPB estão simultaneamente presentes na maioria dos animais criados nas regiões de estabilidade endêmica (BRITO et al., 2013).

Os métodos de profilaxia usados para controlar a TPB são: a quimioprofilaxia, o controle dos vetores, a premunição e o uso de vacinas (GONÇALVES, 2000).

A quimioprofilaxia consiste na utilização de drogas específicas em doses subterapêuticas. Baseia-se em 2-4 aplicações de subdoses de tetraciclina (24mg/kg/PV), pela via IM, com intervalos de 21 dias para anaplasrose, já para a babesiose faz-se uso de derivados das diamidinas e do imidocarb. A dose terapêutica deste é de 3,5 mg/kg de peso, em dose única, via intramuscular. De acordo com Ristic & Montenegro-James (1988), o controle do carrapato pode ser feito de duas formas: erradicação e controle estratégico. O controle estratégico no Brasil é usado em determinadas áreas e de maneira geral nota-se a utilização indiscriminada de certos produtos carrapaticidas (OLIVEIRA et al., 1993). Já a premunição, é uma metodologia muito usada, com o objetivo de proporcionar o desenvolvimento de imunidade contra as

hemoparasitoses (LIMA, 1991, NOGUEIRA et al., 1991) e consiste na inoculação de pequena quantidade de sangue de animais portadores sadios nos animais a serem imunizados. Essa técnica confere uma proteção à infecção, mesmo que tenham variações entre as amostras das espécies dos hemoparasitas (LIMA, 1991).

Medidas específicas de controle geralmente não são necessárias para animais nascidos em áreas endêmicas, já que sua imunidade adquirida no colostro é gradualmente reforçada por repetidas exposições aos microrganismos inoculados pelos carrapatos.

Inúmeros métodos de vacinação têm sido estudados e desenvolvidos em condições de campo e de laboratório, como formas imunoproláticas contra a tristeza parasitária bovina (CALLOW & MELLORS, 1996). De acordo com Dias (2001), a vacinação pode ser realizada com o uso da vacina atenuada em forma de tríplice (*A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*), porém, pode ocasionar uma manifestação clínica da doença, sendo que em alguns casos se torna necessário tratar os animais para evitar óbitos. Vacinas efetivas não estão ainda disponíveis para uso a campo.

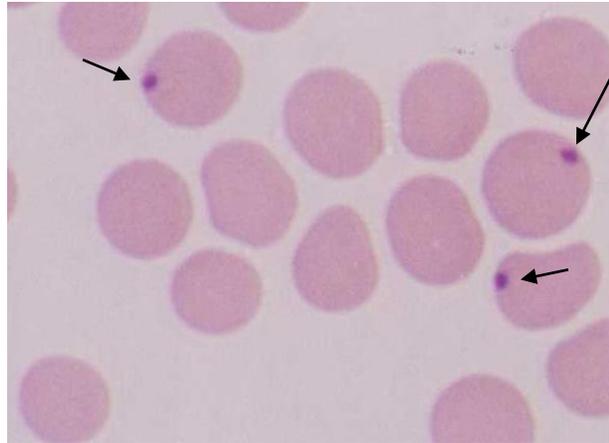
2.2 *Anaplasma* spp

O gênero *Anaplasma* compreende duas espécies que acometem bovinos, *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) e *A. centrale* (THEILER, 1911). *A. marginale* é o patógeno transmitido por carrapatos mais prevalente em bovinos no mundo. Essa bactéria da ordem *Rickettsiales* e a família Anaplasmataceae, são encontradas em seis continentes sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em gado criado em regiões temperadas, tropicais e subtropicais (KOCAN et al., 2010). Além do gado, *A. maginale* foi diagnosticada em outras espécies de animais domésticos e selvagens, tais como a girafa (KUTTLER e JOHNSON, 1986) e búfalos d'água (SILVA, et al., 2014).

Anaplasma sp são bactérias gram negativas, parasitas intracelulares obrigatórios, encontrados unicamente dentro de vacúolos ligados à membrana citoplasmática do hospedeiro (DUMLER et a., 2001). A morfologia de *Anaplasma* pode variar de acordo com a localização geográfica da doença (JAIN, 1993). São observados como “corpúsculos de inclusão” violeta escuros, arredondados e pequenos, com

aproximadamente 0,3-1,0 μm dentro da hemácia. Geralmente é encontrado um microrganismo por hemácia e ele se aloja na margem exterior, como está demonstrado na **(figura 1)**.

Figura 1: Corpúsculos intra-eritrocitários de *Anaplasma marginale* (setas) em esfregaço sanguíneo corado com Giemsa.



Fonte: OLIVEIRA (2002).

A. centrale, é usada como vacina viva para imunização de bovinos, por ser menos patogênica quando comparada à *A. marginale* (de la FUENTE et al., 2005).

Em 1910, Theiler, na África do Sul, designou de “pontos marginais”, os parasitas encontrados dentro das hemácias e distinguiu a anaplasmoze da babesiose. As inclusões foram observadas e localizadas marginalmente em eritrócitos de bovinos anêmicos (THEILER, 1911). A anaplasmoze bovina foi largamente diagnosticada nas regiões tropicais, subtropicais e em muitas zonas temperadas do continente europeu, após as publicações de THEILER (1910-1911), (KOCAN et al., 2010).

Segundo Kocan (1992), a infecção por *A. marginale*, ocorre durante o repasto sanguíneo, quando os eritrócitos dos bovinos infectados são ingeridos pelo carrapato. A rickettsia se desenvolve nas células intestinais, o que leva a infecção de outros tecidos do carrapato, inclusive a glândula salivar, que é a fonte de transmissão para os bovinos durante a alimentação.

O ciclo da anaplasose no hospedeiro bovino se inicia pela adesão dos corpúsculos iniciais da rickettsia à superfície dos eritrócitos, que leva a invaginação da membrana citoplasmática, formando um vacúolo parasitóforo a partir da membrana da célula hospedeira (BUENING, 1979). A multiplicação de *A. marginale* no vacúolo é realizada por fissão binária, formando enormes colônias que podem conter milhares de organismos (KOCAN et al., 2010). Esta bactéria pode ser transmitida de forma mecânica por moscas hematófagas ou fômites contaminados com sangue, e biologicamente, por carrapatos (BRITO et al., 2010; GEALE, 2011). A transmissão mecânica por artrópodes tem sido relatada em dípteros sugadores de sangue, tais como as moscas dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys*, e mosquitos (FOIL, 1989). Desta forma, este tipo de transmissão é considerado a principal via de disseminação de *A. marginale* em áreas da América do Sul, América Central e África, onde os vetores não ocorrem (EWING, 1981). Segundo Kocan et al. (2004), a transmissão biológica de *A. marginale* é realizada por aproximadamente 20 espécies de carrapatos, sendo que os principais vetores biológicos são os carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus* spp. nos trópicos e o *Dermacentor* spp. em áreas temperadas.

Nos carrapatos a transmissão pode ocorrer de duas formas diferentes: transestadial (de um estágio para o outro) e a intraestadial (dentro da mesma fase) (KOCAN et al., 1992). A transmissão interstadial de *A. marginale* foi demonstrada em carrapatos de três hospedeiros: *D. andersoni* e *D. variabilis* nos Estados Unidos (KOCAN, 1986), e *R. simus* na África do Sul (POTGIETER et al., 1983), e carrapatos de um hospedeiro: *R. annulatus* em Israel, América Central, América do Sul, e México (SAMISH et al., 1993).

A transmissão intraestadial de *A. marginale* é efetuada por carrapatos adultos machos (DE LA FUENTE et al., 2001) que podem transmitir a bactéria, ao se deslocarem de um animal para o outro (KOCAN et al., 1992).

Segundo Zaugg e Kuttler (1984), a transmissão transplacentária de *A. marginale* pode acontecer quando vacas sofrem anaplasose clínica durante a gestação (KOCAN et al., 2003, SANTAROSA et al., 2013). A transmissão transplacentária de *Anaplasma* foi relatada também em vacas portadoras do microrganismo (POTGIETER & VAN RENSBURG, 1987; RIBEIRO et al, 1995).

O período de incubação da *A. marginale* varia de duas a quatro semanas, uma vez que depende da sensibilidade do hospedeiro e da quantidade de parasitas inoculados (MARQUES, 2003).

Segundo Taylor et al. (2010), os sinais clínicos da Anaplasmosose incluem anemia grave, fraqueza, desidratação, febre e icterícia. A fase aguda da doença é evidenciada por febre (39,4 - 41,7°C) que permanece por 3 a 7 dias.

De acordo com Mahoney (1977) a febre nos animais, está associada ao surgimento do parasita na circulação sanguínea, que é considerado o primeiro sinal clínico da doença, sendo diagnosticado no esfregaço sanguíneo.

O quadro de anemia é imunomediada por anticorpos, que promovem a hemólise extravascular, por lesarem as membranas dos eritrócitos parasitados (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Depois da infecção, aumenta gradativamente o número de eritrócitos infectados que são fagocitados por macrófagos, sendo que muitas células não infectadas podem ser também fagocitadas aumentando o risco de morte dos animais afetados (KOCAN et al., 2003)

O diagnóstico da anaplasmosose bovina pode ser realizado através da técnica de esfregaço sanguíneo, corado por Giemsa, em animais com sintomas clínicos, na fase aguda da doença. Inúmeros testes sorológicos têm sido empregados extensivamente para estudos epidemiológicos (DREHER et al., 2005).

Métodos moleculares possuem um alto nível de sensibilidade e especificidade na identificação do DNA de *A. marginale* (GALE et al., 1996, MOLAD et al., 2006). Entretanto, os ensaios de PCR convencionais não permitem uma estimativa precisa da concentração inicial do DNA alvo do parasita, já que eles podem fornecer apenas resultados qualitativos. Um ensaio quantitativo com alta reprodutibilidade é necessário para determinar o grau de infecção de *A. marginale*. Ensaios com PCR em tempo real (qPCR) foram desenvolvidos para a quantificação de cópias do gene *msh5* de *A. marginale*, em carrapatos infectados (FUTSE et al., 2003). Esses métodos, embora sensíveis, são baseados na detecção e amplificação do DNA usando um intercalante de dupla fita fluorescente o SYBR Green (corante verde). Em um estudo realizado por Carelli e colaboradores (2007), foi feito um ensaio de qPCR em tempo real baseado na

tecnologia TaqMan, que é descrita para uma detecção rápida e quantificação precisa do DNA de *A. marginale* presente em amostras de sangue de gado infectado naturalmente.

2.3 *Babesia* spp.

As babesioses bovinas são enfermidades causadas por protozoários do gênero *Babesia*, parasita que pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, ordem Eucoccidiorida, sub-ordem Piroplasmorina e família Babesiidae (BOCK et al., 2004).

Em 1888, um pesquisador da Romênia chamado Victor Babés começou a investigar as causas de uma doença caracterizada por anemia hemolítica que acometia bovinos na Europa. Este cientista conseguiu associar essa enfermidade ao surgimento de microrganismos no interior de eritrócitos dos animais infectados, designando os de *Haematococcus bovis* (UILENBERG, 2006).

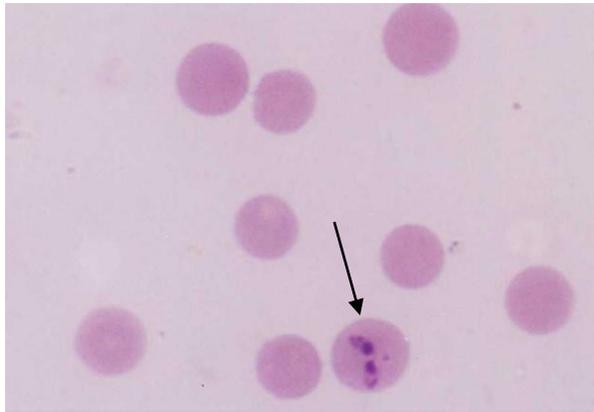
Foram Smith & Kilborne (1893), que no final do século XIX, observaram os microrganismos intraeritrocitários em bovinos com sintomas da chamada “Febre do Texas” no Sul dos Estados Unidos.

O primeiro diagnóstico da babesiose no Brasil foi feito por Francisco Fajardo em 1901. Ele detectou a doença através da técnica de esfregaço sanguíneo, e conseguiu visualizar os protozoários presentes no sangue dos animais (FONSECA & BRAGA, 1924).

As babesias morfologicamente são protozoários piriformes, que possuem núcleo, nucléolo e três membranas e, no limite anterior, o chamado "complexo apical", um conjunto de organelas secretoras, composto por *roptrias* e micronemas que produzem enzimas responsáveis pela penetração dos parasitas nas células vermelhas (KAKOMA & MELHORN, 1994).

De acordo com Taylor e pesquisadores (2010), *B. bovis* é conhecida por ser pequena, pleomórfica, tipicamente reconhecida como pequenos corpos arredondados ou como corpos pareados em forma de pêra, formando um ângulo obtuso no interior do eritrócito. Suas medidas variam de 1,0-1,5 µm as formas arredondadas e os corpos em formato de pêra 1,5-2,4 µm de tamanho como podemos visualizar na **(figura 2)**.

Figura 2: Merozoítas de *Babesia bovis* em esfregaço de sangue corado por Giemsa.



Fonte: OLIVEIRA (2002).

Para babesiose são conhecidas duas formas de infecção por *Babesia* pelo qual as fêmeas adultas do *R. (B.) microplus* podem contrair os protozoários. A primeira é pela via alimentar, quando a fêmea ingere sangue infectado com os merozoítas e a segunda é pela via vertical, devido à transmissão transovariana do protozoário no ácaro. De acordo com os pesquisadores Kakoma & Melhorn (1994), os pioneiros no estudo sobre a existência de uma forma de reprodução sexuada das babesias nos carrapatos foram Koch e Kleine no ano de 1906. Essas formas diferentes dos protozoários foram então chamadas de corpos estrelados ou raiados, que são os gametas das babesias. Esses corpos estrelados se unem, no intestino da fêmea (teleógina), dando origem aos oocinetos, que penetram dentro da célula da parede intestinal. Através do processo de fissão múltipla, os oocinetos se desenvolvem e multiplicam-se, rompendo as células e liberando os esporocinetos na hemolinfa (FARIAS, 1995).

Após a reprodução sexuada no intestino dos carrapatos, vários ciclos de reprodução assexuada ocorrem nos diversos órgãos, chegando até as glândulas salivares (BOCK et al., 2004 HODGSON, 1992). Durante o repasto sanguíneo do carrapato, este inocula as formas infectantes da *Babesia spp*, os esporozoítas, que estão presentes nas suas glândulas salivares (RADOSTITS et al., 2008). Em seguida, ao penetrarem no interior da membrana celular dos eritrócitos, através da endocitose,

os esporozoítas se transformam em trofozoítas (quando se alimentam) e merozoítas, quando se multiplicam por merogonia ou fissão binária (FRIEDHOFF, 1988).

O ciclo final de esporogonia de *B. bovis* ocorre nas glândulas salivares das larvas (carrapatos) cerca de 2 a 3 dias após a fixação no hospedeiro bovino e, de *B. bigemina*, nas glândulas salivares de ninfas de carrapatos após 8 a 10 dias, quando as formas infectantes, ou esporozoítas, são produzidas (CALLOW & HOYTE, 1961; RIEK, 1964, 1966, CALLOW, 1968).

As babesioses no Brasil são transmitidas exclusivamente pelo carrapato monoxeno *R. (B.) microplus*, que é considerado seu principal vetor e um dos ectoparasitas do gado mais importantes, devido ao seu impacto direto na transmissão de patógenos que acometem na produção da carne, leite e também couro (BOCK et al., 2004). A disseminação desse carrapato ocorre nos países da América Central e do Sul, Ásia, Sudeste da África e Austrália (GUGLIELMONE, 1995, BOCK et al., 2004).

B. bovis é conhecida por ser o organismo mais patogênico, quando comparado a *B. bigemina*, podendo provocar altas taxas de mortalidade em bovinos. Esta espécie de babesia apresenta predileção pelos capilares das vísceras como baço, fígado, rins, pulmão, coração e cérebro (MASSARD, FREIRE, 1985, EVERITT et al., 1986, BROWN et al., 2006, CHAUVIN et al., 2009). Também é considerado um dos mais importantes parasitas do sangue, que afetam bovinos e búfalos e nas suas formas agudas, reduz o desempenho produtivo dos animais afetados (TALKHAN et al., 2010, ZIAPOUR et al., 2011).

A doença clínica causada por *B. bigemina* é caracterizada por hemoglobinúria, febre e anemia aguda. Em contraste, a infecção por *B. bovis* pode ser mais severa e frequentemente fatal, com sintomatologia nervosa caracterizada por incoordenação motora, salivação anormal, ranger de dentes e letargia (FLORIN-CHRISTENSEN et al., 2014).

Os sinais clínicos mais frequentemente observados nas babesioses são: o isolamento do animal, inquietação, procura de local sombreado para deitar-se. As mucosas apresentam-se avermelhadas e inflamadas, à medida que os glóbulos vermelhos vão se rompendo, elas tornam-se pálidas e podem apresentar os primeiros sinais de anemia. Esta fraqueza pode ocorrer de forma muito rápida, com 75% ou mais

dos eritrócitos sendo destruídos em pouco tempo, levando a quadros de hemoglobinúria grave. Depois do início da febre, o quadro crítico do animal geralmente se resolve em uma semana. Caso o animal sobreviva, há queda de peso grave, queda na produção de leite, possíveis abortos e recuperação lenta.

Segundo Brandão & Hagiwara (2002), a esplenomegalia é consequência do aumento de sua microvasculatura interna, devido à liberação sistêmica de mediadores inflamatórios. Os sinais clínicos como anemia, febre, hemoglobinúria, icterícia em animais, onde existem carrapatos *R. (B.) microplus*, geralmente são suficientes para justificar um diagnóstico de babesiose.

Para a confirmação do diagnóstico, exames de esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa, irão revelar a presença dos hemoparasitas nos eritrócitos (TAYLOR et al., 2010).

A análise sanguínea em ruminantes é uma notável extensão do exame físico, sendo sugestivas algumas condições de doença quando este revela incertezas para finalizar o diagnóstico (JONES, 2007). Diferenças hematológicas dentro dos intervalos de normalidade têm sido mostrada em bovinos e bubalinos em relação a idade, sexo, idade, alimentação e região onde vivem (JUNIOR et al., 2001, FERNÁNDEZ et al., 2005, SAUT, 2006). Em um estudo desenvolvido por França et al. (2011), mostrou que os valores hematológicos de células vermelhas e leucócitos sofreram variações de acordo com a idade dos búfalos avaliados, com 6, 12 e 24 meses de idade, respectivamente.

As babesioses são tradicionalmente diagnosticadas pela identificação dos parasitas no esfregaço sanguíneo, usando o microscópio, contudo, este método não é sensível o suficiente para detectar os parasitas na fase subclínica ou crônica da infecção (FAHRIMAL et al., 1992). Em contraste, a técnica molecular baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR), tem apresentado um potencial para detectar diretamente o parasita com elevada sensibilidade, 100 vezes maior, quando comparada aos métodos de diagnóstico direto com esfregaços sanguíneos (BOSE et al., 1995; FAHRIMAL et al., 1992, MOSQUEDA et al., 2012). Pesquisas desenvolvidas por Oliveira-Sequeira et al. (2005) e Oliveira et al.(2008), mostraram que através dessa técnica de biologia molecular, foi possível o diagnóstico do DNA de parasitas em

amostras de sangue de animais aparentemente saudáveis, infectados com *B. bovis* e *B. bigemina* em área endêmica para as babesioses. A reação de nPCR demonstrou-se altamente sensível na detecção de *B. bovis* em 94 búfalos positivos para esta espécie de babesia, quando comparadas à metodologia direta de esfregaços sanguíneos dos animais estudados (OBREGÓN et al., 2012).

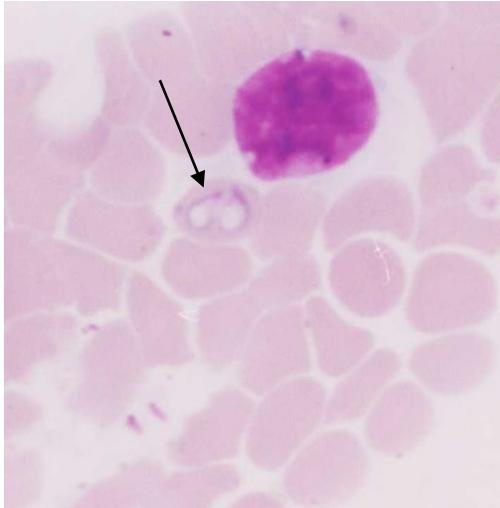
Após o surgimento da PCR quantitativa, com o advento de novas tecnologias moleculares, surgiu o PCR em tempo real que fornece medições simultâneas da expressão do gene em várias amostras diferentes (HIGUCHI et al., 1993). A qPCR baseia-se em um método que faz o uso de reagentes fluorescentes que permite acompanhar o andamento da reação em tempo real (MONIS et al., 2005).

Usando a técnica de qPCR Gigliotti (2013), mostrou que a frequência de parasitemia por *B. bovis* foi de 100%, sendo que o método sorológico (ELISA-teste) detectou apenas 74,39% de bovinos infectados pelo protozoário. BILHASSI et al., 2014 também usaram qPCR para estimar o nível de infecção por *B. bovis* em animais da raça Angus, Nelore e cruzados encontrando altas frequências de infecção em todos os grupos de animais estudados.

Outra forma de diagnóstico amplamente usada, baseia-se na detecção de anticorpos contra os parasitas, como a imunofluorescência indireta e os testes imunoenzimáticos (BOSE et al., 1990, ARAUJO et al., 1998).

B. bigemina é identificada como grande babesia, de forma piriforme maior que 2,5 µm de comprimento e as formas arredondadas medem 2 µm. Possuem corpúsculos em forma de pêra encaixados em ângulo agudo dentro da célula eritrocitária madura, como está demonstrado na **(figura 3)**:

Figura 3: Merozoítas de *Babesia bigemina* em esfregaço de sangue corado com Giemsa.



Fonte: OLIVEIRA (2002).

2.4 Biossensores

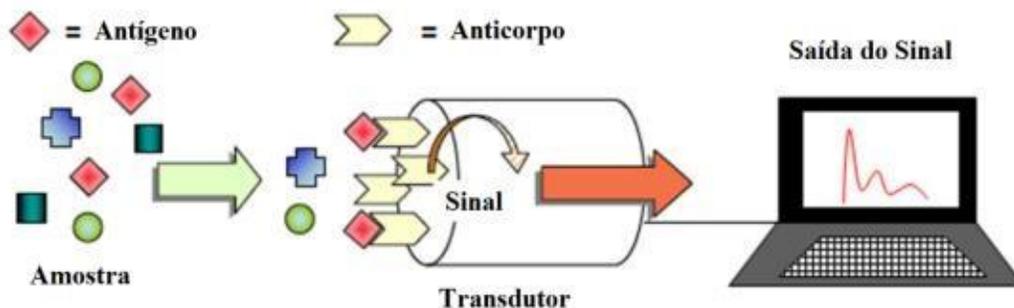
Os exames sorológicos e moleculares citados na seção **2.3** são bastante sensíveis e específicos. Contudo, a estrutura laboratorial necessária para a realização desses exames é complexa. A necessidade de pessoal qualificado, de reagentes e equipamentos de custo elevado basicamente exclui a possibilidade de implementação desses exames como testes de rotina em campo. O fato anterior é motivador para que métodos rápidos, menos custosos e ao mesmo tempo confiáveis, sejam desenvolvidos e validados para o diagnóstico da *Babesia bovis*, no mesmo sentido daquilo já desenvolvido e consolidado para outras doenças bovinas. Por exemplo, dispositivos biossensores já foram propostos/desenvolvidos para diferenciar entre animais infectados com febre aftosa e animais vacinados “saudáveis” (APARICIO et al.; 2009), (PATENTE-Depósito BR 10 2013 006812-8).

Um biossensor é um dispositivo analítico no qual o material de origem biológica, tais como enzimas, organelas, parte de tecido animal ou vegetal, microrganismos, antígenos ou anticorpos, entre outros, é imobilizado junto a um transdutor adequado

que é capaz de converter uma reação de origem biológica em um sinal apropriado (RATHAKRISHNAN e SEKARAN, 2013). O sinal criado é proporcional à concentração do analito a ser detectado. Dessa forma, o biossensor é classificado de acordo com o transdutor utilizado em: eletroquímico (amperométrico, potenciométrico e condutimétrico) (RATHAKRISHNAN e SEKARAN, 2013), óptico (medida de luminescência, fluorescência, etc.) (PANTEGHINI, 2006), e detector de massa, onde se usa a relação da frequência dos cristais piezoelétricos (WATTAL e DATTA, 2010).

Um biossensor pode ser representado com o esquema básico mostrado na **(figura 4)**. Através da interação entre o antígeno presente na amostra que se pretende analisar e o anticorpo imobilizado no transdutor, um sinal elétrico é gerado e então processado. Neste caso, o biossensor pode ser denominado imunossensor devido a origem da reação biológica (LUPPA et al., 2001).

Figura 4: Apresentação de um biossensor. O antígeno presente na amostra de interesse interage com o anticorpo imobilizado no transdutor, resultando em um sinal que pode ser visualizado em um computador acoplado no sistema (HOLFORD et al., 2011).



Fonte: FIGUEIREDO et al.; 2013.

2.4.1 Configuração experimental dos biossensores/imunossensores eletroquímicos

Os biossensores mais utilizados são os eletroquímicos, particularmente, por oferecerem alta especificidade, baixo custo e facilidade de instrumentação aliada a tecnologias de miniaturização e microfabricação. Neste sentido, um biossensor para a detecção de *B. bovis* foi proposto. Testamos como prova de conceito a detecção deste

protozoário através da imobilização de antígeno no transdutor e detecção de anticorpos anti-*B. bovis* presentes em amostras de soro dos animais. Dentre as várias opções de detecção eletroquímica, optamos por utilizar neste trabalho a de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), por ser uma técnica já consolidada para a detecção de interações antígeno-anticorpo (FIGUEIREDO et al., 2015).

O biossensor proposto foi desenvolvido no grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do (GNANO) da Universidade de São Paulo (USP- São Carlos/SP), onde foi realizado parte do experimento. No Laboratório de biossensores do GNANO, é realizada a quantificação de diversos analitos de interesse clínico e ambiental, através de diversas técnicas elétricas e/ou eletroquímicas (FIGUEIREDO et al., 2015).

Optamos por detectar apenas o hemoparasita *Babesia bovis* como prova de conceito, tendo em vista que esta é a mais patogênica. Vale ressaltar que o sistema pode ser adaptado também para a *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*. Detalhes nos eletrodos utilizados e da operação dos biossensores serão mostrados mais adiante.

2.5. Búfalos d'água

Os búfalos domésticos pertencem à família Bovidae, gênero *Bubalus* e espécie *bubalis*. A Associação Brasileira de Criadores de Búfalo (ABCB), identifica quatro raças com padrão estabelecido, sendo três conhecidas respectivamente como Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi que fazem parte dos búfalos de água ou de rio, originária da Ásia (*Bubalus bubalis bubalis*) e apresentam 50 cromossomos. Já a quarta raça classificada Carabao, têm sua origem na Indonésia, Sri Lanka e das Filipinas e é usada para a produção de carne e tração. São animais de porte pequeno e conhecidos como búfalos de pântano (*B. b. kerebao*), com 48 cromossomos (EGITO et al., 2006).

Os búfalos possuem características exclusivas, como rusticidade e alta resistência a enfermidades, habilidade de sobreviver em climas com alta umidade e temperatura, e também apresenta um enorme potencial zootécnico para seus produtos como carne, leite e couro (FERNÁNDEZ et al., 2005).

A introdução de búfalos no território brasileiro ocorreu em 1895 e foi realizada por imigrantes políticos da Guiana Francesa, que trouxeram em um barco um grupo de búfalos do tipo Carabao na Ilha de Marajó. Em seguida, foram feitas inúmeras

importações desses animais pelo mesmo criador na região do Nordeste, Sul de Minas, Baixo Amazonas e da Ilha de Marajó (MARQUES, 2000). Em 1948, surgiram os primeiros relatos da entrada no estado de São Paulo de bubalinos das raças Murrah e Jafarabadi (Índia), e entre os anos de 1962 e 1989 ocorreram importações de animais das raças Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo procedentes da Ásia, Itália e América Central e chegando às regiões do norte (Belém/Pará) e Sudeste (São Paulo) do país (ANUALPEC, 2009).

Segundo Silva et al. (2014), o rebanho de búfalos no Brasil está baseado por volta de 1,15 milhão de animais, resultando no maior da América Latina.

Os bubalinos albergam ectoparasitas como carrapatos (*Anocenter nitens*, *Amblyomma spp* e *R. (B.) microplus* e também endoparasitas como cestódeos, nematódeos e trematódeos (MOHAN, 1968).

B. bovis, *B. bigemina* e *A. marginale* têm sido descritas em búfalos e essa infecção tem sido relacionada à presença do carrapato *R. (B.) microplus* em todas as áreas de criação desses animais. Embora mais resistentes aos agentes da TPB os búfalos podem ser potenciais portadores desses parasitas e também atuar como reservatórios destes agentes, transmitindo para outros animais (BOCK et al., 2004; SILVA et al., 2013 a,b). Assim, ferramentas que possam agregar conhecimento e eficácia no diagnóstico e epidemiologia das hemoparasitoses, poderão contribuir para o melhor controle das doenças.

3. OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo estudar a infecção pelos agentes da TPB em búfalos de faixas etárias diferentes, criados em áreas endêmicas para o carrapato *R. (B.) microplus*, no estado de São Paulo.

Objetivos específicos:

1- Adaptar protocolos baseados em PCR para identificação e quantificação das infecções por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* em búfalos d'água de localidades e faixas etárias diferentes (bezerros e vacas) e compará-los com a técnica ouro, que é o exame direto de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa e comparar entre nPCR e qPCR;

2- Determinar os dados de volume globular (VG), que permitam inferir sobre o estado de saúde dos animais estudados;

3- Desenvolver técnica de diagnóstico para *B. bovis* usando o método da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*), utilizando um novo biossensor.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Laboratórios

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, localizado em São Carlos, SP e no Laboratório de biossensores do grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNANO) da Universidade de São Paulo (USP-São Carlos/SP).

4.1 Animais Experimentais e colheita das amostras

Foram utilizados 108 animais experimentais que integravam os rebanhos de quatro propriedades localizadas em diferentes cidades no estado de São Paulo: São Carlos localizada a 22° 01' de latitude sul e 47° 53' de longitude oeste (n= 14 vacas); Ibaté localizada a 21°57'17" de latitude sul e longitude 47°59'48" de longitude oeste (n= 48, sendo 12 bezerros fêmeas, 13 bezerros machos e 23 vacas), Alambari localizada a 23° 33' 03" de latitude sul e 47°53'56" de longitude oeste (n=25 bezerros, sendo 12 fêmeas e 13 machos) e Dourado localizada a 22°06'00" sul e 48°19'03" de longitude oeste, (n= 21 vacas). Os rebanhos de origem dos animais experimentais são explorados para a produção de leite, especificamente para a fabricação de mussarela. Todos os animais eram criados de modo extensivo, e a ordenha mecânica era feita com bezerro ao pé. Os animais utilizados no experimento eram das raças Mediterrâneo, com diferentes graus de sangue Murrah.

As vacas apresentavam idades entre três e cinco anos e os bezerros de ambos os sexos, tinham entre 1 e 8 meses e foram mantidos sem tratamento contra parasitas por pelo menos trinta dias, sendo que o rebanho de São Carlos era criado sem o uso de qualquer medicamento. Apenas o rebanho de Dourado tinha esquema de controle de doenças, incluindo controle da tuberculose e brucelose (soroaglutinação). Entre os meses de novembro de 2011 a janeiro de 2012, foram colhidas simultaneamente, amostras de sangue periférico, provenientes de vasos auriculares de cada animal, para a confecção de esfregaços sanguíneos em lâminas histológicas de vidro (limpas e secas) e determinação direta da parasitemia por exame direto por microscopia óptica,

volume globular (VG) e extração de DNA. O sangue foi extraído com agulhas 25 x 8 BD e tubos a vácuo de 4mL contendo o anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), utilizando-se um adaptador para a realização da venopunção de cada animal. Após as colheitas, todas as amostras foram identificadas, acondicionadas em isopor com gelo e transportadas para o laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos-SP, onde foram processadas e analisadas.

4.2 Técnicas hematológicas

O volume globular em todas as amostras foi determinado pelo método de microhematócrito (JAIN, 1993). Os esfregaços sangüíneos foram fixados com metanol e corados com solução de May-Gruenwald-Giemsa. A pesquisa de hematozoários foi realizada em todo o esfregaço e a parasitemia determinada pela contagem do número de eritrócitos parasitados em 1.000 células, utilizando microscópio óptico com ocular reticulada e objetiva de 100x.

4.3 Extração de DNA das amostras de sangue

O DNA foi extraído das amostras de sangue, com a utilização do Kit DNA *Easy* (Invitrogen, EUA) de acordo com as informações do fabricante e com algumas modificações. Primeiramente, as amostras de sangue foram invertidas até a perfeita homogeneização. Após, foram pipetados 300µL de sangue e adicionados 400µL de solução A, misturando-os por inversão por várias vezes colocando-os em microtubos de 1,5mL. Os tubos foram identificados e incubados a 65°C, durante 6 minutos. Em seguida, foram adicionados 800 µL, de clorofórmio, agitando-se em vortex vigorosamente, até que apresentassem coloração marrom escura. Em seguida, adicionou-se 200µL de solução B, sendo as amostras novamente homogeneizadas até que se tornassem viscosas. Em processamento, foram centrifugadas à velocidade máxima (14.000 rpm) em microcentrífuga por 10 minutos à temperatura ambiente (25°C). A fase aquosa de cada amostra foi transferida para tubos de 1,5mL limpos e devidamente identificada. Logo após, o DNA foi precipitado adicionando-se 1mL de etanol à 100% gelado, misturando-se por inversão até que se formasse um precipitado visível. As amostras foram novamente centrifugadas a velocidade máxima durante 5

minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os sobrenadantes foram decantados e adicionou-se 1mL de etanol a 80% gelado. Os tubos foram submetidos novamente centrifugados a velocidade máxima por 2 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram decantados e os tubos centrifugados a velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida, pipetou-se o etanol residual, inverteram-se os tubos colocando-os para secar no fluxo laminar por 2 horas. Após a secagem, os DNAs precipitados foram adicionados de 200µL de solução tampão – TE (Tampão TRIS - EDTA). Os DNAs foram separados por fazendas, identificados e acondicionados em caixas plásticas para microtubos de 1,5mL em freezer à -80°C para posterior avaliação da concentração e qualidade das amostras extraídas.

4.4 Avaliação do DNA

A concentração e a avaliação da qualidade do DNA genômico extraído foi determinada usando-se o aparelho Nano Drop ND-1000 spectrophotometer. Todas as amostras foram acondicionadas em freezer a -80°C até o momento da execução das técnicas moleculares.

4.4.1 Otimização das reações de PCR e Nested-PCR (nPCR) para *B.bigemina*

Na otimização da técnica foram empregadas alíquotas de DNA positivas extraídas de amostras, contendo exclusivamente *B. bigemina* (gentilmente cedida pela Prof^a Dra. Rosângela Zacarias Machado da Unesp Jaboticabal).

As reações de PCR foram realizadas utilizando as sequências iniciadoras ou "*primers*", de acordo com o protocolo descrito por GUERRERO et al. (2007), (**quadro 1**). As reações foram feitas em tubos de 0,2 ml, empregando-se um volume final de 25µl, sendo 5µl de solução de DNA das amostras teste e 20µl de tampão de reação composto de 12,5µL Master Mix Red Neobio (150mM Tris-HCl; 40mM, (NH₄)₂So 4; 40mM MgCl₂), 5,5µL de água ultra-pura (Invitrogen, EUA) e 1µL de cada primer (10mM). As reações foram identificadas e incubadas em termociclador "Mastercycler Gradient" (Eppendorf), empregando-se a seguintes seqüências de ciclos que se repetiram 40 vezes, selecionadas durante a padronização: desnaturação a 94°C por 1

minuto, anelamento a 66°C e extensão a 72°C, também por um minuto. Para o Nested usou-se o mesmo programa, mudando-se as condições de anelamento para 57°C e as condições da reação, com o volume final de 25µl, sendo 2µl de solução de PCR e 23µl de tampão de reação com a mesma composição descrita para a PCR.

Para leitura das ampliações por Nested PCR, realizou-se a eletroforese dos produtos de amplificação em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml). O comprimento dos produtos amplificados foi estimado pela inclusão de um padrão de pares de base (100 Base-Pair Ladder – Amersham Pharmacia Biotech) em cada gel de corrida. A visualização dos produtos amplificados foi realizada em transiluminador UV, com 262 pares de bases (pb) para a *B.bigemina*.

Quadro 1: Sequência dos nucleotídeos dos primers utilizados na amplificação do DNA de *Babesia* spp. e *B. bigemina* com o tamanho dos produtos de amplificação. **PCR: (primers KB16/KB17) nPCR: (primers KB18/KB19).**

PCR e nPCR	“Primer”	Oligonucleotídeos (5’ – 3’)	Produto (PB)
<i>Babesia</i> spp.	(F) ^a KB 16	CAT CAG CTT GAC GGT AGG G	600
	(R) ^a KB17	GTC CTT GGC AAA TGC TTT C	
<i>B. bigemina</i>	(F) ^a KB 18	GAT GTA CAA CCT CAC CAG AGT ACC	262
	(R) ^a KB19	CAA CAA AAT AGA ACC AAG GTC CTA C	

^a (F) “primer” forward; (R) “primer” reverse

Fonte: autoria própria

4.4.2 Otimização das reações de PCR e nPCR para *B.bovis*

As reações de PCR foram realizadas utilizando as sequências iniciadoras *primers*, através do protocolo descrito por FIGUEIROA et al. (1993) para *B. bovis* (**quadro 2**). As reações foram feitas em tubos de 0,2 ml, empregando-se um volume final de 25µl, sendo 5µl de solução de DNA das amostras teste e 20µl de tampão de

reação composto de 12,5µL Master Mix Red Neobio (150mM Tris-HCl; 40mM, (NH₄)₂So 4; 40mM MgCl₂), 5,5 µL de água ultra-pura (Invitrogen, EUA) e 1µL de cada primer (10mM). As reações foram identificadas e incubadas em termociclador “Mastercycler Gradient” (Eppendorf), empregando-se a seguintes sequências de ciclos que se repetiram 40 vezes, selecionadas durante a padronização: desnaturação a 95°C por 2 minutos, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C, também por um minuto. Para o Nested usou-se o mesmo programa, alterando-se as condições de anelamento para 68°C e as condições da reação, com o volume final de 25µl, sendo 2µl de solução de PCR e 23µl de tampão de reação com a mesma composição descrita para a PCR. Em seguida foi efetuada a eletroferese em gel de agarose a 1,5% com visualização em transiluminador UV das bandas de 350 pb obtidas na PCR e de 290 pb do nPCR para *B. bovis*.

Quadro 2: Sequência de nucleotídeos dos primers para *B. bovis* e com os respectivos tamanhos dos produtos de amplificação na PCR (BOR/BOF) e nPCR (BORN/BOFN).

Seqüência	Primer	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Produto (pb)
<i>B. bovis</i>	BOR	CCAAGGAGCTTCACCGTACGAGGTCA	350
	BOF	CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA	
	BORN	CTACCGAGCAGAACCTTCTTCACCAT	290
	BOFN	TCAACAAGGTA CTCTATATGGCTACC	

Fonte: autoria própria

4.4.3 Otimização das reações de PCR e nPCR para *Anaplasma marginale*

As reações de PCR foram efetuadas utilizando as sequências iniciadoras (“primers”), através do protocolo descrito por Figueiroa et al. (1993) para *A. marginale*, (**quadro 3**). As reações foram feitas em tubos de 0,2 ml, empregando-se um volume final de 25µl, sendo 5µl de solução de DNA das amostras teste e 20µl de tampão de reação composto de 12,5µL Master Mix Red Neobio (150mM Tris-HCl; 40mM, (NH₄)

2So 4; 40mM MgCl₂), 5,5µL de água ultra-pura (Invitrogen, EUA) e 1µL de cada primer (10µM). As reações foram identificadas e incubadas em termociclador “Mastercycler Gradient” (Eppendorf), empregando-se a seguintes sequências de ciclos que se repetiram 40 vezes, selecionadas durante a padronização: desnaturação a 95°C por 2 minutos, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C, também por um minuto. Para o Nested usou-se o mesmo programa, alterando-se as condições de anelamento para 60°C e as condições da reação, com o volume final de 25µl, sendo 2µl de solução de PCR e 23µl de tampão de reação com a mesma composição descrita para a PCR. Após foi realizada a eletroferese em gel de agarose a 1,5% com visualização das bandas positivas em transiluminador UV dos fragmentos de 200 pb e 150 pb, na PCR e nPCR, respectivamente para *A. marginale*.

Quadro 3: Sequências iniciadoras externas primers para amplificação de DNA de *Anaplasma marginale*.

Seqüência	Primer	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Produto (pb)
<i>A. marginale</i>	Am9	TTGAAGGTTGAAGTGCAGGT	200
	AM10	CCATATCGAATGCACCAAAC	
<i>A. marginale</i>	Am11	CACATTTCTTGGAGCTGG	150
	AM12	TCTCTGCGACTTTGAACC	

Fonte: autoria própria

4.5 Padronização das reações da PCR em Tempo Real quantitativo (qPCR)

4.5.1 Otimização das reações de qPCR para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*

As padronizações dos testes de qPCR para as quantificações do número de cópias de um fragmento do gene mitocondrial do citocromo b (mt-cyB) de *B. bovis* e *B. bigemina*, foram as mesmas usadas por Giglioti et al. (2016). Para *A. marginale*, a

quantificação do NC das mesmas amostras foi baseada conforme a metodologia descrita por Carelli et al., (2007), com modificações, sendo usadas sequencias iniciadoras que flanqueiam o gene de proteína principal de superfície (*msp1b*) de *A. marginale*.

As amostras de DNA extraídas dos isolados de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* foram gentilmente cedidas pela Prof^a Dra. R. Z. Machado, responsável pelo laboratório de Imunoparasitologia do departamento de Patologia Veterinária da UNESP/FCAV de Jaboticabal, SP, que mantêm estes isolados por meio da passagem em bezerros esplenectomizados por cerca de 25 anos de uma amostra fornecida pelo instituto Desiderio Finamor (RS/Brasil). As sequências iniciadoras para os estudos de qPCR estão apresentadas no **quadro 4**.

Quadro 4: Sequências iniciadoras utilizados na quantificação do DNA de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* pela técnica de qPCR.

Espécie	“Primer”	Oligonucleotídeos (5' – 3')	Produto (PB)
<i>B. bovis</i>	(F) ^a cbisg-1	TGTTCCAGGAGATGTTGATTC	88
	(R) ^a cbisg-2	AGCATGGAAATAACGAAGTG	
<i>B. bigemina</i>	(F) ^a cbosg-1	TGTTCTGGAAGCGTTGATTC	88
	(R) ^a cbosg-2	AGCGTGAAAATAACGCATTGC	
<i>A. marginale</i>	(F) ^a AM-1	TTGGCAAGGCAGCAGCTT	95
	(R) ^a AM-2	TTCCGCGAGCATGTGCAT	

(F)^a: iniciador direto; (R) iniciador reverso. **Fonte:** autoria própria

As reações de qPCR foram feitas em duplicatas, em microtubos em tiras com tampa óptica de 200µL ((Low-Profile 0,2 ml 8-Tube Strips without Caps ref. TLS-0851, BioRad), livres de DNAses e RNAses, com volume final de 12µL:

- 5,0µL EvaGreen[®]Supermix (BioRad);
- 0,3µL de “primer forward” (10µM);
- 0,3µL de “primer reverse” (10µM);
- 4,4µL de água deionizada; - 2,0µL de DNA.

Após, os microtubos foram lacrados com tampas ópticas, em tiras (Optical Flat 8-Cap Strips, ref. TCS-0803, BioRad) e colocados no equipamento CFX Real-Time PCR Detection Systems da BioRad. O reagente usado para as reações de qPCR foi o kitSsoFast™ EvaGreen® Supermix da BioRad (número de catálogo: #172-5200). Este kit contém todos os componentes para a reação de qPCR, exceto a amostra e sequencias iniciadoras. O **(quadro 5)** mostra o programa empregado no aparelho.

Quadro 5: Ciclos adotados para as reações de qPCR.

Etapa do Ciclo	Ciclos	Temperatura	Tempo
Ativação Enzimática	1	95°C	2 minutos
Desnaturação	39	95°C	5 segundos
Anelamento/Extensão		57°C	30 segundos
Curva de Dissociação	1	65-95°C (incremento de 0,5°C)	5 segundos/passo

Fonte: autoria própria

4.6 Construção da Curva de Calibração para qPCR de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *A. marginale*

Para a construção da curva de calibração para as qPCR de *B. bovis* e *B. bigemina*, produtos de isolados clonados contendo o fragmento do gene mt-cyB foram usados para a padronização da curva de calibração, para cada espécie, respectivamente. Os produtos clonados de *B. bovis* e *B. bigemina* contendo 197,3 ng/μL e 203,9 ng/μL, quantificados em NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA), respectivamente foram diluídos em série entre 10⁻¹ a 10⁻¹⁰.

Para as quantificações do NC do fragmento do gene de *msp1b* de *A.*

marginale, a curva de calibração foi construída a partir da amostra representativa de gBlocks® Gene Fragments da Integrated DNA Technologies® (IDT). O gBlocks® são fragmentos sintetizados de DNA dupla fita, atualmente utilizados para a construção de curva de calibração, devido sua alta precisão e baixo custo comparado à clonagem molecular. O gBlocks® sintetizado contém a sequência alvo de *A. marginale* e, ainda, as extremidades aumentadas (sequências do mesmo gene de interesse) possibilitando construções de curva de calibração de alta eficiência. Este fragmento possui 308 pares de bases com uma sequência parcial igual a do gene de proteína principal 1b (*msp1b*) de *A. marginale* descrito por Carelli et al. (2007). A sequência do fragmento de 308 pares de bases do gBlocks® sintetizado está representada no **(quadro 6)**. A solução “mãe” foi obtida a partir de diluição do gBlocks®, seguindo as recomendações do fabricante, para obter uma solução de 5ng/μL. Esta solução também foi diluídas em série entre 10⁻¹ a 10⁻¹⁰.

Quadro 6: Sequência do fragmento de 308 pares de bases do gBlocks® sintetizado para confecção da curva de calibração para *A. marginale*. Em negrito a sequência de 95 pares de bases do amplicon de *A. marginale*.

Sequência do fragmento gBlocs® sintetizado
5'_TACTATCAGGACTTTTGTGACATTTTATTATGTTCTGGAAGCGTTGATTCTTTT GAATGTGTAATTAGAGTGCTTGCTGAAGTCAATATGGGTTGGGCAATGCGTTATTTT CACGCTCAATGTGTTTCTTTTTGCTTCTTTTTTCATGATTTTTTTTACCAGCGGGTGAG GAGCAAGAATTT GGCAAGGCAGCAGCTTGGGGTCTAGCAGGCTTCAAGCGTACA GTGGATGAAAGCCTGGAGATGTTAGACCGAGGCATGCACATGCTCGCGGAAGG CCAGGCACAGATATCACAGGGGATTGAAGC-3'

Para cada ensaio de qPCR para cada espécie de hemoparasita foi obtida uma curva de calibração. Os intervalos de quantificação para a quantificação do NC em cada curva de calibração para cada espécie foram estabelecidos entre um ponto mais concentrado onde os ciclos quantitativos (*Cqs*) apresentavam eram menores ao controle positivo (DNA de isolado de cada espécie) e a diluição menos concentrada determinada próxima do ponto de corte, determinada pelo teste de sensibilidade.

A padronização da curva de calibração para cada espécie possibilitou a obtenção dos valores de Eficiência da reação (E) para as quantificações do NC nas amostras de DNA dos bubalinos.

4.6.1 Sensibilidade analítica para detecção *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*

As sensibilidades analíticas para as detecções de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* foram estimadas a partir de amostras de DNA extraídas de isolados de cada espécie, respectivamente, que foram diluídas a uma concentração final de 1 ng/μL. As amostras foram submetidas a uma diluição serial entre 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ com cinco repetições. O ponto de corte para cada espécie foi determinado onde a última diluição (amostra menos concentrada) amplificava mais de 50% de suas amostras (CARAGUELET al., 2011). Foi construída uma curva de calibração para verificar a reprodutibilidade e eficiência da reação para cada ensaio de sensibilidade.

4.7 Determinação do Número de cópias a partir da qPCR

O NC do gene mt-cyt B e do gene MSP1b foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Ke et al. (2006):

$$\text{Número de cópias } /\mu\text{L} = \frac{6,022 \times 10^{23} \left(\frac{\text{cópias}}{\text{mol}}\right) \times \text{Concentração} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{\text{Massa Molecular} \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{L}}\right)}$$

Onde:

- Concentração (g/mol): se refere a concentração ou dos *ampicons* clonados contendo sequências de *B. bovis* e *B. bigemina* ou da concentração da sequência sintética (gBlocks®) que foram usados para a construção da curva de calibração;
- 6,022 x 10²³ é o número de Avogadro;
- Massa Molecular: é o peso molecular médio da molécula do nucleotídeo de fita dupla (330 x 2) multiplicado pelo tamanho do fragmento clonado (vetor e inserto, 3088 pb).

Para calcular o número de cópias do produto clonado (número de cópias/μL), a concentração determinada em espectrofotômetro em ng/μL foi convertida para g/μL (x

10⁻⁹), e em seguida multiplicada pela concentração inicial utilizada na primeira diluição da curva de calibração do produto clonado e, no final, multiplicado por 2, pois corresponde ao volume de DNA da amostra aplicada (2µL). O valor encontrado do número de cópias foi utilizado pelo software do equipamento CFX96 da Bio-Rad (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) para calcular a quantidade inicial de DNA de *B. bovis*, *B. bigeminae* e *A. marginale* em cada amostra de DNA dos bubalinos.

4.8 Cálculo de Eficiência (E) da qPCR para a Quantificação de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *A. marginale*

A eficiência da reação (E) foi descrita por Pfaffl (2001) e Vandesompele et al. (2002), e demonstra o quanto que seu alvo está sendo produzido em cada ciclo de reação. No entanto, a quantidade de DNA alvo será duplicada, precisamente se o valor de E for igual a 100% (sendo o limite de detecção 95% - 105%). Assim, o valor padrão da E utilizado nos cálculos é de 100%. Durante os ensaios, a E das sequencias iniciadoras foram avaliadas e registradas. Para esta análise, uma curva de calibração foi gerada utilizando-se diluições seriadas de uma amostra representativa (neste caso, foram os amplicons clonados de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*), e em seguida, gravou-se a (E) para a análise subsequente da quantificação do DNA. O software do equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) calcula automaticamente a E, na qual foi obtida da seguinte forma:

$$E = 10_{(-1/\text{Slope})}$$

Em que:

Slope (coeficiente angular) = inclinação da linha derivada da curva de calibração

$$\% \text{ Eficiência} = (E - 1) * 100$$

Os resultados foram analisados com base nos valores do ciclo de quantificação (*Cq*) definidos após o término de cada reação. A linha *threshold* foi ajustada para um mesmo valor para todos os ensaios de qPCR, entretanto determinada constante apenas para a espécie de hemoparasita estudada. Esta linha é que determinará o ponto exato

do *C_q* de cada amostra e dos valores da curva de calibração. Para cada reação foi obtida uma curva de calibração, possibilitando a estimativa da parasitemia por babesias nos animais. As amostras foram quantificadas em duplicatas e para avaliar a ocorrência de contaminação em cada ensaio, foram necessários dois controles negativos (reação contendo água deionizada livre de nucleases ao invés da amostra de DNA). Amostras em que as repetições apresentaram diferenças de *C_q*s maiores que 0,5 foram novamente analisadas.

4.9 Purificação do produto de PCR para clonagem

A purificação dos produtos de PCR foram realizadas em amplicons obtidos de gDNAs de animais de cada região estudada (Alambari, São Carlos, Dourado e Ibaté). Para isso utilizou-se kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega #A9281, Madison, WI, USA). Depois os quatro produtos de amplificação de cada hemoparasita, i.e. *B. bovis*, *B. bigemina* em cada rebanho estudado, foram clonados, sequenciados e depositados no banco de dados NCBI. O produto de PCR purificado foi analisado em gel de agarose 1% e quantificado em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop).

4.10 Clonagem do produto de PCR

Os produtos de PCR purificados foram clonados no vetor pGEM®-T Easy (Promega #A1360, Madison, WI, USA), conforme as especificações do fabricante. As reações de ligação foram feitas em um microtubo de 1,5mL, livre de *DNase* e *RNase*. Foram adicionados: 2µL de água nuclease *free*, 1µL de pGEM®-T Easy (concentração final a 5ng/µL), 1µL de produto de PCR (concentração final a 2 ng/µL), 5µL de tampão da ligase e 1µL de T4 DNA ligase. A reação foi homogeneizada, incubada à 4°C durante a noite e utilizada para a transformação em bactéria quimiocompetente.

4.11 Transformação em bactéria

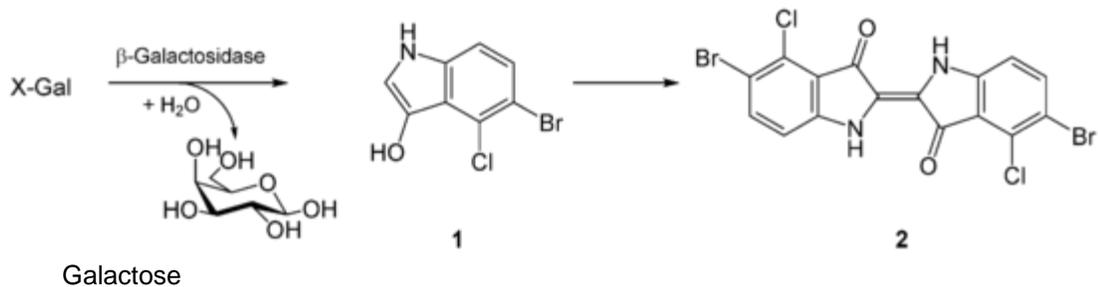
As células bacterianas competentes utilizadas foram as *Escherichia coli* JM109 *Competent Cells High Efficiency* (Promega #L2004, Madison, WI, USA), mantidas em estoque a -80°C . A transformação foi realizada com choque térmico segundo o protocolo descrito por Sambrook et al, 1989. As células foram descongeladas em gelo. Em cada tubo foi adicionado $7\mu\text{L}$ da reação de ligação e o material foi suavemente homogeneizado. A reação foi mantida durante 5 minutos no gelo. As bactérias foram então submetidas ao choque térmico por 90 segundos a 42°C , e logo em seguida colocadas no gelo por 1 minuto. Foram adicionados $800\mu\text{L}$ de meio de cultura líquido LB (*Luria-Bertani broth* - USB) sem antibiótico em cada tubo. Os tubos foram incubados em termo-bloco (Thermo Stat Plus - Eppendorf) a 37°C por 45 minutos sob agitação de 300rpm. Decorrido este período, $200\mu\text{L}$ das células foram plaqueados em 15 mL de meio LB ágar contendo $15\mu\text{L}$ de ampicilina (100mg/mL), $50\mu\text{L}$ de IPTG - *Isopropil-b-DTiogalactosídeo*- Invitrogen (200mM) e $40\mu\text{L}$ de X-gal (100mg/mL) (USB). As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante a noite. O restante das células foi armazenado em glicerol a 15% a -20°C .

4.12 Seleção das colônias recombinantes

O *screening* das colônias recombinantes foi realizado utilizando-se a técnica de *blue/white screening*, como citado no sistema *lacZ* do pGEM[®]-T Easy (Promega #A1360, Madison, WI, USA). Esta técnica permite verificar se o vetor adquiriu o inserto de interesse ou não. A **figura 5** ilustra o sistema de seleção branco e azul. O X-gal, adicionado ao meio de cultura, é um indutor de β -galactosidase e, ao mesmo tempo, é clivado por essa enzima, produzindo galactose e 5-romo-4-cloro-3-hidroxiindol (1). A galactose é oxidada em 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo (2), um produto insolúvel azul. Assim, as colônias que apresentarem o gene *lacZ* funcional (β -galactosidase ativa) podem ser facilmente distinguidas pela coloração azul. A bactéria *E. coli* não produz β galactosidase espontaneamente por não possuir o gene *lacZ*, mas quando transformada com um vetor plasmidial que contém este gene (como pGEM[®]-T Easy) passa a produzir. O pGEM[®]-T Easy contém de fato a ORF (*Open Reading Frame*) do

gene *lacZ*, que produz a β -galactosidase. Este plasmídeo está preparado de modo que no meio desta ORF está o local de inserção do gene ou sequencia que se quer clonar. Quando isso acontece, a síntese de β -galactosidase é anulada. Desta maneira, as colônias brancas indicam que as bactérias foram transformadas com vetores que continham o inserto de interesse, o que tornou o gene *lacZ* não-funcional, indicando estas colônias como recombinantes.

Figura 5: Reação de clivagem do X-gal pela β -galactosidase. (1) 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, (2) 5,5'dibromo-4,4'-dicloro-indigo (AZUL).



Decorrido a etapa anterior, foi realizada uma PCR para confirmação das colônias recombinantes. As colônias foram repicadas e os palitos usados foram mergulhados em 20 μ L de água deionizada. O material foi incubado a 96 °C por 5 minutos para expor o conteúdo celular. A reação foi realizada em tubos de 0,2mL contendo: 1 μ L da suspensão celular, 2,5 μ L de tampão de PCR 10x (sem $MgCl_2$), 0,75 μ L de $MgCl_2$ 50mM, 4 μ L de dNTP mix 1,25mM, 1 μ L de *primer* M13F - 10pM/ μ L - (5' GTTTTCCCAGTCAC3'), 1 μ L de *primer* M13R - 10pM/ μ L (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'), 0,5 μ L de enzima Taq DNA polimerase (*Invitrogen – Life Technologies*) (5U/ μ L) e 14,25 μ L de água *DNase e RNasefree*, constituindo assim um volume total de 25 μ L. Foi feito também um tubo controle negativo, que continha todo o mix de reação menos a suspensão celular (seu volume foi substituído por água nuclease *free*). A reação foi montada em gelo, brevemente centrifugada (*spin*) e imediatamente incubada no termociclador (BioRad).

As reações foram realizadas sob as seguintes condições: 95°C por 2 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 30 segundos para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão, seguidos de um acréscimo de 5 minutos à 72°C para a extensão final. Ao final da reação as amostras foram mantidas no termociclador à 4°C e posteriormente foram armazenadas à -20°C até o momento do uso. O fragmento amplificado foi analisado em gel de agarose 1%.

4.13 Extração de DNA plasmidial

Três colônias recombinantes foram repicadas e inoculadas em 7,5 mL de meio LB contendo 7,5µL de ampicilina (100µg/µL), para uma concentração final de 0,1 µg/µL. Os tubos foram colocados no *shaker* (*NewBrunswick Scientific – modelo- Excella E24R*) a uma temperatura de 37°C, a 300 rpm durante a noite. A extração de dna plasmidial (mini-prep) foi realizada utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), segundo o protocolo sugerido pelo fabricante. A miniprep foi analisada em gel de agarose 1%. A mini-prep foi quantificada no nanodrop e as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

4.14 Sequenciamento dos plasmídeos recombinantes

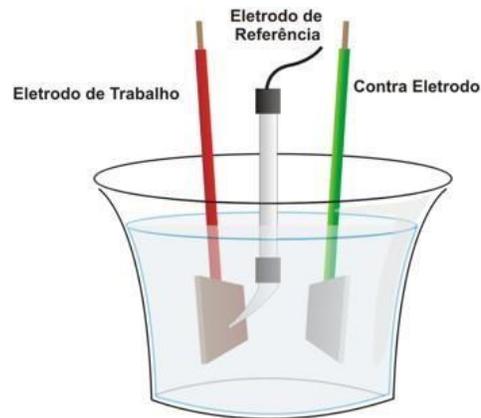
As amostras foram sequenciadas no equipamento Applied Biosystems/HITACHI ABI Prism® 3100 Avant genetic analyzer, usando o kit Big Dye terminator v.3.1 e após, depositadas no GenBank.

4.15 Espectroscopia de impedância eletroquímica

Experimentos eletroquímicos normalmente são realizados em uma célula que contém o eletrólito e três eletrodos diferentes (**figura 6**): de trabalho (comumente composto de ouro, carbono, etc) onde se encontra o receptor imobilizado; referência (usualmente Ag/AgCl) e contra eletrodo (geralmente uma placa de platina). Contudo, optamos por utilizar eletrodos miniaturizados recentemente fabricados no Laboratório multiusuário LNNano (Laboratório Nacional de Nanotecnologia, Campinas/SP) em

parceria com os pesquisadores Dr. Nirton C. S. Vieira e Dra. Idelma A. Terra do GNANO.

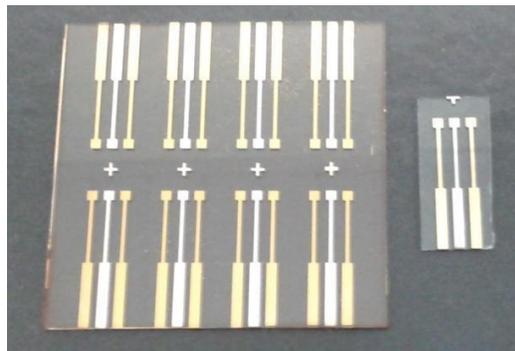
Figura 6: Representação de uma célula eletroquímica típica com 3 eletrodos. Eletrodo de trabalho (ouro), contra-eletrodo (placa de platina) e eletrodo de referência (Ag/AgCl).



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Potenciostato>

A **figura 7** mostra os eletrodos miniaturizados formados por filmes metálicos de espessura nanométrica. O sistema é composto por dois eletrodos de ouro (trabalho T, e contra eletrodo C) e um eletrodo de platina como pseudo referência R. Os eletrodos foram fabricados em substratos de vidro submetidos à pulverização catódica para a deposição de uma fina camada de cromo (~ 20 nm) para aderência e posterior deposição de uma camada de 130nm de ouro (Au). O mesmo procedimento foi realizado a deposição da platina.

Figura 7: Lâminas de vidro (5 cm x 5 cm) contendo 8 conjuntos de eletrodos e eletrodo individual após o corte da lâmina. Cada conjunto de eletrodos é formado por um eletrodo de platina (contra eletrodo central) e dois eletrodos de ouro (eletrodo de trabalho e contra eletrodo).



Fonte: autoria própria

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica é caracterizada pela excitação da amostra e pela aplicação de sinais AC (Corrente Alternada) de baixa amplitude em uma grande diversidade de frequências (neste caso entre 10 MHz e 100 MHz). A partir da resposta do sistema, pode-se conseguir então, dados sobre a resistência e capacitância do sistema em análise, sendo muito eficaz para traduzir a interação do analito em superfícies funcionalizadas (XU e DAVIS, 2014) e interações biomoleculares, como no caso de interações antígeno-anticorpo. Softwares especializados são capazes de criar circuitos equivalentes baseados nos espectros EIS, fornecendo detalhes sobre as características elétricas do filme.

4.15.1 Preparação do eletrodo

O eletrodo de trabalho foi modificado com antígenos cedidos pela Prof^a Dra. Ana Gonçalves Domingos (Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa, Portugal). Estes foram produzidos através de cultura *in vitro* contendo exclusivamente *B. bovis*. Portanto são capazes de se ligar especificamente a anticorpos anti-*B. bovis*.

Para a imobilização dos antígenos no eletrodo de Au, utilizamos o método usado por (FIGUEIREDO et. al., 2015) com pequenas modificações. Resumidamente, os eletrodos de Au foram expostos a uma solução aquosa de cloreto de cisteamina (Sigma-Aldrich) (100mM) por 2 horas, seguido de lavagem com água para a remoção

do material fracamente ligado. Esse procedimento garante a formação de uma monocamada automontada com grupos amina expostos. Após, os eletrodos foram expostos a uma solução de glutaraldeído (Sigma-Aldrich) (2,5% v/v) durante 1 hora, seguida de lavagem em água e secagem sob fluxo suave de N₂ para não danificar o filme. Para imobilização do antígeno, fez-se a deposição de 10µl da solução cedida (diluída 100 vezes em solução tampão PBS (Sigma-Aldrich)) diretamente sobre o eletrodo modificado. Após 2 horas à temperatura ambiente, os eletrodos foram lavados com tampão PBS. Finalmente, o bloqueio de possíveis sítios de ligação remanescentes foi realizado com monoetanolamina (50mM) em 1X PBS durante 30 min à temperatura ambiente, seguida de nova lavagem no tampão.

4.15.2 Detecção de anticorpos anti- *B. bovis*

As amostras de soro utilizadas nos experimentos com o biossensor foram provenientes de animais do rebanho de bovinos experimental (com alto título de anticorpos anti-*B. bovis*) pertencentes à Embrapa Pecuária Sudeste de São Carlos-SP. A amostra de controle negativo (soro sem a presença do parasita) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Termignoni, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia.

As medidas de EIS foram feitas nesta configuração de eletrodo demonstrada na figura 7, utilizando como eletrodo suporte uma solução PBS contendo 2,5 mM de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} como prova redox, utilizando o equipamento AUTOLAB Eco Chemie PGSTAT 12. Para tanto, 4µL do soro bovino (infectado ou não) foram depositados sobre os eletrodos previamente modificados com antígenos de *B. bovis*. Após 20 min as medidas de foram realizadas. Todas as medidas foram realizadas pelo menos em triplicata.

4.16 Análise Estatística

Os resultados das análises de PCR foram agrupados em tabelas de contingência e analisados com o auxílio do teste de Qui-quadrado, usando o procedimento proc freq do pacote do SAS (2002/2003), com nível de significância de % de probabilidade ($p \leq 0,05$). Para testar as proporções de infectados e não infectados (P e N) foram incluídos, os efeitos da categoria animal (vaca e bezerro) e local (Ibaté, Alambari, Dourado, São Carlos).

5. RESULTADOS

5.1 Dados hematológicos

Os dados obtidos do volume globular dos animais por rebanho e idade, podem ser observados na **tabela 1**. Os dados de volume globular (VG) nas fêmeas adultas variaram de 34,6% a 39,9% e nos animais jovens de 34,6% a 46,4%(**tabela 1**).

Tabela 1: Médias gerais e os erros padrão do volume globular (VG%) em bubalinos em função da idade e do rebanho.

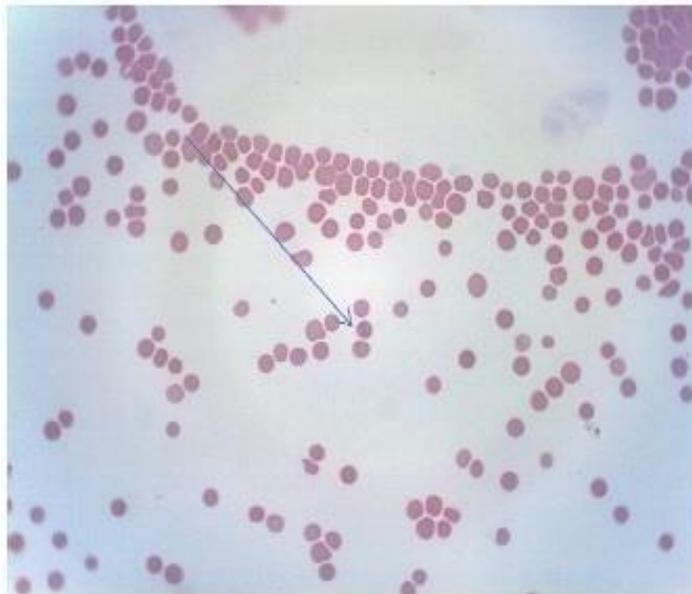
rebanho	idade	VG (%)
Alambari	Bezerros	34,6±1,2b
Ibaté	Bezerros	46,4±1,20a
Ibaté	Fêmeas adultas	34,8±1,26b
Dourado	Fêmeas adultas	39,9±1,32b
São Carlos	Fêmeas adultas	34,6±1,61b

Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente nas colunas ($p < 0,05$)

Apesar disso, apresentam altas médias de VG, que podem ter sido influenciadas pela ocorrência de diarreia que foi observada em muitos bezerros, tanto de Alambari como de Ibaté, mas com maior intensidade na primeira (**tabela 1**). Os valores de volume globular (VG) obtidos de todas as vacas e os bezerros de Alambari foram semelhantes (sem diferença significativa), enquanto a média para os bezerros de Ibaté foram significativamente maiores ($p < 0,05$) (**tabela 1**).

Pelo exame microscópico de esfregaços sanguíneos verificou-se amostras positivas somente para *B. bigemina*, e exclusivamente bezerros (**figura 8**) de Alambari, demonstrando 12% (3/25) dos animais estudados. Todos apresentaram níveis inferiores a 0,1% de eritrócitos parasitados.

Figura 8: Merozoíta de *B. bigemina* em eritrócito de sangue de búfalo corado por Giemsa (1000 X).



Fonte: autoria própria

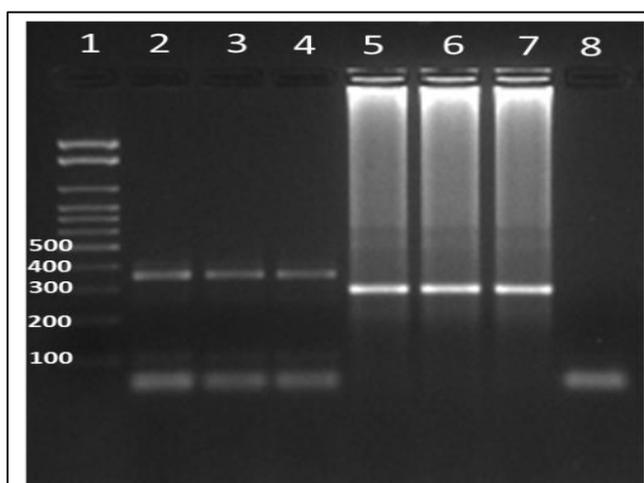
5.2 Resultados dos testes de PCR e nPCR para as amostras de DNA extraídas de sangue dos animais

5.2.1 *B. bovis* e *B. bigemina*

No presente estudo, foi utilizado como DNA alvo, sequências dos genes que codificam as proteínas associadas à roptria (*rap 1*), específicas para *B. bovis*. Os amplicons foram sequenciados e posteriormente depositados no GenBank. Os depósitos das sequências estão de acordo com a localização (KC907706 de Ibaté, KC907707 de São Carlos, KC907704 de Dourado e KC907705 de Alambari), e apresentaram alta similaridade (de 98 % a 100 %) para esta parasitemia. Apesar disto, nenhuma amostra de búfalo foi positiva na primeira reação (PCR) de amplificação de DNA para *B. bovis*, indicando que os animais apresentavam baixa quantidade deste protozoário na circulação sanguínea. Os resultados observados mostraram que a taxa de infecção por *B. bovis* para os búfalos estudados foi de 20.37% para os bezerros e as fêmeas adultas examinadas através do método nPCR e pela qPCR 100% dos animais

foram positivos. Foram positivos 22 animais para este hemoparasita em cada categoria (bezerro, vaca) na nPCR e 108 animais positivos na qPCR, respectivamente, conforme está apresentado na **tabela 2**. Para *B. bigemina* a taxa de infecção nos búfalos foram de 59.26% através da nPCR e pela qPCR foi 100%. As reações de PCR e nPCR para *B. bovis* em búfalos foram bem padronizadas, indicando não haver mudanças nos sítios de anelamento dos "primers" usados (**figura 9**).

Figura 9: Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *B. bovis* por Nested PCR. Poço 1= padrão de pares de bases; poços 2-4 = amostras positivas na PCR; poços 5-7 = amostras positivas na nPCR, poço 8= controle negativo da reação.



Fonte: autoria própria

Os dados relativos aos produtos amplificados (nPCR e qPCR) de infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* estão representados na **tabela 2**.

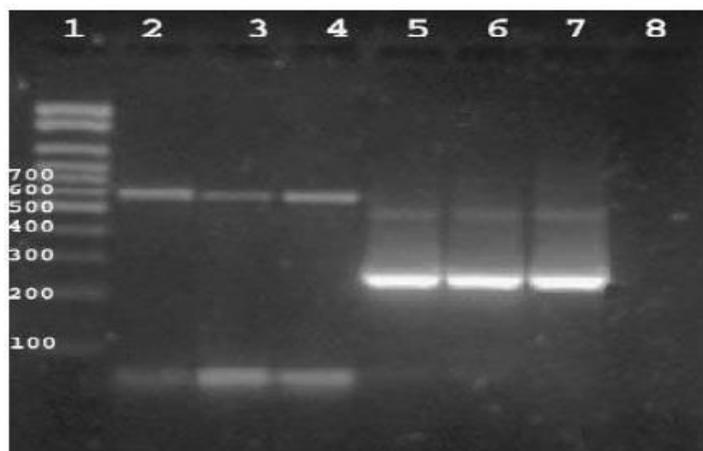
Tabela 2: Resumo da detecção molecular de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bubalinos determinados por nPCR e qPCR de acordo com o rebanho e idade.

Rebanho	Idade, (n)	+ <i>B. bigemina</i> % (n)		+ <i>B. bovis</i> % (n)	
		nPCR	qPCR	nPCR	qPCR
Alambari	Bezerros (n=25)	84,0 (21)	100.00 (25)	40.00 (10)	100.00 (25)
Ibaté	Bezerros (n=25)	24,0 (6)	100.00 (25)	4.00 (1)	100.00 (25)
Ibaté	Fêmeas adultas(n=23)	60,8(14)	100.00 (23)	21.74 (5)	100.00 (23)
Dourado	Fêmeas adultas(n=21)	85,7(18)	100.00 (21)	14.30 (3)	100.00 (21)
São Carlos	Fêmeas adultas(n=14)	35,7 (5)	100.00 (14)	21.43 (3)	100.00 (14)
Total	108	59,26 (64)	100.00 (108)	20.37 (22)	100.00 (108)

Os *amplicons* dos genes de RNA ribossomais 18S de *B. bigemina*, foram sequenciados e depositados no GenBank para as quatro localidades, respectivamente (KF1530076 São Carlos, KC333880.1 Ibaté, KC858975 Dourado e KC858976.1 de Alambari) e mostraram alta similaridade (93 % a 100 %).

As reações de PCR e Nested PCR para *B. bigemina* em búfalos também foram bem padronizadas, indicando não haver mudanças nos sítios de anelamento dos "primers" usados (figura 10).

Figura 10: Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *B. bigemina* por Nested PCR. Poço 1= padrão de pares de bases; poços 2-4 = amostras positivas na PCR; poços 5-7 = amostras positivas na nPCR, poço 8= controle negativo da reação.

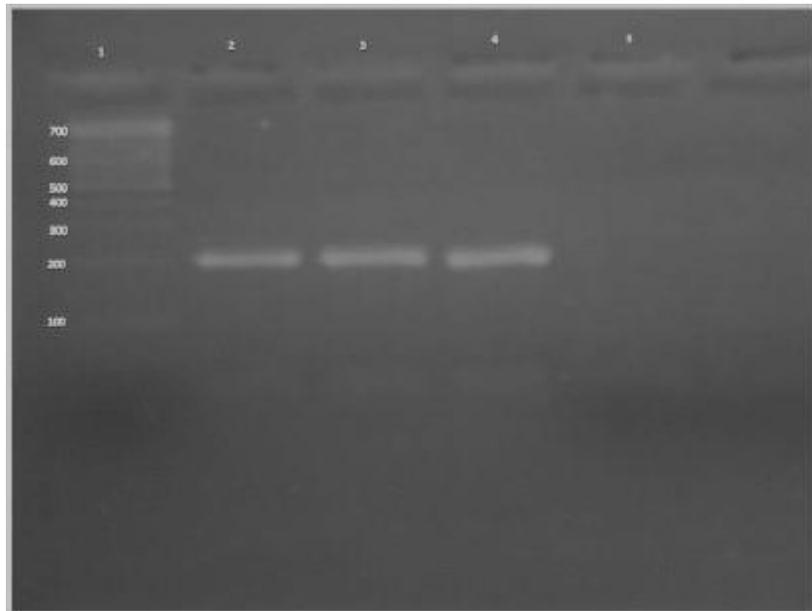


Fonte: autoria própria

5.2.2 *A. marginale*

Os ensaios de PCR para a detecção de *A. marginale* permitiu detectar este hemoparasita nas amostras de DNA de todos os búfalos testados, sendo visível a banda do tamanho esperado na reação (**figura 11**).

Figura 11: Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *A. marginale*. poço1= padrão de pares de bases, poços 2-4= PCR positivo, poço 5= controle negativo da reação.

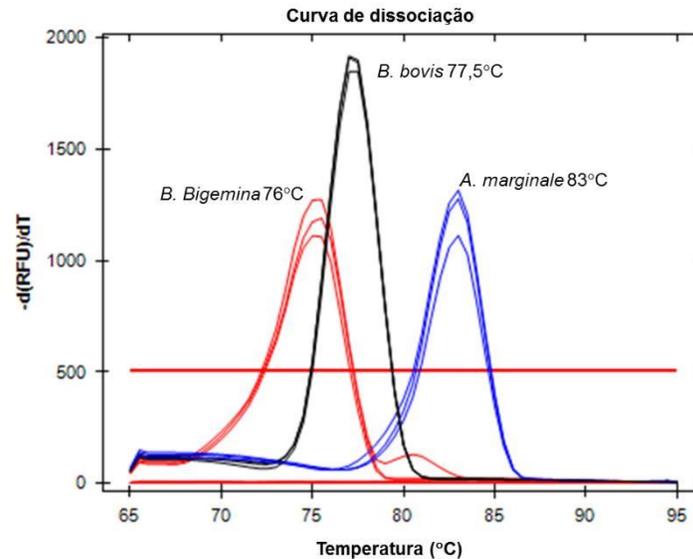


Fonte: autoria própria

5.3 Especificidade e sensibilidade da qPCR

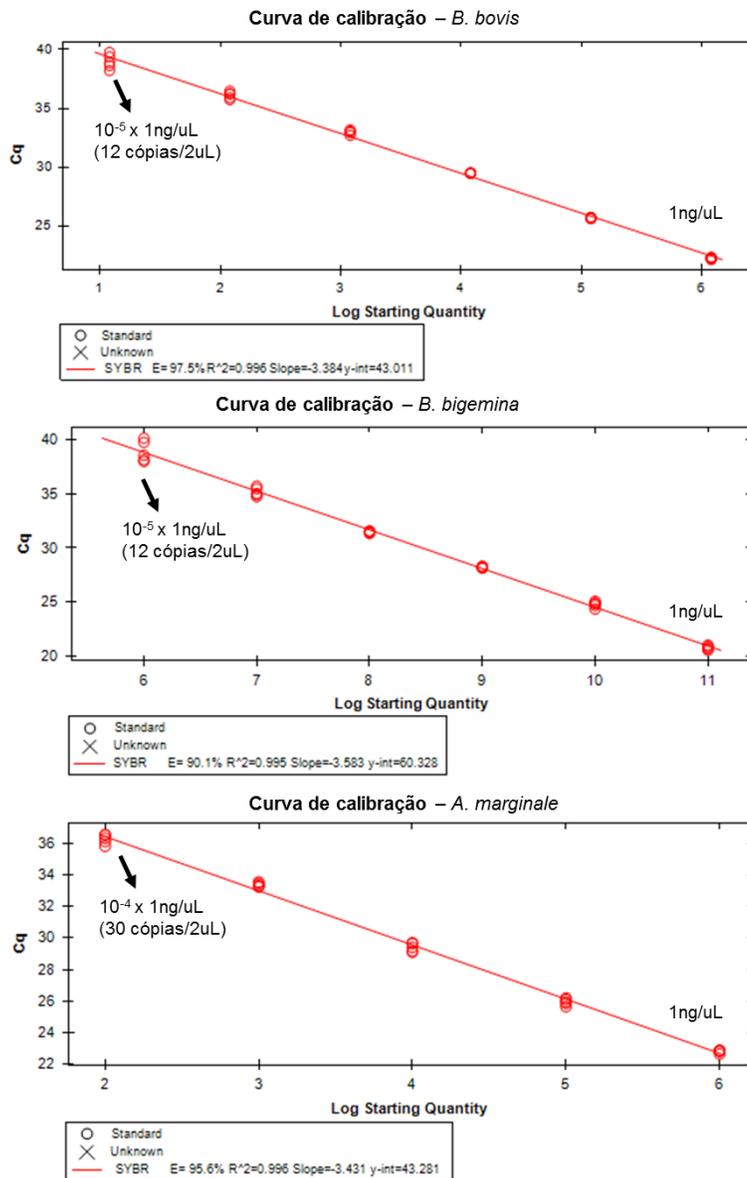
Em relação ao teste de especificidade para cada parasita estudado, um ensaio de qPCR mostrou temperaturas distintas das curvas de dissociação: 77,5°C, 76,0°C e 83°C, respectivamente, para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*. Esta discriminação está representada na **figura 12**.

Figura 12: Curva de dissociação para determinação dos amplicons de DNA de mt-cyB de *B. bovis* e *B. bigemina* e do fragmento do gene MSP1b de *A. marginale* testadas para isolados de cada espécie analisadas em triplicatas. *B. bigemina*= 76,0°C; *B. bovis*=77,5°C; *A. marginale*=83°C.



Para *B. bovis* e *B. bigemina* as sensibilidades da qPCR permitiu a detecção de até 12 cópias de DNA alvo nas amostras de sangue dos búfalos. O ponto de corte médio para as detecções das suas espécies corresponderam ao *cq* 39 (concentração: $1\text{ng/uL} \times 10^{-5}$). A partir deste ciclo, as amostras foram consideradas negativas. Para *A. marginale* a sensibilidade estimada foi de 30 cópias, com *Cq* médio de aproximadamente 36 (concentração: $1\text{ng/uL} \times 10^{-4}$), com o ponto de corte estabelecido para este valor. Os valores de E para cada curva do teste de sensibilidade para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* foram 97,5% e 90,1% e 95,6% respectivamente, mostrando que além de determinar a sensibilidade determinada pelo ponto de corte, boa reprodutibilidade na realização dos três ensaios. A **figura 13** representada as curvas de calibração construídas à partir de 1ng/uL de amostra de DNA para cada espécie de isolado para o qual avaliou sua sensibilidade e eficiência da reação (E).

Figura 13: Curvas de calibração construídas à partir de amostras de DNA diluídas de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* para determinação do ponto de corte. **Cq:** ciclo quantitativo



5.4 Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)

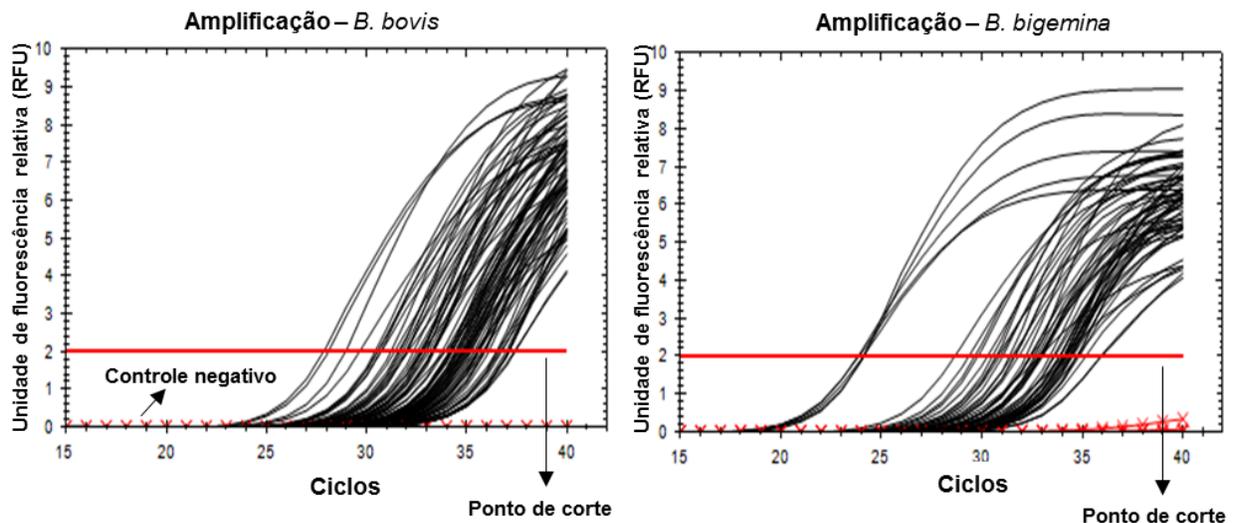
As curvas de calibração obtidas para os ensaios de qPCR possibilitaram a estimativa da quantidade de cópias de DNA de *Babesia spp.* E *A. marginale* presente nas amostras de sangue dos búfalos. As mesmas apresentaram valores de eficiência da reação (E), coeficiente de determinação (r^2) e *slope* dentro dos valores aceitáveis para a quantificação absoluta (95-105%). Para cada espécie analisada foram realizados três ensaios para a quantificação pela qPCR, cada um contendo uma curva de calibração. As médias seguidas dos desvios dos três parâmetros mencionados acima estão apresentados na **tabela 3**.

Tabela 3: Valores médios da eficiência da reação (E), coeficiente de determinação e slope para determinado para cada espécie estudada.

Espécie	E	r^2	Slope
<i>B. bovis</i>	97.77±1.65	0.996±0.001	3.376±0.040
<i>B. bigemina</i>	98.77±2.75	0.998±0.002	3.353±0.067
<i>A. marginale</i>	96.40±1.65	0.997±0.001	3.412±0.042

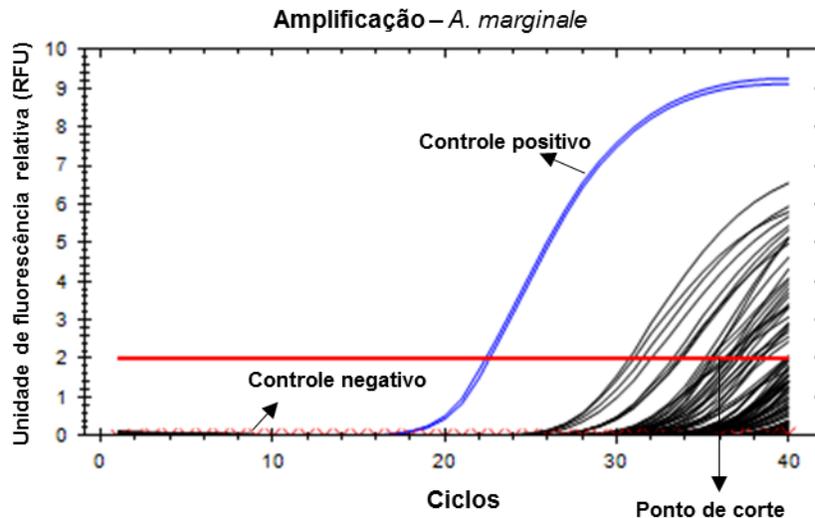
O intervalo de quantificação da curva de calibração para as quantificações do NC de *B. bovis* e *B. bigemina* ficaram estabelecidos entre 10^{-3} a 10^{-10} ($10^7 \times 12$ à $10^1 \times 12$ cópias/uL). As diluições 10^{-2} e 10^{-1} foram excluídas da curva, pois se observou que nas quantificações essas diluições não eram necessárias. Todas as amostras de DNA dos búfalos analisadas se apresentaram positivas para a presença de *B. bovis* e *B. bigemina* (**tabela 2**), uma vez que as mesmas apresentaram valores abaixo do ponto de corte determinado para as duas espécies ($Cq=39$), como apresentado na **figura 14**. O valor médio do Cq da menor concentração da curva de calibração, para as duas espécies, foi de aproximadamente 39, sendo o mesmo valor determinado pelo ponto de corte. Desta forma, a curva de calibração possibilitou a quantificação de todas as amostras que foram consideradas positivas para as duas espécies de babesias.

Figura 14: Amplificações dos produtos da qPCR de *B. bovis* e *B. bigemina*. Para ambas espécies, todas as amostras foram consideradas positivas baseadas no ponto de corte ($C_q=39$). Não houveram amplificação dos controles negativos.



Para a quantificação do NC do DNA de *A. marginale* o intervalo de quantificação ficou estabelecido entre 10^{-4} e 10^{-9} . A diluição 10^{-10} da curva não foi utilizada devido sua reprodutibilidade, a qual não reproduziu mais de 50% de *amplicons*, como já foi verificado no teste de sensibilidade. Os ensaios realizados para a detecção e quantificação de *A. marginale*, com base do ponto de corte estabelecido para sua detecção ($C_q=36$), a maioria das amostras foram negativas para esta espécie, como nota-se na **figura 15**. Assim como já verificado para *B. bovis* e *B. bigemina*, as médias dos C_q s da menor concentração da curva de calibração ficaram próximas do ponto de corte definido para detecção de *A. marginale*, possibilitando assim a quantificação de todas as amostras consideradas positivas ($C_q \leq 36$). Em relação a detecção de *A. marginale*, apenas 23,2% ($n=25$) foram considerados positivos para este parasita (**tabela 4**).

Figura 15: Amplificações dos ensaios de qPCR para detecção e quantificação de *A. marginale*. Para este ensaio, nota-se que mais da metade das amostras de DNA foram negativas para esta espécie, pois amplificaram após o ponto de corte estabelecido para sua detecção (Cq=36).



A **tabela 4** apresenta as porcentagens de búfalos detectados como positivos pelas duas técnicas estudadas (Nested-PCR e qPCR) separados por região de criação dos animais.

Em relação à técnica da qPCR, como já mencionado, todos os animais foram positivos para *B. bovis* e *B. bigemina*, não havendo diferenças estatísticas de infecção entre as regiões estudadas (**tabela 4**). Entretanto, em relação à detecção de *A. marginale*, foi verificado que a região de Alambari, origem apenas dos bezerros, foi o local de maior de infecção ($P>0.05$) verificada desta espécie, com cerca de 68% do total de positivos, seguidos por Dourado-SP e São Carlos-SP (**tabela 4**).

Tabela 4: Resumo da detecção molecular de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *A. marginale* em búfalos d'água determinado por nested PCR (nPCR) e PCR quantitativo (qPCR), de acordo com o rebanho e categoria.

Rebanho	Categoria, (n)	+ <i>B. bigemina</i> % (n)		+ <i>B. bovis</i> % (n)		+ <i>A. marginale</i> % (n)	
		nPCR	qPCR	nPCR	qPCR	nPCR	qPCR
Alambari	Bezerros (n=25)	84.00 (21)	100.00 (25)	40.00 (10)	100.00 (25)	100.00 (25)	68.00 (17)
Ibaté	Bezerros (n=25)	24.00 (6)	100.00 (25)	4.00 (1)	100.00 (25)	100.00 (25)	0.00 (0)
Ibaté	Vacas (n=23)	60.87 (14)	100.00 (23)	21.74 (5)	100.00 (23)	100.00 (23)	8.00 (2)
Dourado	Vacas (n=21)	85.71 (18)	100.00 (21)	14.30 (3)	100.00 (21)	100.00 (21)	12.00 (3)
São Carlos	Vacas (n=14)	35.71 (5)	100.00 (14)	21.43 (3)	100.00 (14)	100.00 (14)	12.00 (3)
Total	108	59.26 (64)	100.00 (108)	20.37 (22)	100.00 (108)	100.00 (108)	23.2 (25)

Em relação à análise dos dados do NC, foram verificadas diferenças significativas ($P < 0.05$) entre as espécies estudadas, os locais e a interação para as duas variáveis, a qual evidência que a flutuação de cada espécie de hemoparasita variou entre as regiões estudadas (**tabela 5**). O maior nível de infecção foi verificado para *B. bovis*, seguido por *B. bigemina* e *A. marginale* que foram $2,81 \pm 0,07$, $2,61 \pm 0,07$ e $0,57 \pm 0,07$, respectivamente (**tabela 5**). Em relação a região estudada, Alambari apresentou o maior nível de infecção que diferiu ($P < 0.05$) de todas as outras regiões. Os valores dos NC estão apresentados na **tabela 5**, que mostra o nível de infecção das três espécies separadas por região estudada.

Tabela 5: Médias e erros padrão do número de cópias (NC) do gene Mt-cyt B de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *A. marginale* de qPCR em amostras de sangue de búfalos d'água, de acordo com a região e categoria estudada.

Região	Categoria	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>	<i>A. marginale</i>	Total
Alambari	Bezerro	$3.48 \pm 0.14a$	$2.78 \pm 0.14a$	$2.00 \pm 0.14a$	$2.75 \pm 0.09a$
Dourado	Vaca	$2.69 \pm 0.15bc$	$2.54 \pm 0.15ab$	$0.35 \pm 0.15b$	$1.86 \pm 0.10bc$
Ibate	Vaca	$2.61 \pm 0.14bc$	$2.34 \pm 0.14bc$	$0.12 \pm 0.15b$	$1.69 \pm 0.10c$
Ibate	Bezerro	$2.32 \pm 0.14c$	$2.57 \pm 0.14ab$	$0.01 \pm 0.14b$	$1.63 \pm 0.09c$
São Carlos	Vaca	$2.95 \pm 0.18b$	$2.82 \pm 0.18a$	$0.39 \pm 0.18b$	$2.05 \pm 0.12b$
Total	-	2.61 ± 0.07	2.81 ± 0.07	0.57 ± 0.07	-

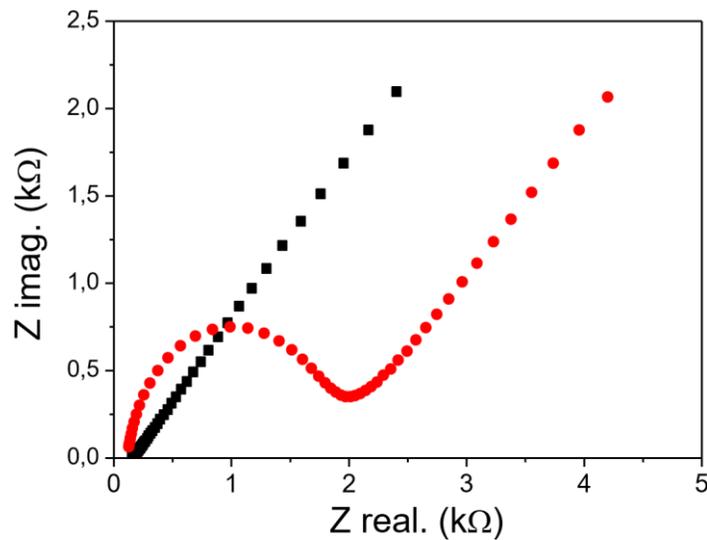
5.5 Resultados do Biossensor

Primeiramente, o processo de imobilização dos antígenos na superfície de Au (ouro) foi avaliado por EIS. Variações da impedância dos filmes com as etapas do processo de imobilização servem para caracterizar a ligação entre as moléculas e a superfície do eletrodo. Uma medida típica apresenta um semicírculo, cujas dimensões são proporcionais aos valores das impedâncias resistivas no eixo das abscissas e capacitivas nos eixos das ordenadas (ROWE et al., 2011).

A **figura 16** mostra os diagramas de Nyquist (impedância imaginária x impedância real) obtidos utilizando o eletrodo proposto. O diagrama de Nyquist em

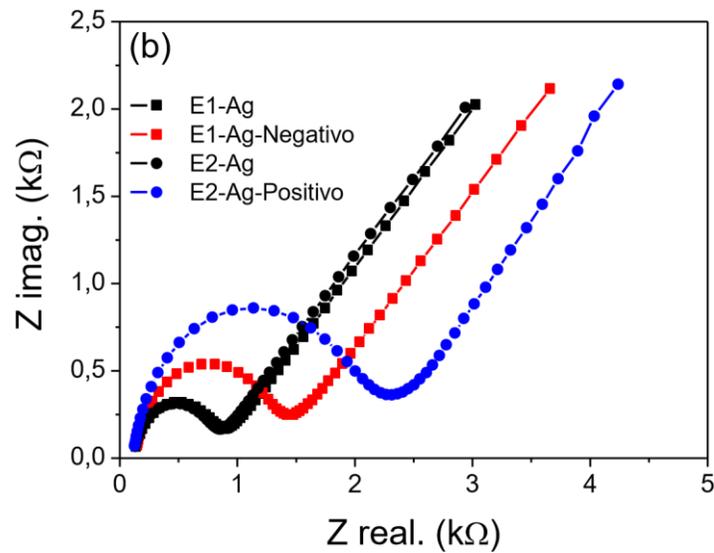
preto foi obtido para o eletrodo de trabalho sem modificação. Já o diagrama em vermelho foi obtido após a imobilização de antígenos de *Babesia bovis* e bloqueio com monoetanolamina no mesmo eletrodo de trabalho. Estes resultados foram testados para a maioria dos eletrodos e são bastante reprodutíveis.

Figura 16: Diagrama de Nyquist (impedância imaginária x impedância real) obtidos utilizando o eletrodo proposto para o eletrodo de trabalho sem modificação (preto) e após a imobilização de antígenos de BB e bloqueio com monoetanolamina no mesmo eletrodo de trabalho (vermelho).



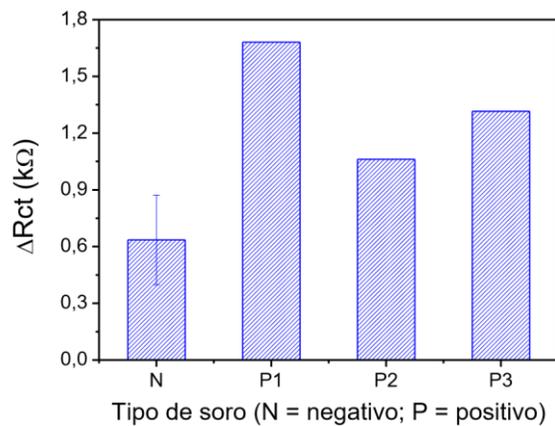
Após a etapa de imobilização e bloqueio, os eletrodos foram testados para a detecção de anticorpos anti-*B.bovis*. Neste caso, espera-se um sinal relativamente alto devido à ligação antígeno-anticorpo no caso dos soros positivos. A **figura17** mostra os diagramas de Nyquist obtidos para o soro negativo e um dos soros positivos.

Figura 17: Diagramas de Nyquist (impedância imaginária x impedância real) (b) para os soros positivo e negativo de *Babesia bovis* em diferentes eletrodos com o tempo de exposição dos eletrodos ao soro de 20 minutos.



Já na **figura 18** resume os resultados obtidos, onde a diferença entre a resistência de transferência de carga na impedância eletroquímica foi calculada (via software do equipamento) para cada eletrodo antes e após a exposição a cada tipo de soro.

Figura 18: Representativo da diferença entre a resistência de transferência de carga calculada (via software do equipamento) para cada eletrodo antes e após a exposição a cada tipo de soro. Três soros positivos de diferentes animais foram testados e um soro negativo foi medido em três eletrodos diferentes.



6. DISCUSSÃO

A análise para detecção de hemoparasitas em bubalinos é de grande importância para ampliar os conhecimentos sobre a real extensão da infecção pelos agentes da TPB em rebanhos bubalinos criados no estado de São Paulo. As técnicas de biologia molecular atualmente utilizada superam os diagnósticos parasitológicos convencionais, como os de esfregaços sanguíneos. A detecção dos protozoários *B. bovis* e *B. bigemina* e da rickettsia *A. marginale* por meio de técnicas moleculares (**tabela 4**), assegura metodologias mais sensíveis para a busca desses hemoparasitas em animais portadores saudáveis, e também permitindo a ampliação dos estudos sobre a dinâmica dessas infecções.

Estudos epidemiológicos sobre a prevalência da infecção por babesias, são essenciais para a previsão de surtos destas enfermidades. A estabilidade endêmica caracteriza a maior parte das regiões brasileiras, onde a presença do carrapato *R. (B.) microplus* ocorre durante todo o ano, de modo que a transmissão desses protozoários é suficiente para contaminar grande parte dos bezerros, antes que a imunidade proporcionada pelo colostro seja perdida, como foi descrito por MAHONEY & ROSS, 1972 na Austrália.

Amostras de sangue de animais com diferentes idades foram testadas por diferentes métodos para diagnosticar a infecção pelos hemoparasitas: exame direto, nPCR e qPCR. Dados de VG (Volume Globular - hematócrito) foram usados como indicadores de saúde dos animais.

Os valores do volume globular (VG) dos búfalos foram próximos aos descritos para bovinos saudáveis que pode variar de 24% a 46% (JAIN, 1993). Nossos achados são semelhantes aos verificados por Silva et al., (1992) que trabalharam com diversas raças de búfalos criados no Vale do Ribeira em São Paulo. Estes autores encontraram maiores valores de VG nos animais mais jovens sendo que decresceu com a idade. Uma pesquisa realizada por França e colaboradores (2011) mostrou que búfalos mestiços da região central do Rio Grande do Sul com idades diferentes, seis meses, um e dois anos, apresentaram valores diferentes de VG, tendo os animais mais jovens maiores valores quando comparados com os mais velhos. No presente estudo,

podemos observar que os bezerros de Alambari apresentam níveis de VG semelhantes aos dos animais adultos e, significativamente inferiores aos observados nos bezerros de Ibaté. A média dos valores de VG encontrada para os bezerros de Alambari e Ibaté neste trabalho foi de $(34.60 \pm 1.20$ e $46.40 \pm 1.20)$ que divergiu dos encontrados por Gomes et al.(2010) que foi de 40.6 ± 3.2 para animais criados no estado de São Paulo. Segundo Jain (1993), o VG dos animais no terceiro e quarto mês de vida são reduzidos, em decorrência da substituição das hemácias fetais, o que pode explicar os menores valores de VG apresentado pelos bezerros de Alambari. Apesar disso, sabese que os búfalos podem apresentar variações nos valores do VG de acordo com a idade, região de criação e manejo nutricional e sanitário a que são submetidos (Ferrer et al., 2000; Fenández et al., 2005).

A detecção microscópica de hemoparasitas em esfregaços de sangue é usado para o diagnóstico de babesiose aguda, mas essa detecção é difícil em animais portadores com baixos níveis de parasitemia (ALMERIA et al., 2001). Assim, a reação de PCR usada no presente estudo para identificar a presença dos protozoários (*Babesia* spp) em amostras de sangue de bubalinos, é uma técnica com maior sensibilidade e especificidade. O exame direto de esfregaço sanguíneo comparado com o ensaio de nPCR, confirmou que a sensibilidade do primeiro teste não é suficiente para detectar *B. bovis* e *B. bigemina* em animais portadores. Estes resultados, foram semelhantes aos encontrados por TERKAWI et al. (2011) que em um total de 305 amostras de sangue de búfalos portadores, não encontraram nenhum animal positivo para *Babesia* spp. Por meio do método de esfregaço sanguíneo, contudo, pela técnica da nPCR encontraram 11.2% de animais infectados por *B. bovis* e 3.6% por *B. bigemina*.

Os dois “primers” utilizados nos ensaios de PCR para babesias amplificam uma região do gene 18s, sendo uma região altamente conservada no hemoparasita, fato que colaborou na prevenção do surgimento de falso- negativos. Na primeira reação (KB 16 e KB 17) o “primer” é comum às duas babesias (*B. bovis* e *B. bigemina*), e na segunda reação de nPCR (KB 18 e KB19) o par de “primers” são específicos para *B. bigemina* (GUERRERO et.al., 2007). Os ensaios de nPCR para *B. bovis* foram feitos usando “primers” (BoFN/BoRN) descritos por Figueroa et al (1993). O gene alvo é o

que codifica a proteína de roptria 1 (*rap -1*) e tem sido usado para a detecção de *Babesia bovis* no Egito, Sul da África, Brasil, Portugal, Siri Lanka e nas Filipinas (ELSIFY et al., 2015). Nossos dados, corroboram os achados de SALAS et al. (2016), que também usaram nPCR para detecção de babesias em bubalinos, encontrando frequências de infecção menores (16.2% para *B. bovis* e 24% para *B. bigemina*).

O ensaio de nPCR mostrou que a sensibilidade deste método para a detecção de DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* foi menor quando comparado ao método de qPCR nos mesmos bubalinos testados (**tabela 4**), onde observamos 100% de positividade aos parasitas.

Neste estudo foram identificados 20.37% amostras de DNA de búfalos positivos para *B. bovis*, enquanto para *B. bigemina* foram encontrados 59.26% (**tabela 4**). Estes resultados divergem dos encontrados por BAWN et al. (2016) em diferentes regiões de Myanmar, que detectaram através da técnica de nPCR apenas 17,1% do gene *rap-1* para *B. bovis* em um total de 713 bovinos avaliados.

Nossos dados divergem dos descritos por Obregón et al. (2012) em Cuba, que encontraram 42,1% de animais positivos para *B. bovis* pela nPCR, usando também como alvo o gene de *rap-1* usado nesse experimento.

Apesar da grande sensibilidade dos testes de nPCR, sabe-se que falsos negativos podem acontecer, devido à presença de substâncias inibidoras da polimerase que podem ser co-purificadas com o DNA, porque a sequência identificada pelos primers está presente em quantidades muito pequenas (Barker et. al., 1994).

O método de qPCR permitiu detectar quantitativamente os níveis de infecção por *Babesia spp* presentes no DNA genômico do hospedeiro e também apresenta algumas vantagens como precisão, baixo risco de contaminação e menor tempo de incubação, quando comparado com outros métodos moleculares. Assim pudemos verificar que os testes de qPCR empregados neste estudo demonstraram, alta sensibilidade e especificidade em quantificar os fragmentos de DNA de *B. bigemina* e *B. bovis*, como descrito por Buling et al. (2007). Estes autores compararam a qPCR desenvolvida por eles (também usada no experimento) com a PCR convencional empregando o gene 18S do rRNA ribossomal de *B. bovis* e *B. bigemina* em amostras de DNA extraídas de sangue de 80 cavalos. Eles detectaram um cavalo infectado por

B. bovis e dois por *B. bigemina* usando a qPCR, porém nenhum foi animal foi detectado pela PCR.

O estudo realizado por Giglioti et. al (2016) mostrou que a mesma qPCR pôde distinguir entre as duas espécies de *Babesias*. Esses autores trabalharam com bovinos da raça Angus criados em área endêmica do estado de São Paulo e encontraram 100% e 98% de animais infectados por *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente.

Com relação ao NC encontradas para os búfalos das diferentes fazendas estudadas no presente experimento, não temos dados para comparar. Trabalhando com bovinos da raça Angus Giglioti et al. encontraram média do NC (e erro padrão) significativamente diferentes ($P < 0,05$) para *B. bovis* (1.49 ± 0.07) e *B. bigemina* (0.82 ± 0.06). No presente estudo pudemos também verificar diferenças significativas ($P < 0,05$) no NC das duas espécies de babesias, locais e interação das duas variáveis. As médias do NC de *B. bovis* ($2.81 \pm 0,07$) e *B. bigemina* ($2.61 \pm 0,07$) encontradas nas amostras de sangue dos búfalos foram maiores que aquelas observadas para os bovinos. Os mecanismos que levam a baixos níveis de parasitemia por *B. bovis* e *B. bigemina* em búfalos são desconhecidos, embora saiba-se que as babesias infectam vários vertebrados sem que eles apresentem qualquer sintoma.

Com relação aos testes de diagnóstico de *A. marginale* pôde-se verificar altas frequências de infecção usando a técnica de nPCR (**tabela 4**). Esses dados obtidos, diferem dos encontrados por Silva et al. (2014) que empregando a mesma técnica obteve somente 5,4% de animais positivos, em um total de 500 amostras colhidas aleatoriamente de búfalos. Silva et al. (2016) também detectaram amostras positivas para o gene *msp1* de *A. marginale* em bezerras (bovinos) criados na região de Taiaçu (SP) e encontraram frequências de infecção de 12,85% e 80,4% usando as técnicas de nPCR e qPCR, respectivamente. Esses dados, divergem dos resultados obtidos no presente estudo, em que a técnica de nPCR apresentou maior sensibilidade na detecção desta rickettsia em bubalinos quando comparada com qPCR (**tabela 4**).

Em uma pesquisa realizada por Corrêa et al. (2011), usando a mesma técnica de nPCR que a usada no presente experimento, foi possível detectar 16 animais positivos (5,4%) para *A. marginale*, em um total de 295 amostras de búfalos, criados no estado do Rio de Janeiro. As altas frequências de infecção por *A. marginale* verificadas

no presente experimento corroboram o estudo de Corona et al., (2012) em Cuba que encontraram 90,4% de búfalos positivos a esta bactéria, ao analisarem 52 amostras de DNA originárias de seis propriedades escolhidas ao acaso. Na verdade, altas frequências de infecção por *A. marginale*, eram esperadas tendo em vista a maior facilidade de dispersão deste parasita e a sua ampla distribuição no globo terrestre, podendo ser encontrado em toda a região tropical, subtropical e temperada (KOCAN et al., 2003). Baixas frequências de infecção por *A. marginale* foram detectadas em búfalos criados no estado do Pará por Silva et al. (2014). Estes autores usaram nPCR que tinha o gene que codifica o MSP5 como alvo. Uma das prováveis causas para a baixa frequência de infecção encontrada por esses autores foi a baixa infestação por carrapatos nos animais, propiciada talvez pela ausência de bovinos na região.

A qPCR para a quantificação do DNA de *A. marginale* no sangue dos búfalos detectou apenas 23,2% de animais infectados. Nossos dados, divergem dos resultados obtidos no estudo de Carelli et al. (2007), que utilizando o mesmo gene (*msp1b*) e a reação de qPCR, quantificou e detectou DNA de *A. marginale* em amostras de sangue de bovinos. Através desta técnica, foram identificados 39 animais positivos para esta rickettsia, em um total de 51 testados. A reação de nPCR também foi feita e comparada com a qPCR, que apresentaram uma concordância de 100% nos resultados obtidos. A grande diferença encontrada na detecção do DNA de *A. marginale* por qPCR e nPCR nos animais do presente experimento pode estar relacionada aos genes alvo usados em cada protocolo, que foram diferentes. Os fatores que poderiam influenciar nos resultados diferentes são a concentração e a qualidade do DNA extraído das amostras de sangue. Porém, foram usadas as mesmas amostras extraídas com kit que proporciona ótima qualidade e pureza do DNA, em todas as análises. Outro fator que deve ser considerado é que a quantidade de DNA dos parasitas, apresentavam-se em quantidades limitadas, tendo em vista que todas as reações precisaram da segunda PCR para evidenciar as bandas de diagnóstico.

Embora as técnicas de biologia molecular e ferramentas afins sejam de alta especificidade, quando utilizadas para os diagnósticos de diversas doenças, incluindo as hemoparasitoses, o custo das mesmas compromete sua utilização na rotina, quando pensamos em grandes rebanhos. Assim, a utilização de novas plataformas que

proporcionam custos menores é de grande valia para o diagnóstico dessas doenças. E nesse estudo utilizamos um biossensor eletroquímico (EIS) que permite diagnóstico rápido, com alta especificidade, baixo custo e facilidade de instrumentação aliada a tecnologias de miniaturização e microfabricação. Para essa plataforma foi realizado ensaios pertinentes a detecção de *B. bovis* devido a sua patogenicidade.

Dessa forma, a adição de materiais no filme de Au, seja na etapa de funcionalização, seja na etapa de detecção do analito pode ser facilmente detectada através da técnica EIS, pois altera a resposta na impedância eletroquímica principalmente devido às mudanças na capacitância da dupla camada e na resistência de transferência de cargas (BURCU e SEZGINTÜRK, 2015). No nosso estudo, conforme ocorre a ligação antígeno-anticorpo, por exemplo, a resistência de transferência de carga tende a se tornar maior à medida que se aumenta as concentrações do analito (anticorpo anti-*Babesia bovis*). A presença da reta a aproximadamente 45° após o semi-círculo é referente à difusão das espécies no sistema (XU e DAVIS, 2014). Os diagramas de Nyquist obtidos utilizando a configuração eletroquímica um eletrodo de Au como eletrodo de trabalho, o outro eletrodo de Au como contra eletrodo e um eletrodo de platina como pseudo referência sem modificação (primeiro EIS), indicam que o eletrodo de Au apresentada uma resistência muito baixa (**figura 16**). O diagrama de Nyquist em vermelho foram obtidos após a imobilização dos antígenos no eletrodo de trabalho e etapa de bloqueio conforme o protocolo de imobilização descrito na parte experimental (**figura 16**). É interessante notar que o aumento/diminuição é expressivo.

A diferença nos diagramas está relacionada com o processo de imobilização, uma vez que aos antígenos bloqueiam a transferência eletrônica entre eletrólito e superfície do eletrodo de Au, neste caso já modificado. Na (**figura 17**), que compara os diagramas de Nyquist obtidos para o soro negativo e um dos soros positivos em diferentes eletrodos. Vale destacar, a reprodutibilidade da medida no caso da imobilização dos antígenos, uma vez que os diagramas são praticamente os mesmos. Estimamos uma média da medida de Rct para quatro eletrodos diferentes após a etapa de imobilização do antígeno. O valor obtido desta média foi $R_{ct} = 752,25 \Omega$ com erro percentual de 10 %. O erro parece alto, contudo é condizente com a literatura

(RIBOVSKI, 2015) e ainda é irrelevante quando exposição ao soro, onde Rct aumenta para ambos os casos, tanto nos soros positivos e no soro negativo. Contudo, o aumento é muito mais expressivo para o soro positivo (**figura 17**). Ainda, observa-se uma diferença significativa na variação de Rct (DRct) dos soros positivos. Na (**figura 18**), observa-se claramente que para a amostra 1 positiva possui um alto valor de Rct aumentado para ambos. Este fato pode estar relacionado a uma expressão de anticorpos anti-BB muito maior neste animal comparativamente aos demais. Contudo, fica evidente na (**figura 18**) que as alterações na impedância do sistema evidenciaram claramente que o biossensor proposto é capaz de diferenciar/detectar quais animais estavam infectados, podendo ser explorado para a detecção rápida da *B. bovis* e estendido também para a detecção de *B. bigemina* e *A. marginale* no futuro.

Devido ao longo tempo dispensado nas outras etapas do trabalho, a parte referente ao biossensor, ainda necessita de mais estudos. Por exemplo, um estudo sistemático de otimização do protocolo de imobilização e da etapa de detecção (tempo de exposição, temperatura, pH) , testes de reprodutibilidade, mais testes negativos e de interferentes, estatística, etc. Para num futuro próximo, que esse dispositivo esteja disponível para o diagnóstico rápido e com baixo custo.

7. CONCLUSÃO

- 1) Os resultados obtidos neste estudo, permitiram detectar altas frequências de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* em búfalos bezerros e vacas, criados em área endêmica do estado de São Paulo.
- 2) As técnicas de amplificação de DNA por nPCR e qPCR demonstraram alta especificidade e sensibilidade para a detecção de *A. marginale* e *Babesia* spp em amostras de sangue de búfalos;
- 3) O método de qPCR padronizado no experimento, permitiu quantificar o nível de infecção pelos três hemoparasitas nas amostras de sangue dos búfalos estudados;
- 4) O biossensor utilizado no experimento através da técnica de EIS, foi capaz de diferenciar/detectar quais animais (bovinos) estavam infectados, podendo ser explorado para a detecção rápida da *B. bovis* e estendido também para a detecção de *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em grandes rebanhos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERIA, S.; CASTELLA, J.; FERRER, D.; ORTUNO, A.; ESTRADA-PENÃ, A.; GUTIERREZ, J.F. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. **Vet. Parasitol**, n.99, p. 249-259, 2001.

AMARANTE, A.F.T., OLIVEIRA, H.N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus* and adult *Boophilus microplus* using DNA probe. **Experimental Parasitology**, and eggs in São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.130, p.61-67, 2005.

APARICIO, M.T.S.; ROSAS, M.F.; FERRAZ, R.M.; DELGUI, L.; VELOSO, J.J.; BLANCO, E.; VILLAVERDE, A.; SOBRINO, F. Discrimination Foot-and-Mouth Disease Virus-Infected and Vaccinated Animals by Use of β -Galactosidase Allosteric Biosensors. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.8, p. 1228-1235, 2009.

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 agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. **Vet. Parasitol.**, v. 74, n. 2-4, p. 101-108, 1998.

ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; BASTOS, P.A.S.; MARQUES, A.P.C. Frequência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.50, n.3, p. 243-246, 1998.

ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; SOARES, C.O.; KESSLER, R.H. progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.23, n.4, p. 139-148, 2003.

AUBRY, P.; GEALE, D.W.A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases, Malden**, v.58, n.1, p. 1-30, 2011.

BABES, V. Sur l' hemoglobinuria bacterienne du boeuf. **Comptes rendus hebdomadaires des seances de l' Academie des Sciences**, Paris, v.107, p. 692-694, 1888.

BAW, S.; HTUN, L.L.; MAW, N.N.; NGWE, T.; TOSA, Y.; KON, T.O.; KANEKO, C.; NAKAO, R.; SAKURAI, T.; KATO, H.; KATAKURA, K. Molecular survey of Babesia infections in cattle from different areas of Myanmar. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, p. 204-207, 2016.

BARKER, R.H; DNA probe diagnosis of parasitic infections. **Exp. Parasitol**, v. 70, p. 494-99, 1990.

BERENGUER, J.G. **Manual de parasitologia: morfologia e biologia dos parasitos de interesse sanitario**. ARGOS, p. 602, 2006.

BERNARDES, O. Os Búfalos no Brasil. In: II SIMPÓSIO DE BÚFALOS DE LAS AMÉRICAS E, II SIMPÓSIO EUROPA-AMERICA, Medellín, Proceedings..., Medellín/Colombia; v.3, p.18-23, 2006.

BILHASSI, T. B.; OLIVEIRA, H. N.; IBELLI, A. M. G.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; BRESSANI, F. A.; MALAGÓ JR, W.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, M. C. S. Quantitative study of Babesia bovis infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, n.3, p.234-238, 2014.

BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, sup.51, p. S247-S269, 2004.

BÖSE, R., JORGENSEN, W.K., DALGLIESH, R.J., FRIEDHOFF, K.T., DeVOS, A.J.

Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Vet. Parasitol.**, v.57, p.61-74, 1995.

BOSE, R.; JACOBSON, R.H.; GALE, K.R.; WALTISBUHL, D.J. & WRIGHT, I.G. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. **Parasitology Research**, v. 76, n. 8, p. 648652, 1990.

BOWMAN, D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. Elsevier Health Sciences Brazil, p. 448, 2010.

BRANDÃO, LP., HAGIWARA, M.K. Babesiose canina – Revisão. **Clínica Veterinária**, n.41, p.50-59, 2002.

BRAYTON, K.A.; KAPPMAYER, L.S. HERDON, D.R.; DARK, M.J.; TIBBALS, D.L.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.P.; JR. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.102, n.1, p. 844-849, 2005.

BRITO, L.G, OLIVEIRA, M.C.S., ROCHA, R.B., SILVA NETTO, F.G., MARIM, A.D., SOUZA, C.R., VENDRAME, F.B., MOURA, M.F. *Anaplasma marginale* infection in cattle from southwestern Amazonia. **Pesq. Vet. Bras**, v.30, n.3, p. 249-254, 2010.

BRITO, L.G.; ROCHA, R.B.; BARBIERI, F.D.S.; RIBEIRO, E.S.; VENDRAMI, F.B.; SOUZA, G.C.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L.C.A.; FALCOSKI, T.O.R.S.; TIZIOTO, P.C.; OLIVEIRA, M. *Babesia bovis* infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. **Ticks Tick Borne Dis**, v.4, p.78-82, 2013.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ACENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBACARRETERO, J.C.; FLORIN-CRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for

the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Vet.Parasitol.**, v.147, p.16-25, 2007.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ACENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBACARRETERO, J.C.; FLORIN-CRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Vet.Parasitol.**, v.147, p.16-25, 2007.

BURCU BAHADIR, E. and M. KEMAL SEZGINTÜRK, Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. **Talanta**, v.132, p. 162-174, 2015.

CALDER, J.A., REDDY, G.R.; CHIEVES, L.; COURYNEY, C.H.; LITTELL, R.; LIVENGOOD, J.R.; NORVAL, R.A.; SMITH, C.; DAME, J.B. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. **J.Clin.Microbiol**, v.34, n.11, p.2748-2755, 1996.

CALLOW, L.L.; MCGAVIN, M.D. Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v.39, n.1, p.15-21, 1963.

CALLOW, L.L.; MELLORS, L.T. & MCGREGOR, W. Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. **International Journal for Parasitology**, v.9, p. 333-338, 1979.

CARAGUEL, C.G.B.; STRYHN, H.; GAGNÉ, N.; DOHOO, I.R.; HAMMELL, L. Selection of a cutoff value for a real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. **J Vet Diagn Invest**, v.23, n.2, p. 215, 2011.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 1-2, p.

107-114, 2007.

CARSON, C.A., BUENING, G.M. The immune response of cattle to live and inactivated *Anaplasma vacines* and response challenge. **S Afr Vet Assoc**, v.38, n.4, p.330-331, 1979.

CAVALCANTE, G.G. Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bezerros da raça Nelore no Estado de São Paulo, 2007. São Paulo, 2007. 124p. Dissertação (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

CONNAWAY, J.W.; FRANCINES, M. Texas Fever: experiments made by Missouri Experiment Station and the Missouri State Board of Agriculture in cooperation with Texas Experiment Station in immunizing Northern breeding cattle against Texas Fever from the Southern trade. **Missouri Agriculture Experiment Station Bull**, v.48, p.1-64, 1899.

CORONA, B., OBREGÓN, D., MARTÍNEZ, S., ESPINOSA, I., FONSECA, A.E., ROQUE, E. Detección por PCR de *Anaplasma marginale* en búfalos de la región occidental de Cuba. **Rev. Salud Anim.** v.34, n°1, p.1-8, 2012.

CORRÊA, F.N. Estudo epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro). Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Medicina veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p. 99, 2011.

De LA FUENTE J; LEW A; LUTZ H; MELI ML; HOFMANN-LEHMANN R; SHKAP V; MOLAD T; MANGOLD AJ; ALMAZAN C; NARANJO V; GORTAZAR C; TORINA A; CARACAPPA S; GARCIA-PEREZ AL; BARRAL M; OPORTO B; CECI L; CARELLI G; BLOUIN EF; KOCAN, KM. Genetic diversity of *anaplasma* species major

surfaceproteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Research Reviews**, London, v.6, n.1, p.75-89, 2005b.

DE LA FUENTE, J., VICENTE, J., HOFLEA, U., RUIZ-FONS, F., FERNÁNDEZ DE KOCAN, K.M., de la FUENTE, J., GUGLIELMONE, A.A., MELÉNDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clin.Micro.Reviews**, v.16, n.4, p.698-712, 2003.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA, GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen **Anaplasma marginale** to bovine erythrocytes and tick cells International Journal for Parasitology. **Oxford**, v.31, n.2, p. 145-153, 2001b.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA, GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; RODRÍGUEZ, S.D.; GARCIA, M.A.; KOCAN, K.M. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Animal Health Research Reviews**, London, v.2, n.2, p. 163-173, 2001a.

DE LA FUENTE, et al. Genetic diversity of anaplasma species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Research Reviews**, v.6, n.1, p.75-89, 2005.

DE LA FUENTE, J.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; TUMINO, G.; FURLA, R.; ALMAZAN, C.; KOCAN, K.M. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.133, n.4, p. 357-362, 2005a.

De WAAL, D.T. Vaccination agaisnt Babesiosis. **Acta Parasitol. Turcica**. v. 20, p. 487516, 1996.

DIAS, R. O. S. Quimioprofilaxia da babesiose bovina. 2001. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/quimioprofilaxia-da-babesiose-bovina_noticia_16683_61_184_.aspx>. Acesso em: 26 mar.2009.

Diseases associated with protozoa.10th Edn. In: **Veterinary Medicine: A diseases. Vet. Bull.**, v. 38, p. 735-756, 1968.

DREHER, U.M.; DE LA FUENTE, J.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M.L.; PUSTERLA, N. KOCAN, K.M.; WOLDEHIWET, Z.; BRAUN, U.; REGULA, G.; STAERK, K.D.C.; LUTZ, H. Serologic cross-reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. **Clin Diagn. Lab. Immunol**, v.12, n.10, p. 1177-1183, 2005.

DUARTE, K.M.R.; PASCHOAL, J.A.R.; GOMES, L.H. Imunoensaios e Zootecnia: Aplicações Práticas. Boletim de **Indústria Animal**, Nova Odessa, v.63, n.2, p. 121-130, 2006.

DUMLER, J.S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in families Rickettsiaceae and Anasplamataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “EGH agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, n.6, p. 2145-2165, 2001.

EGITO, A.A. Conservação e caracterização de búfalos no Brasil: uma revisão de literatura. **Documentos CENARGEM**, v. 166, p. 01-33, 2006.

ELSIFY, A.; SIVAKUMAR, T.; NAYEL, M.; SALAMA, A.; ELKHTAM, A.; RIZK, M.; MOSAAB, O.; SULTAN, K.; ELSAYED, S.; IGARASHI, I.; YOKOYAMA, N. An

epidemiological survey of bovine Babesia and Theileria parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. **Parasitol.Int**, n.64, p. 79-85, 2015.

ERIKS, I. S.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R.; BARBET, A.F. Detection and qualitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.27, n.2, p. 279-284, 1989.

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**, v.30, n.6, p. 1374-1379, 1992.

FAO. Principales países productores de ganado bufalino. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/AGa/AGAP/WAR/waral/y/v1650b/v16500bOc.htm>, 2000.

FAOSTAT. Acesso em: December de 2010. Disponível em URL: <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573>, 2009.

FERRER, J.M., ÁRRAGA, C.M. and BARBOZA, M. Caracterización hematológica de la especie *Bubalus bubalis* por sexo y edad. **Revista Científica FCV-LUZ**, v.10, p. 508514, 2000.

FERNÁNDEZ, A. H.; ROMERO, O.; MONTIEL, N.; TRUJILLO, H. N.; CAHUAO, N. Determinación de valores de referencia hematológicos en búfalas (*Bubalus bubalis*) preparto y postparto en una unidad de producción en el sur del lago de Maracaíbo, Venezuela. **Revista Científica FCV-LUZ**, v. 15, p.119-124, 2005.

FIGUEIREDO, A. Imunossensores potenciométricos para a detecção da proteína NS1 do vírus da dengue. 2013. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade de São Paulo (USP), São Carlos-SP.

FIGUEIREDO, A.; VIEIRA, N.C.S.; SANTOS, J.F.; JANEGITZ, B.C.; AOKI, S.M.; JUNIOR, P.P.; LOVATO, R.L.; NOGUEIRA, M.L.; ZUCOLOTTO, V. Electrical Detection of Dengue Biomarker Using Egg Yolk Immunoglobulin as the Biological Recognition Element. **Scientific Reports**, v.5, p.1-5, 2015.

FIGUEROA, J.V., CHIEVES, L.P., JOHNSON, G.S., BUENING, G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.*, v.50, p.69-81, 1993. Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. **Vet. Microbiol.** v.100, p.163-173, 2004.

FIGUEROA, J.V.; ALVAREZ, J.A.; CANTO, G.J.; MOSQUEDA, J.J.; BUENING, G.M. Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. **Ann. N.Y. Acad. Science**, v.23, n.791, p.117-27, 1996.

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; BUENING, G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Vet. Parasitol.**, v.50, p.69-81, 1993.

FLORIN-CHRISTENSEN, M., SUAREZ, C.E., RODRIGUEZ, A.E., FLORES, D.A., SCHNITTGER, L. Vaccines against bovine babesioses: where we are now and possible roads ahead. **Parasitology**, p. 1-30, 2014.

FOIL, L.D. Tabanids as vectors of disease agents. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.5, n.3, p. 88-96, 1989.

FONSECA, A.; BRAGA, A. Noções sobre a tristeza parasitária dos bovinos. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, p.216, 1924.

FRANÇA, R.T., LOPES, S.T.A., MARTINS, D.B., COSTA, M.M., LEAL, M.L.R., MAZZANTI, C.M.A., SCHUH, R., DORNELLES, G.L. Valores hematológicos de búfalos em diferentes faixas etárias criados na região central do Rio Grande do Sul.

Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 18, n. 1, p. 51-54, 2011.

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In Babesiosis of Domestic Animals and Man (ed. Ristic, M), **Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc**, p. 23-52, 1988.

FURLONG, J.; EVANS, D. Epidemiologia do carrapato *B. microplus* no Brasil: necessidade de uma abordagem compreensível para seu estudo realístico.

In: SEMINARIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, 7, 1991, São Paulo **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p.48-50, 1991.

FUTSE, J.E.; UETI, M.W.; KNOWLES JR.; D.P.; PALMER, G.H. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. **J.Clin. Microbiol**, v.41, p. 3829-3834, 2003.

GALE, K.R. DIMMOCK, C.M.; GARTSIDE, M.; LEATCH, G. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. *Int. J. Parasitol*, v. 26, p. 1103-1109, 1996.

GIGLIOTI, R. Estudo quantitativo da infecção por *Babesia bovis* em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, p.81, Jaboticabal, 2013.

GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H.N.; SANTANA, C.H.; IBELLI, A.M.G.; NÉO, T.A.; BILHASSI, T.B.; RABELO, M.D.; MACHADO, R.Z.; BRITO, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2016 (no prelo).

GOMES, R.A.;MACHADO, R.Z.; STARKE-BUZETTI, W.A., BONESSO, M.A. Resposta imune humoral de búfalos (*Bubalus bubalis*) contra *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 17, n.2, p. 73-80, 2008.

GONÇAVES-RUIZ, P.M; PASSOS, L.M; PATARROYO, J.H; RIBEIRO, M.F. Antigenic characterization of morphologically distinct *Anaplasma marginale* isolates using a panel of monoclonal antibodies. **Veterinary Parasitology**, v.107, n.1-2, p. 169-177, 2002.

GONZALEZ, J.R.; MELENDEZ, R.D. Seroprevalencia de la Tripanosomosis y Anaplasmosis bovina en el municipio Juan José mora del estado Carabobo, Venezuela, mediante la Técnica de Elisa. **Revista Científica**, Maracaibo, v.17, n.5, p. 449-455, 2007.

GOO, Y.K.; JIA, H.; ABOGE, G.O.; TERKAWI, M.A.; KURIKI, K.; NAKAMURA, C.; KUMAGAI, A.; ZHOU, J.; LEE, E.G.; NISHIKAWA, Y.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; XUAN, X. *Babesia gibsoni*: serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP. **Exp. Parasitol**, v. 118, p. 555-560, 2008.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Vet. Parasitol.**, v. 57, p. 109-119, 1995.

GRAU, H.E.G.; FILHO, N.A.C.; PAPENN, F.G.; FARIAS, N.A.R. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.22, n.2, p. 189-193, 2013.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the Potential Economic Impact of Cattle Parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GRISI, L; MASSARD, C.L; MOYA-BORBA, G.E; PEREIRA, J.B. Impacto econômico GUBBELS, J.M.; DE VOS, A.P.; VAN DER WEIDE, M.; VISERAS, J.; SCHOULS, L.M., DE VRIES, E.; JONGEJAN, F. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. **J. Clin.Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 1782-1789, 1999.

GUERRERO, F.D., BENDELE, K.G., DAVEY, R.B. GEORGE, J.E. Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from outbreaks in South Texas. **Vet. Parasitol.**v.145, p. 156-163, 2007.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., and WATSON, R. "Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions." **Biotechnology**, v.11, p. 26-30, 1993.

HINES, S.A., PALMER, G.H., JASMER, D.P., MCGUIRE, T.C. AND MCELWAIN, T.F. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 55, p.85–94, 1992.

HODGSON, J.L., STILLER, D., DOUGLAS, P.J., BUENING, G.M., WAGNER, G.G., MCGUIRE, C. *Babesia bigemina*: Quantification of infection in nymphal and adult *Boophilus microplus* using DNA probe. **Experimental Parasitology**, v.74, p.117-26, 1992.

HOLFFORD, T.R.; DAVIS, F.; HIGSON, S.P. Recent trends in antibody based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v.4, n.1, p. 12-24, 2011.

JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology.Philadelphia: Lea & Febiger, p. 417, 1993.

JONES, M.L; ALLISON, R.W. Evaluation of the ruminant complete blood cell count.**Veterinary Clinics**, v. 23, p. 377-402, 2007.

JONSSON, N.N & HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.193-198, 2007.

JONSSON, N.N., MILLER, R.J., ROBERTSON, J.L..Critical evaluation of the modified adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates.**Veterinary Parasitology**, v.146, p.307-315, 2007.

KAKOMA, I., MELHORN, H. Babesia of Domestic Animals. In: KREIER, J.P. (Ed).**Parasitic Protozoa**, Academic Press, p.141-216, 1994.

KAKOMA, I., MELHORN, H. Babesia of Domestic Animals. In: KREIER, J.P. (Ed).
KE, G. M; CHENG, H. L.; KE, L. Y.; JI, W. T.; CHULU, J. L.C.; LIAO, M. H. ; CHANG, T. J.; LIU, H. J. Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. **Journal of Virological Methods**, v.133, p.6-13, 2006.

KHAN, M.Q.; ZAHOOR, A.; JAHANGIR, M.; MIRZA, M.A. Prevalence of blood parasites in cattle and buffaloes.Pakistan Vet.J.v.24 (4), p.193-195, 2004. KREIER,J.P. Babesia of domestic animals. **Parasitic Protozoa**.New York, Academic Press, v.4, p. 1-52, 1977.

KREIER, J.P. Babesia of Domestic Animals .**Parasitic Protozoa**. Vol.IV. New York, Academic Press, p.1-52, 1977.

KOCAN K.M., STILLER D., GOFF W.L., CLAYPOOL P.L., EDWARDS W., EWING S.A., MCGUIRE T.C., HAIR J.A., BARRON S.J. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. **Am. J. Vet. Res**, v.53, n.4, p.499-507, 1992.

KOCAN, K.M. Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. In: Sauer, J.R., Hair, J.A. (Eds.), **Morphology, Physiology and Behavioral Ecology of Ticks**. Ellis Horwood Ltd., England, p. 472-505, 1986.

KOCAN K.M., STILLER D., GOFF W.L., CLAYPOOL P.L., EDWARDS W., EWING S.A., MCGUIRE T.C., HAIR J.A. & BARRON S.J. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. **Am. J. Vet. Res.** v.53, n.4, p.499-507, 1992.

KOCAN, K.M., de la FUENTE, J., GUGLIELMONE, A.A., MELÉNDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clin. Micro. Reviews**, v.16, n.4, p.698-712, 2003.

KOCAN, K.M; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; COETZEE, J.F.; EWING, S.A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 167, n. 2-4, p.95-107, 2010.

KOCAN, K.M; de la FUENTE, J; BLOUIN, E.F; GARCIA-GARCIA, J.C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recente advances in defining hostpathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, Oxford, v.129, Supl.1, p. 285-300, 2004.

KOCAN, K.M; de la FUENTE, J; GUGLIELMONE, A.A; MELÉNDEZ, R.D. Antigens and KREIER, J.P. Babesia of domestic animals. Parasitic Protozoa. Vol. IV. New York, **Academic Press**, p. 1-52, 1977.

KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M., (Ed). Babesiosis of domestic animals and man. Florida: CRC-Press, v.1, p.1-15, 1998.

KWOK, S., HIGUCHI, R. Avoiding false positive with PCR. **Nature**, v. 339, p.237-8, 1989.

LIMA, J.D. Premunção: uma alternativa para o controle da tristeza parasitária, São Paulo, SP, 1991. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. São Paulo, 22-26 de setembro, 1991. Anais... São Paulo, p. 39-43, 1991.

LIU, X.; LIN, P.; YAN, X.; KANG, Z.; ZHAO, Y.; LEI, Y.; LI, C.; DU, H.; ZHANG, Y. Enzyme-coated single ZnO nanowire FET biosensor for detection of uric acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 176, n.0, p.22-27, 2013.

LIYANAGUNAWARDENA, N., SIVAKUMAR, T., KOTHALAWALA, H., SILVA, S.S., BATTSETSEG, B., LAN, D.T., INOUE, N., IGARASHI, I. AND YOKOYAMA, N. Typespecific PCR assays for *Babesia bovis* msa-1 genotypes in Asia: Revisiting the genetic diversity in Sri Lanka, Mongolia, and Vietnam. **Infect. Genet.Evol**, v. 37, p.64–69, 2016.

LOUREÇO JÚNIOR, J. de B. Variáveis produtivas, fisiológicas e de comportamento de zebuínos e bubalinos e fatores do ambiente físico em pastagem cultivada da ilha de Marajó. 1998. 127 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pará, Belém – PA, 1998.

LUPPA, P.B.; SOKOLL, L.J.; CHAN, D.W. Immunosensors – principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v.314, p. 1-26, 2001.

MADRUGA C.R., HONER M.R., ANDREOTTI M.R. & ARAÚJO F.R. & SANTARÉM V. Prevalência de *Anaplasma marginale* em três regiões do estado de Paraíba. Anais VI Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa, p. 350-352, 1993.

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

MAHONEY, D.F. *Babesia of domestic animals*. In: KREIER, J.P. **Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press , v. 4, p.1-76, 1977.

MARQUES, D.C. **Criação de bovinos**. 7^o ed. Belo Horizonte:Ed.Consultoria Veterinária e Publicações, p. 586, 2003.

MARQUES, J. R. F. Búfalos: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Embrapa Amazônia Oriental (Belém/PA). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia (Coleção 500 Perguntas,Respostas), p.176, 2000.

MARQUETTE, C.A. and L.J. BLUM, *State of the art and recent advances in immunoanalytical systems*.**Biosensors and Bioelectronics**, v.21, n.8 p. 1424-1433, 2006.

MARTINS, J. R. Carrapato bovino. 2002. Disponível em: < <http://www.carrapatobovino.com/babesioseeanaplasiose.htm>>. Acesso em: 11 dez. 2009.

MARTINS, T.M.; PEDRO, O.C.; CALDEIRA, R.A.; DO ROSÁRIO, V.E.; NEVES, L.; DOMINGOS, A. Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminest host-start PCR method. **Vet. Parasitol**, v.153, p. 225-230, 2008.

MASSARD, C. L.; FREIRE, R. B. Etiologia, manifestações e diagnóstico das babesioses bovinas no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 4, n. 23, p. 53-56, 1985.

MELHORN, H. & SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Adv. Parasitol.**, v.23, p.37-99, 1984.

MERA, I.G., VAN DEN BUSSCHE, R.A., KOCAN K.M. *Anaplasma* infection in freeranging.

MOHAN, R. N. Diseases and parasites of buffaloes. III. Parasitic and miscellaneous diseases. **Vet. Bull.**, v. 38, p. 735-756, 1968.

MOLAD, T.; MAZUZ, M.L.; FLEIDEROVITZ, L.; FISH, L. SAVITSKY, I.; KRIGEL, Y.; LEIBOVITZ, B.; MOLLOY, J.; JONGEJAN, F.; SHKAP, V. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. **Vet. Microbiol**, v. 113, p. 55-62, 2006.

MONIS, P.T.; GIGLIO, S.; KEEGAN, A.R.; ANDREW THOMPSON, R.C. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. **Trends Parasitol.**, v.21, p.340–346, 2005.

MOSQUEDA, J., OLVERA-RAMIREZ, A., AGUILAR-TIPACAMU, G., CANTO, G.J. Current advances in detection and treatment of babesiosis. **Curr. Med. Chem**, v.19, p. 1504– 1518, 2012.

MOSQUEDA, J.; FIGUEROA, J.V.; ALVAREZ, A.; BAUTISTA, R.; FALCON, A.; RAMOS, A.; CANTO, G.; VEJA, C.A. Advances in the development of molecular tools for the control of bovine babesiosis in Mexico. **Parasitologia**, v. 49, n. 1, p. 19-22, 2007.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Vet.Parasitol.**, v.57, p.153-65, 1995.

NAYEL M, EL-DAKHLY KM, ABOULAILA M, ELSIFY A, HASSAN H, IBRAHIM E, SALAMA A, YANAI T. The use of different diagnostic tools for *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle in Menofia, Egypt. **Parasitol Res**, v.111, n.3, p. 1019-1024, 2012.

NOGUEIRA, F. R. C., MASSARD, C. L., BARREIRA, J. D. Tristeza parasitária bovina. Epidemiologia, sinais clínicos, diagnóstico, medidas de controle e profilaxia. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. EMBRAPA – PESAGRO. Circular Técnico, n.12, p. 14, 1991.

OBREGÓN, D., OLIVEIRA, M.C.S., TIZIOTO, P.C., FUNNES, M.E., MARTÍNEZ, S., ROQUE, E., FONSECA, A.H., CORONA, B. Diagnóstico de *Babesia bovis* en búfalos de la region occidental de Cuba a través de un ensayo de PCR. **Rev. Salud Anim.** v.34., n°2, p. 101-108, 2012.

OLIVEIRA JB, MADRUGA CR, SCHENK MA, KESSLER RH, MIGUITA M, ARAUJO FR. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n.3, p.395-400, 2003..

OLIVEIRA A.A., PEDREIRA P.A.S. & ALMEIDA M.F.R.S. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmose no estado de Sergipe. **Arq. Bras. Med. Zootec.** v.44, p. 377-386, 1992.

OLIVEIRA, A. L. Aproveitamento industrial de búfalos. In: SAMARA, S. I.; DUTRA, I. S.; FRANCESCHINI, P. H.; MOLERO FILHO, J. R.; CHACUR, M. G. M. (Ed.) **Sanidade e produtividade em búfalos**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p.185-202, 1993

OLIVEIRA, M.C.S., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; REGITANO, L.C.A.; ALENCAR, M.M.; NÉO, T.A.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA, H.N. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. **Vet. Parasitol.**, v.155, p. 281-286, 2008.

OLIVEIRA, M.C.S., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., ARAUJO JR, J.P., AMARANTE, A.F.T., OLIVEIRA, H.N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged female and eggs in São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 130, p. 61-67, 2005.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., OLIVEIRA, M.C.S., ARAUJO JR, J.P., AMARANTE, A.F.T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **Int. J. Parasitol.**, v.35, p.105-111, 2005.

Oswaldo Cruz, v. 98, n.3, p.395-400, 2003.

PALMER, G.H. Anaplasma vaccines. In: Wright, I.G. (Ed.), **Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines**, p. 1-29, 1989.

PANTEGHINI, M., The new definition of myocardial infarction and the impact of troponin determination on clinical practice. **International Journal of Cardiology**, v.106, p. 298306, 2006.

PFAFFL M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nuclear Acids Research.**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

POTGIETER, F.T.; VANRENSBURG, L. The persistence of colostral *Anaplasma marginale* antibodies and incidence of in útero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, Durbanville, v.54, n.54, p. 557-560, 1987..

PROCESSO DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-VIRUS DA FEBRE AFTOSA UTILIZANDO MEDIDAS ELÉTRICAS E KIT DE DETECÇÃO BASEADO NESSE MÉTODO. **Autores:** Prof. Dr. Bonald Figueiredo, Dra. Yvone Maria Mascarenhas, Dr. Paulo Roberto Mascarenhas, MSc. Gustavo Frigieri, Sr. Níbio José Mangerona, Dr Nirton Cristi Silva Vieira, Sr. Fabrício Aparecido dos Santos, Valtencir Zucolotto. (PATENTE-Depósito **BR 10 2013 006812-8**).

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. Diseases associated with protozoa. 10th Edn. In: **Veterinary Medicine: A Textbook of Diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. SaundersElsevier; p. 1483-1540, 2008.

RAJPUT, Z.I.; SONG HUA, H.; ARIJO, A.G.; HABIB, M.; KHLID, M. Comparative study of Anaplasma parasites in ticks carrying buffaloes and cattle. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6B, 11, p. 1057-1062, 2005.

RATHAKRISHNAN, A. AND S.D. SEKARAN. New development in the diagnosis of dengue infections. **Expert Opinion on Medical Diagnostics**, v.7, n.1, p. 99-112, 2013.

RIBEIRO, M. F. B. ; LIMA, J. D. ; GUIMARAES, A. M. ; SCATAMBURLO, M. A. ; RISTIC, M. Bovine anaplasmosis. In: KREIER, J.P. (Ed.). Parasitic protozoa. London: Academic, p.235-249, 1988.

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M.; SCATAMBURLO, M. A.; MARTINS, N. E. Transmissão congênita da anaplasmosse bovina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 47, n. 3, p. 297-304, 1995.

ROWE, A.A., et al., CheapStat: An open-source, “do-it-yourself” potentiostat for analytical and educational applications. **PloS one**, v.6, n.9, p. 23783, 2011.

S.A., MCGUIRE T.C., HAIR J.A. & BARRON S.J. Development of *Anaplasma*

SACCO A.M.S. Controle de surtos de tristeza parasitária bovina. Circular Técnica 26, Embrapa Pecuária Sul, Bagé, p. 4, 2002.

SALAS, R.D.; MIRA, A.; MOSQUEDA, J.; VÁZQUEZ, G.Z.; RUIZ, M.H.; VELA, N.A.O.; LEÓN, A.A.P.; CHRISTENSEN, M.F.; SCHNITTGER, L. Molecular and serological detection of *Babesia bovis*- and *Babesia bigemina*-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. **Veterinary Parasitology**, v.217, p. 101-107, 2016.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.R.; MANIATIS, T. Commonly used techniques in molecular cloning. In: Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SAMISH M., PIPANO E. & HADANI A. Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus* ticks in cattle. **Am. J. Vet. Res**, v.54, n.3, p. 411-414, 1993.

SANTAROSA, B.P.; DANTAS, G.N.; FERREIRA, D.O.L.; ROCHA, N.S.; GONÇALVES, R.C.; AMORIM, R.M.; CHIACCHIO, S.B. Infecção neurológica por *Babesia bovis* em bovino neonato – relato de caso. **Vet. Zootec**, v.20, p.447-452, 2013.

SARAJU, P.M.; KOUGIANOS, E. Biosensors: A tutorial review, p.35-40, 2006. SAS, Institute Inc., SAS/STAT. User's Guide, version 6.11, 4ed., v.2, Cary, **SAS Institute Inc.**, p.842, 1996.

SAUT, J. P. E. ; JUNIOR BIRGEL, E. H. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 588- 597, 2006.

SCOLES, G.A., MILLER, J.A., FOIL, L.D. Comparison of the efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae) with mechanical transmission by the horse fly *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Muscidae). **J.Med. Entomol**, v.45, p. 109-114, 2008.

SHARMA, S. P. Characterization of *Anaplasma marginale* infection in buffaloes. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 57, n. 2, p. 76-78, 1987.

SILVA, J.B.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in state of São Paulo, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, p. 20-25, 2016.

SILVA, J.B.; CORDEIRO, M.D.; CASTRO, G.N.S.; SANTOS, P.N.; DA FONSECA, A.H.; REIS, A.B.; SILVA, N.S. BARBOSA, J.D. Ocorrência sorológica de *Babesia bovis*,

Babesia bigemina e *Anaplasma marginale* em bovinos e bubalinos no estado do Pará, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.35, n. 5, p.2495-2500, 2014.

SILVA, J.B.; LOPES, C.T.A.; PINHEIRO, C.P.; SILVA, R.S.L.; FONSECA, A.H.; ARAÚJO, F.R.; BARBOSA-NETO, J.D. Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.33, n.7, p.847-850, 2013b.

SILVA, J.B.; MENDES, A.; FONSECA, A.H.; LOPES, C.T.A.; LIMA, D.H.S.; ANDRADE, S.J.T.; OLIVEIRA, C.M.C.; BARBOSA, J.D. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the north region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.197, n.1, p.678-681, 2013a.

SIVAKUMAR, T.; OKUBO, K.; IGARASHI, I.; DE SILVA, W.K.; KOTHALAWALA, H.; SILVA, S.S.P.; VIMALKUMAR, S.C.; MEEWEWA, A.S.; YOKOYAMA, N. Genetic diversity of merozoite surface antigens in *Babesia bovis* detected from Sri Lankan cattle. **Infect. Genet. Evol.**, v.19, p.134-140, 2013b.

SMITH, R.D.; LEVY, M.G.; KUHLENSCHMIDT, M.S.; ADAMS, J.H.; RZECHULA, D.L.; HARDT, T.A.; KOCAN, K.M. Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. **American journal of veterinary research**, Chicago, v.47, n.1, p. 127-129, 1986.

SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigation into the nature causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. Washington: USDA, p.301, 1893.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C. R.; CUNHA, N. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 2630, 2000b.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 2630, 2000b.

SPICHIGER-KELLER, U.E. **Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications**. Weinheim: Wiley – VCH Verlag GmbH, 1998.

STARCOVICH, C. Bemerkungen über den durch *Bebês* entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte hamoglobinurie des Rinds (*Bebês*), das Texasfieber (Th. Smith) und Carceag der Schafe (*Bebês*). Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektions Krankheiten Hygiene, Jena, Abt. I: v. 14, p. 1-8. 1893.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Fundamentos de patologia clínica veterinária, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 316-323, 2011.

TATTIYAPONG, M., SIVAKUMAR, T., YBANEZ, A.P., YBANEZ, R. H., PEREZ, Z. O., GUSWANTO, A., IGARASHI, I. AND YOKOYAMA, N. Diversity of *Babesia bovis* merozoite surface antigen genes in the Philippines. **Parasitol. Int**, v. 63, p. 57-63, 2014.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. Parasitologia veterinária. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 742, 2010.

TELES, F.; FONSECA, L. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v.77, n.2, p.606-623, 2008.

Texas Experiment Station in immunizing Northern breeding cattle against Texas Fever
Textbook of Diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Saunders

THEILER, A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.): A protozoon of cattle, a cause of the called gall-sickness. **The Transvaal Medicine Journal**, Pretória, v.5, n.1, p. 110-111, 1910.

THEILER, A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. In: First Report of the Director of Veterinary Research, Department of Agriculture of the Union of South Africa, p. 7-46, 1911.

UILENBERG, G. Babesia: a historical overview. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 138, n.1/2, p.3-10, 2006.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology Research**, v.3, n. 7, 2002.

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

VIEIRA, N.C.S.; FIGUEIREDO, A.; DE QUEIROZ, A.A.A.; ZUCOLOTTI, V.; GUIMARÃES, F.E.G. Self-assembled films of dendrimers and metallophthalocyanines as fet-based glucose biosensors. **Sensors**, v.11, n.10, p. 9442-9449, 2011.

WAGNER, G., CRUZ, D., HOLMAN, P., WAGHELA, S., PERRONE, J., SHOMPOLE, S., RURANGIRWA, R. Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, supl. III, p.193-199, 1992.

WATTAL, C. and S. DATTA, Dengue NS1 antigen detection: A useful tool in early diagnosis of dengue virus infection. v. 28, p.107-110, 2010.

WILSON, G.S.; THÉVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v.16, n.1, p. 121-131, 2001.

XU, Q. AND J.J. DAVIS. The Diagnostic Utility of Electrochemical Impedance. **Electroanalysis**, v. 26, n.6, p. 1249-1258, 2014.

YANG, J.; WANG, X.; SHI, H. An electrochemical DNA biosensor for highly sensitive detection of phosphinothricin acetyltransferase gene sequence based on polyaniline – (mesoporous nanozirconia)/ poly-tyrosine film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.162, n.1, p. 178-183, 2012.

ZAUGG J.L & KUTTLER K.L. Bovine anaplasmosis: *in utero* transmission and the immunologic significance of ingested colostrum antibodies. **Am. J. Vet. Res**, v.45, n.3, p. 440-443, 1984.

ZHANG, G.-J.; HUANG, M.J.; LUO, Z.H.H.; TAY, G.K.I.; LIM, E.-J.A.; LIU, E.T.; THOMSEN, J. S. Highly sensitive and reversible silicon nanowire biosensor to study nuclear hormone receptor protein and response element DNA interactions. **Biosensors and Bioelectronics**, v.26, n.2, p. 365-370, 2010.

ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications. New York: Academic Press, 2008.