



**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Danillo Henrique da Silva Lima**

**Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos  
(*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará**

**Belém**  
**2014**

**Danillo Henrique da Silva Lima**

**Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto.

**Belém  
2014**

**Danillo Henrique da Silva Lima**

**Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos  
(*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Belém – PA

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. José Diomedes Barbosa  
UFPA

---

Prof. Dr. Carlos Maria Antônio Hubinger Tokarnia  
UFRRJ

---

Prof. Dr. Marilene de Farias Brito Queiroz  
UFRRJ

Aos meus queridos pais Evandro e Elizete.  
E aos meus irmãos Murillo, Brenno, Bruno e Breno Nazário.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir a conclusão desta importante etapa de minha vida.

À Universidade Federal do Pará.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal que contribuíram para o meu crescimento profissional.

Ao Laboratório de Biologia Molecular Animal da Embrapa Gado de Corte por viabilizar a realização das análises moleculares.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por permitir o processamento dos exames sorológicos. E nesta instituição, dois nomes devem ser mencionados devido a importância para a realização deste trabalho, professor Dr. Adivaldo Henrique e o mestre Jenevaldo Barbosa.

Ao meu orientador, José Diomedes Barbosa Neto, pelo conhecimento passado durante todo o período de convivência, pelo exemplo de dedicação e perseverança e, acima de tudo, pelas oportunidades de crescimento profissional.

Ao professor, Carlos Magno Chaves Oliveira, pela oportunidade de aprendizagem prática de diversas atividades as quais contribuíram de maneira importante para minha formação profissional.

Ao professor, Marcos Dutra Duarte pela sabedoria e forma com que repassa seus conhecimentos, com paciência e dedicação.

Sou eternamente grato pelo apoio e incentivo para os estudos dado por meus pais, Evandro e Elizete, e por todos os esforços realizados para que pudesse chegar aonde cheguei.

Aos meus irmãos, Murillo Augusto e Brenno Matheus que sempre estiveram ao meu lado apesar da distância física. E aos meus primo-irmãos caçulas, Breno Nazário e Bruno Nazário, os quais sempre me proporcionaram muitos momentos de alegria quando estava em casa.

A minha querida namorada, Carla Tavares, que com sua compreensão, dedicação e carinho me ajudou em muitos momentos.

A Natália Silva, pelas suas importantes orientações e correções sempre com o objetivo de melhorar o trabalho.

A Cinthia Távora pela amizade e pelos sábios e importantes conselhos transmitidos.

A todas as pessoas da Clínica de Grandes Animais que ajudaram de maneira direta ou indiretamente na realização deste trabalho: Henrique, Nayra, Francisberto, André Gibson, Luiz Henrique, Marcel, Alessandra, Alcides, Taty.

Ao meu tio Júlio César que sempre serviu de inspiração para prosseguir nos estudos e por toda ajuda conferida na vida acadêmica.

Aos grandes amigos Geovani, Jéssica e Augusto, pelo período de convivência muito agradável e pelas ajudas oferecidas nos momentos mais difíceis.

Aos amigos Raimundo Júnior, Marcelo Vinhote e Luiz Ronaif pela parceria conferida tanto nos períodos de trabalho como nos momentos de descontração.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar a prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos da Ilha de Marajó, estado do Pará, Brasil. Foi utilizado o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática indireto (ELISAI) com antígeno total contendo proteínas de superfície externa e a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (PCRq), envolvendo o uso de SYBR Green com base na amplificação de um pequeno fragmento de gene do citocromo b. A prevalência de animais positivos no ELISAI para *B. bovis*, *B. bigemina* e para infecção mista foi de 24.87% (199/800), 20.75% (166/800) e 18.75% (150/800), respectivamente. Na PCRq foi detectado a presença de *B. bovis* em 15% (18/199) e de *B. bigemina* em 16% (19/199) dos animais, sendo que destes, 58% (11/19) apresentavam-se co-infectados pelos dois agentes. Os resultados mostram uma baixa prevalência de anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em búfalos da Ilha do Marajó. Porém, observou-se que os agentes da babesiose bovina circulam em búfalos, podendo atuar como reservatório.

**Palavras-chave:** Babesia. Búfalos. ELISAI. PCRq. Pará.

## ABSTRACT

The aim of the study was to estimate the prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes of the Marajó Island, State of Pará, Brazil. We used an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA), with total antigen containing proteins outer surface, and polymerase chain reaction (qPCR), involving the use of SYBR Green based on amplification of a small fragment of the cytochrome b gene. The prevalence of positive animals in iELISA to *B. bovis*, *B. bigemina* and mixed infection was 24.87% (199/800), 20.75% (166/800) and 18.75% (150/800), respectively. Using the PCR, the presence of *B. bovis* was detected in 15% (18/199) and *B. bigemina* in 16% (19/199) of animals, and of these, 58% (11/19) presented co-infected by the two agents. The results show a low prevalence of antibodies anti-*B. bovis* and anti-*B. bigemina* in water buffaloes from Marajó Island. However, it was observed that the agents of bovine babesiosis circulate in buffaloes, and these may act as reservoirs.

**Keywords:** Babesia. Buffaloes. ELISA. PCR. Pará.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
3.2 BABESIOSES BOVINA E BUBALINA .....	13
3.2.1 Etiologia .....	13
3.2.2 Epidemiologia .....	13
3.2.3 Ciclo evolutivo .....	14
3.2.4 Sinais clínicos .....	16
3.2.5 Patologia .....	18
3.2.6 Diagnóstico .....	18
3.2.7 Controle e profilaxia .....	20
<b>4 PREVALÊNCIA SOROLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Babesia bovis</i> E <i>Babesia bigemina</i> EM BÚFALOS (<i>Bubalus bubalis</i>) NA ILHA DE MARAJÓ, PARÁ</b> .....	21
4.1 INTRODUÇÃO .....	23
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.3 RESULTADOS .....	26
4.4 DISCUSSÃO .....	28
4.5 CONCLUSÃO GERAL .....	30
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho bubalino de 1.261.922 cabeças, das quais a grande maioria está concentrada na região Norte, com 808 mil animais que representam 64% do rebanho nacional. Nessa região, o estado do Pará possui o maior rebanho bubalino, com aproximadamente 454 mil animais que representam 36% do efetivo nacional, os quais se concentram em maior quantidade na Ilha de Marajó (IBGE, 2012).

A Ilha de Marajó é a maior ilha flúvio-marítima do mundo com 49.606 km<sup>2</sup>, sendo maior do que os estados do Rio de Janeiro, Alagoas, Sergipe e Espírito Santo. Os municípios de Chaves e Soure, localizados na Ilha de Marajó, estão entre os três municípios que detêm os maiores efetivos de bubalinos do Brasil (IBGE, 2012). Entretanto, nestas regiões, os animais são criados, sobretudo, em regime extensivo, em solos distróficos, com pastagens de baixa qualidade nutricional e suplementação mineral precária (PINHEIRO et al., 2011).

A produção e o consumo de leite de búfalas vêm crescendo em função da demanda por alimentos como queijos e manteiga. Os elevados teores de gordura e sólidos totais no leite de búfala aumentam o rendimento na fabricação dos derivados em relação ao leite de vaca. Além disso, a carne desses animais também é apreciada, pois, contêm menores índices de gordura, colesterol, calorias e mais proteína e minerais que a dos bovinos (BRASIL, 2011).

Os búfalos são conhecidos por apresentarem grande resistência ao desenvolvimento de doenças comuns aos bovinos. No entanto, o hábito de permanecerem aglomerados por longos períodos favorece as infecções parasitárias, que somadas ao manejo nutricional precário e ao confinamento com alta taxa de lotação, podem levar os bubalinos a apresentarem sinais clínicos de muitas doenças (COCKRILL, 1981; LAÚ, 1999).

Por serem animais considerados resistentes às enfermidades de maneira geral, muitas vezes, os búfalos encontram-se infectados, mas sem manifestarem sinais clínicos evidentes. Dessa forma, eles podem ser considerados reservatórios das enfermidades e potencialmente uma fonte de infecção para rebanhos susceptíveis. No entanto, informações sobre as infecções de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*, ao longo da vida útil dos búfalos, são pouco conhecidas, principalmente sobre a manifestação clínica da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) e a resposta imune humoral aos agentes (GOMES, 2007).

Além disso, muitos aspectos das doenças de búfalos não são conhecidos e, comumente, os procedimentos adotados para diagnóstico, tratamento e controle das

enfermidades em bubalinos são baseados nas práticas seguidas para bovinos (MATHIAS et al., 1998).

Com base nisso, a realização deste trabalho foi motivada pela importância da bubalinocultura no estado do Pará, principalmente para a Ilha de Marajó, pela escassez de informações sobre babesiose em búfalos no país e para verificar a situação sanitária sorológica e molecular dos búfalos em relação aos agentes da babesiose.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos do município de Soure, localizado na Ilha de Marajó, estado do Pará.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o percentual de prevalência de *B. bovis* e *B. bigemina*;
- Verificar a prevalência sorológica através de ELISA indireto para *B. bovis* e *B. bigemina*;
- Verificar a prevalência molecular através de PCR quantitativo para *B. bovis* e *B. bigemina*;
- Determinar a concordância entre os testes ELISA indireto e PCR quantitativo.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.2 BABESIOSES BOVINA E BUBALINA

##### 3.2.1 Etiologia

As babesioses bovina, causadas por *Babesia bovis* e *B. bigemina*, são doenças de grande impacto econômico em todo o mundo. A infecção concomitante destes dois microrganismos, juntamente com a rickettsia *Anaplasma marginale*, é responsável pela enfermidade conhecida como Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (GRISI et al., 2002).

O gênero *Babesia* é classificado taxonomicamente no filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida, família Babesiidae e compreende protozoários intraeritrocíticos caracterizados pela presença de um complexo apical e um citoesqueleto único, distinto de outros eucariotos (BÖSE et al., 1995; GORDON; SIBLEY, 2005).

Nove espécies de *Babesia* já foram descritas como responsáveis por causar infecção em bovinos e/ou bubalinos. Contudo, *B. bigemina* e *B. bovis* são as espécies mais importantes em muitos países tropicais e subtropicais (CALLOW, 1984; SOUZA et al., 2000; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005).

*Babesia bigemina* se caracteriza pela sua distribuição mais uniforme na circulação sanguínea quando comparado com *B. bovis*. Esta espécie tem tamanho de 5-6 µm e é mais longa do que o raio do eritrócito (grande babésia). Sua principal morfologia observada é a forma bigeminada, constituída de elementos piriformes. Por outro lado, *B. bovis* encontra-se preferencialmente na circulação sanguínea capilar, apresenta até 3µm e ocupa menos de um quarto do eritrócito (pequena babésia). Sua morfologia varia, assim como para *B. bigemina*. (IICA, 1987; BARREIRA et al., 2005; CHAUVIN et al., 2009).

##### 3.2.2 Epidemiologia

Diferentes espécies do gênero *Babesia* podem infectar vários hospedeiros, como ruminantes domésticos e selvagens, canídeos, felídeos e roedores, por meio de vetores biológicos e mecânicos (DE LA FUENTE et al. 2005).

A babesiose bovina no país é mais frequentemente encontrada em bezerros. Um estudo da doença, no Mato Grosso do Sul, demonstrou sua presença em bezerros com idade inferior a quatro meses. Situação devido à queda da imunidade passiva a partir do 28º dia após o nascimento (MADRUGA et al., 1984; MADRUGA et al., 1986).

Devido ao fato de búfalos, muitas vezes, serem criados em conjunto com bovinos, entre os quais a babesiose bovina é altamente prevalente, eles podem ser reservatórios em potencial para parasitas do gênero *Babesia* (ISEKI et al., 2010).

A situação epidemiológica das regiões está relacionada às condições climáticas, que afetam diretamente o ciclo do carrapato vetor *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Uma área geográfica pode se encontrar em três situações distintas em função do vetor, que no Brasil ocorre da seguinte forma (GONÇALVES, 2000; OLIVEIRA; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2004; FARIAS, 2007):

a) Áreas livres: onde não ocorre infestação dos bovinos por carrapatos e, conseqüentemente, não são inoculados os agentes da TPB. É o caso do extremo sul do Rio Grande do Sul.

b) Áreas de instabilidade enzoótica: regiões com condições climáticas que determinam períodos mais ou menos longos sem a infestação por carrapatos, não havendo um equilíbrio entre infecção, imunidade e doença. Praticamente todo o estado do Rio Grande do Sul tem essa característica e parte do sertão nordestino devido à seca.

c) Áreas de estabilidade enzoótica: onde o clima permite que os animais sejam infestados pelo carrapato durante o ano inteiro, sustentando os níveis de anticorpos contra os agentes em níveis elevados. As demais regiões do país encontram-se nessa situação de estabilidade.

De uma forma geral, uma região é considerada em estabilidade enzoótica quando 75% dos animais com idade acima de nove meses são portadores de hemoparasitas. Para isto, uma população de carrapatos controlada em níveis economicamente viáveis é desejável para que essa estabilidade seja mantida (GONÇALVES, 2000).

Além da presença do carrapato, outro aspecto relevante para a epidemiologia da babesiose é a sua relação inversa com idade do animal (DOMINGUEZ et al., 2004). Os bovinos jovens são mais resistentes ao desenvolvimento de babesiose grave devido à presença de anticorpos colostrais, rápida resposta da imunidade celular e maior eritropoiese da medula óssea. Sendo assim, a primoinfecção precoce é importante pela menor susceptibilidade dos animais jovens que apresentam quadros clínicos menos severos (BROWN et al., 2006).

### 3.2.3 Ciclo evolutivo

O carrapato ao se alimentar do sangue do hospedeiro parasitado, ingere os trofozoítas e/ou merozoítas que se diferenciam em isogametas na luz intestinal, realizam a reprodução sexuada ou gametogonia que vai dar origem a um zigoto móvel chamado oocineto. Este

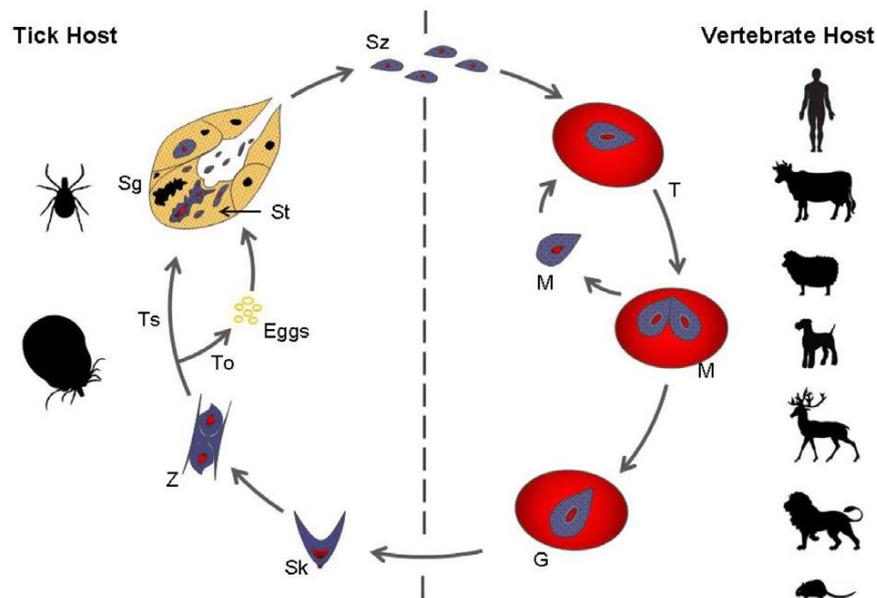
penetra nas células intestinais do carrapato e se multiplicam por divisão binária múltipla ou merogonia até as células se romperem e liberarem os merozoítas ou vermículos (organismos claviformes, móveis e alongados). Esses vermículos são capazes de migrar, através da hemolinfa, e invadir vários órgãos do carrapato, entre eles ovários e oócitos formados. Desta forma, caracteriza-se a transmissão transovariana por infecção da progênie (UILENBERG, 2006).

Na progênie, ocorre esporogonia nos enterócitos das larvas em desenvolvimento e posterior dispersão de esporocinetos na hemolinfa, os quais atingem a glândula salivar e dão origem aos esporozoítos. Para *B. bovis*, os esporozoítos podem ser encontrados nas glândulas salivares das larvas a partir do segundo dia da alimentação e não persistem após o estágio larval. Diferentemente, para *B. bigemina*, os esporozoítos são encontrados apenas após o oitavo dia de fixação, quando os carrapatos já se encontram na fase de ninfa, e permanecem até o estágio adulto, o que caracteriza a transmissão transestadial. Portanto, *B. bovis* é transmitida exclusivamente por larvas em apenas poucos dias após a fixação no hospedeiro, ao contrário de *B. bigemina* que é transmitida por ninfas e adultos (DALGLIESH; STEWART, 1983; HODGSON, 1992; FRASER et al., 1996; BOCK et al., 2004).

A transmissão de *Babesia* sp. para o hospedeiro vertebrado ocorre quando o carrapato vetor se fixa e inocula a saliva infectada. Os esporozoítos (forma infectante) entram na corrente circulatória e penetram nas hemácias, onde se desenvolvem em trofozoítos. Durante o desenvolvimento destes, a hemácia acaba por se romper, liberando-os para infectar outras hemácias. Esta etapa torna-se um círculo vicioso a partir do momento em que os merozoítos são capazes de penetrar nas hemácias, desenvolverem-se e lisarem-nas, sem a necessidade de passar novamente pelo vetor. Alguns merozoítos podem se desenvolver em gametócitos dentro da hemácia e serem ingeridos pelo carrapato, fechando o ciclo (UILENBERG, 2006).

Uma representação esquemática do ciclo biológico de *Babesia* spp. (Figura 1) foi descrita por Mehlhorn e Schei (1984 apud SCHNITTGER et al. 2012).

Figura 1- Ciclo de vida genérico de *Babesia* spp.



Fonte - Mehlhorn e Schei (1984 apud SCHNITTGER et al. 2012). **Sz** (esporozoítas de *Babesia* spp.); **T** (trofozoítas); **M** (merozoítas); **G** (gametócitos); **Sk** (Strahlenkörper – corpo ciliar); **Z** (zigoto); **Ts** (transmissão transtetadial); **To** (transmissão transovariana); **Sg** (glândulas salivares).

Relatos sobre transmissão transplacentária de *B. bovis* em bovinos não é muito frequente, porém já foram descritos na literatura, bem como a ocorrência de abortos (BARBOSA et al., 1994; BRACARENSE et al., 2001; OSAKI et al., 2002).

### 3.2.4 Sinais clínicos

O período de incubação de *Babesia* sp. varia de 5 a 14 dias. Nos bovinos, os sinais clínicos, quando aparecem, são inicialmente devido à lise dos eritrócitos que levam à anemia, icterícia, hemoglobinúria, incoordenação motora, hipertermia, depressão, dispneia e taquicardia (WRIGHT et al., 1989; KUTTLER, 1998).

O animal fica indócil, procura permanecer deitado à sombra, pode apresentar dorso arqueado e pelos arrepiados. Inicialmente as mucosas ficam avermelhadas tornando-se pálidas com a progressão da anemia (HOWARD et al., 2001).

A babesiose causada por *B. bovis* é mais severa e difícil de controlar do que a causada por *B. bigemina*. Alguns animais infectados por *B. bovis* podem apresentar sinais neurológicos como agressividade ou depressão, prostração, febre, convulsões, incoordenação, opistótono, coma e morte. Os sinais clínicos são causados pela retenção de eritrócitos

parasitados por *B. bovis* nos capilares da substância cinzenta do encéfalo, o que caracteriza o quadro de babesiose cerebral (CALLOW, 1984; SMITH, 1993; PATARROYO et al., 1982; KESSLER et al., 1983; RODRIGUES et al., 2005; SOARES et al., 2000).

A anemia é o principal fator causador de fraqueza e perda da condição corporal. Cerca de 75% dos eritrócitos podem ser destruídos em poucos dias. Esse quadro crítico regride em média em uma semana, e, se o animal sobreviver, ele pode apresentar perda de peso, abortamento, queda na produção de leite e uma convalescência prolongada (HOWARD et al., 2001).

Na Índia, os búfalos, em condições naturais, são raramente acometidos pela forma clínica da babesiose e acredita-se que sejam refratários a essa infecção por causa da resistência imunológica natural (ROYCHOUDHURY; GAUTAM, 1979). Entretanto, Muraleedharan et al. (1984) observaram ocorrências de *B. bigemina* em rebanho bubalino indiano, causando manifestações clínicas como anemia, hipertermia, com ou sem hemoglobinúria, que ocorriam entre duas e três semanas após a infestação pelo vetor. Já a doença causada por *B. bovis* não era frequentemente diagnosticada.

Casos clínicos de babesiose foram comumente relatados em bubalinos na China, nos quais os autores alertam que podem ser fatais (LIU et al, 1997; YAO et al., 1997).

Na Tailândia, Terkawi et al. (2011) ao estudarem a prevalência de *Babesia* sp. em bubalinos de diferentes províncias da região nordeste do país, não observaram animais com sinais clínicos de babesiose.

Na Argentina, a ocorrência de *B.bovis* foi relatada por Ferreri et al. (2008), que observaram 34% dos bubalinos parasitados, sem que houvesse nenhum caso de doença clínica.

No Brasil, são raras as informações na literatura com relação à ocorrência de sinais clínicos de babesiose em bubalinos. Franzolin Neto et al. (1989) observaram a campo, que bezerros bubalinos de três a seis meses de idade podiam apresentar sinais clínicos de babesiose. E, segundo Láu (1999), os búfalos com babesiose, no estado do Pará, podem apresentar sinais clínicos como prostração, anorexia, emagrecimento, taquicardia e taquipneia. Além disso, as fêmeas prenhes tendem a abortar, e os animais parasitados procuram se afastar do rebanho.

### 3.2.5 Patologia

Em casos de babesiose causada por *B. bigemina* em bovinos, os achados mais evidentes são emaciação, icterícia, palidez dos tecidos, bem como sangue ralo e aquoso. Edema pulmonar ou subcutâneo também pode ser observado. O fígado pode estar muito pálido devido à anemia ou alaranjado devido à icterícia. A bexiga pode ficar distendida e conter urina vermelho-escura. Os rins têm coloração de vermelho a marrom escuro, congestão acentuada, às vezes com edema perirrenal, devido à nefrose hemoglobinúrica. A hepatomegalia e esplenomegalia também podem ser observadas (RADOSTITIS et al., 2002; FARIAS, 2007).

Segundo Láu (1999), os achados de necropsia em bubalinos consistem em vesícula biliar distendida, com bile verde escura e espessa, o baço friável e sensivelmente hipertrofiado, com o sangue fino e aquoso.

Em casos de babesiose cerebral, macroscopicamente pode ser observada severa congestão do córtex cerebral, hemorragias pericárdicas, esplenomegalia, icterícia e fígado amarelado ou alaranjado (RIET-CORREA et al., 2002).

À histopatologia podem ocorrer graus variáveis de nefrose hemoglobinúrica na babesiose causada por *B. bigemina*. Alguns túbulos renais encontram-se cheios de cilindros de hemoglobina e as lesões microscópicas refletem a ocorrência de severa hemólise. O fígado apresenta sinusoides dilatados e congestos, degeneração dos hepatócitos e severa colestase. Em casos de babesiose causada por *B. bovis*, podem ser observados edema perivascular, capilares cerebrais congestos e com hemácias parasitadas (HOWARD et al., 2001).

### 3.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da babesiose tem sido feito por identificação dos parasitos em esfregaço sanguíneo. Porém, apesar de rápido e barato, este teste não apresenta alta sensibilidade e é indicado apenas para animais com doença clínica, por gerar resultados inconsistentes quando empregado em animais com infecção subclínica ou crônica (TERKAWI et al., 2011). A partir da década de 1990, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem apresentado maior sensibilidade e especificidade do que o diagnóstico por microscopia óptica (FAHRIMAL et al. 1992, FIGUEROA et al. 1993).

Além dos testes moleculares, os testes sorológicos como o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), têm mostrado alta capacidade de detectar anticorpos em animais cronicamente infectados, sendo cada vez mais

frequente a utilização destes em estudos de levantamentos epidemiológicos tanto em bovinos quanto em bubalinos (ARAÚJO et al. 1998; TERKAWI et al. 2011; CORRÊA, 2011; BRITO et al., 2013).

Contudo, devido à automatização, à capacidade de testar muitas amostras ao mesmo tempo e à menor subjetividade, atualmente o ELISA tem sido cada vez mais empregado no diagnóstico da babesiose bovina (FERRERI et al., 2008; GUEDES JR et al., 2008; FRANQUE, 2010), embora a RIFI ainda seja mundialmente executada (SINGH et al., 2007; BERTO et al., 2008).

Assim, a associação entre estudos moleculares e sorológicos tem mostrado ser uma poderosa ferramenta para levantamentos epidemiológicos, sobretudo em agentes que se apresentam em baixa prevalência (GOO et al. 2008, TERKAWI et al. 2011).

Testes sorológicos são importantes ferramentas para a determinação da condição epidemiológica de uma região e indicam a necessidade ou não de adoção de estratégias de controle que possam minimizar os efeitos da enfermidade (MADRUGA et al., 2001).

São poucos os estudos sorológicos sobre *B. bigemina* e *B. bovis* em bubalinos e a maioria dos trabalhos utilizam a RIFI como teste diagnóstico. Assim, a análise de uma população de 100 bubalinos da Índia revelou uma frequência de 21% de positivos para *B. bigemina* (SINGH et al., 2007).

Em uma investigação epidemiológica de *B. bovis* e *B. bigemina* em bubalinos na região nordeste da Tailândia, verificou-se uma prevalência geral de 14,7% e 5,9% por ELISA, e 16,8% e 5,6% pela RIFI, respectivamente (TERKAWI et al., 2011).

Um estudo realizado na Argentina, utilizou-se ELISA competitivo para mensurar anticorpos específicos para o antígeno de superfície MAS-2c de *B. bovis* com ajuda de anticorpos monoclonais. O teste revelou 20% dos animais positivos de uma população de 103 búfalos (FERRERI et al., 2008).

No Brasil, Costa et al. (1997) acompanharam durante um ano 20 bezerros no estado de São Paulo e observaram 15% de soropositivos para *Babesia sp.* Posteriormente, Gomes (2007) utilizou ELISA indireto com antígeno bruto para avaliar a resposta imune de bezerros e suas mães aos agentes da TPB, e concluiu que os búfalos da região de Selvíria, no estado de Mato Grosso do Sul, são portadores resistentes dos agentes da babesiose e anaplasiose. Corrêa (2011) pesquisou a soroprevalência de diferentes hemoparasitas de búfalos no Rio de Janeiro e verificou soropositividade de 51,3% para *B. bovis* e 45,9% para *B. bigemina*.

Recentemente, Lopes et al. (2013) realizaram um levantamento sorológico para *B. bovis* em bubalinos criados na Ilha de Marajó, estado do Pará e verificaram soropositividade de 24% no ELISA e 22% para RIFI.

São raros os trabalhos existentes na literatura com aplicação da técnica de PCR no diagnóstico das babesioses em bubalinos. Terkawi et al. (2011), avaliaram 305 amostras de sangue de búfalos que foram coletadas aleatoriamente de cinco províncias da Tailândia e analisadas por nested PCR (nPCR) e verificaram que 11,2% e 3,6% dos animais eram positivos para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente.

Na Argentina, Ferreri et al. (2008) compararam os resultados obtidos por meio de um ELISA competitivo e a nested PCR (nPCR) para diagnóstico de *B. bovis* em 103 búfalos. Neste estudo, foram observados 34% de animais positivos na nPCR.

No Brasil, em uma pesquisa realizada em búfalos no estado do Rio de Janeiro, Corrêa (2011) encontrou apenas um animal positivo na PCR para *B. bovis* e nenhum para *B. bigemina*, apesar de ter sido observado alta soroprevalência para *Babesia* sp.

### **3.2.7 Controle e profilaxia**

Para o tratamento das babesioses algumas drogas como os derivados de diamidina são utilizadas, na dose de 3 a 3,5 mg/kg de peso vivo, via intramuscular, onde geralmente apenas uma única aplicação é suficiente para o controle da infecção por *B. bigemina*, enquanto que para *B. bovis* são necessárias duas a três aplicações, com intervalos de 24 horas (FARIAS, 2007).

Outra droga é o Imidocarb que é um babesicida eficaz para bovinos na dose de 1mg/kg. Quando administrado na dose de 2mg/kg consegue eliminar totalmente os parasitas de seus hospedeiros (RADOSTITIS et al., 2002).

De um modo geral, os métodos de profilaxia empregados para as hemoparasitoses são: o controle dos vetores, a quimioprofilaxia, a premunição e o uso de vacinas. O controle de carrapato constitui-se em uma medida de controle dos agentes da TPB, onde o mais adequado é buscar um controle estratégico para garantir uma imunidade suficiente para proteger os animais (RISTIC; MONTENEGRO-JAMES, 1988).

#### 4 PREVALÊNCIA SOROLÓGICA E MOLECULAR DE *Babesia bovis* E *Babesia bigemina* EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) NA ILHA DE MARAJÓ, PARÁ

O presente artigo segue as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira, na qual foi publicado.

Jenevaldo B. Silva<sup>1</sup>, Cinthia T. A. Lopes<sup>2</sup>, Cleyton P. Pinheiro<sup>2</sup>, Danillo H. S. Lima<sup>2</sup>, Roberto S. L. Silva<sup>2</sup>, Aivaldo H. Fonseca<sup>3</sup>, Flávio R. Araújo<sup>4</sup> José D. Barbosa Neto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunodiagnóstico, Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Endereço: Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Pará, Instituto de Medicina Veterinária, Endereço: BR 316, Km 62, Bairro Saudade (atrás do Instituto Federal do Pará (IFPA), Castanhal, PA 68740-970, Brasil. E-mail: diomedes@ufpa.br

<sup>3</sup> Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRRJ), Endereço: BR 465 Km 7, Seropédica, RJ23890-000, Brasil. E-mail: aivaldo@ufrj.br

<sup>4</sup> Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262 Km 4, Campo Grande, MS79002-970, Brasil. E-mail: flabio@cnpqg.embrapa.br

**ABSTRACT.-** Silva J.B., Lopes C.T.A., Pinheiro C.P., Lima D.H.S., Silva R.S.L., Fonseca A.H., Araújo F.R. & Barbosa-Neto J.D. 2013. [**Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) on Marajo Island, State of Pará, Brazil.**] Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(7):847-850. Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: [jenevaldo@hotmail.com](mailto:jenevaldo@hotmail.com)

The aim of the study was to estimate the prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes of the Marajó Island, State of Pará, Brazil. We used an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA), with total antigen containing proteins outer surface, and polymerase chain reaction (qPCR), involving the use of SYBR Green based on amplification of a small fragment of the cytochrome b gene. The prevalence of positive animals in iELISA to *B. bovis*, *B. bigemina* and mixed infection was 24.87% (199/800), 20.75% (166/800) and 18.75% (150/800), respectively. Using the PCR, the presence of *B. bovis* was detected in 15% (18/199) and *B. bigemina* in 16% (19/199) of animals, and of these, 58% (11/19) presented co-infected by the two agents. The results show a low prevalence of antibodies anti-*B. bovis* and anti-*B. bigemina* in water buffaloes from Marajó Island. However, it was observed that the agents of bovine babesiosis circulate in buffaloes, and these may act as reservoirs.

**INDEX TERMS:** *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, buffaloes, *Bubalus bubalis*, ELISA, qPCR, Marajó Island.

**RESUMO:** O objetivo do estudo foi testar a prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos da Ilha de Marajó, Pará. Foi utilizado ensaio de imunoadsorção enzimático indireto (iELISA) com antígeno total contendo proteínas de superfície externa e reação em cadeia da polimerase (qPCR), envolvendo o uso de SYBR Green com base na amplificação de um pequeno fragmento de gene do citocromo b. A prevalência de animais positivos no ELISA para *B. bovis*, *B. bigemina* e para infecção mista foi de 24.87% (199/800), 20.75% (166/800) e 18.75% (150/800), respectivamente. Na PCR foi detectado a presença de *B. bovis* em 15% (18/199) e de *B. bigemina* em 16% (19/199) dos animais, sendo que destes, 58% (11/19) apresentavam-se co-infectados pelos dois agentes. Os resultados mostram uma baixa prevalência de anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em búfalos da Ilha do Marajó. Porém, observou-se que os agentes da babesiose bovina circulam em búfalos, podendo estes atuar como reservatórios.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, búfalos, *Bubalus bubalis*, ELISA, qPCR, Ilha de Marajó.

## 4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de búfalos do ocidente e aproximadamente um terço do rebanho nacional encontra-se na Ilha de Marajó, estado do Pará (IBGE 2008). Nas últimas décadas a bubalinocultura tem ganhado destaque no cenário nacional, deixando de ser apenas uma alternativa para a ocupação de terras impróprias para a criação de bovinos e passando a ser uma opção economicamente rentável. Com isso, a preocupação com manejo sanitário tem aumentado consideravelmente, pois aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos ainda são pouco estudados no país.

As babesioses bovina, causadas por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, são doenças de grande impacto econômico em todo o mundo. A infecção concomitante destes dois microrganismos, juntamente com a rickettsia *Anaplasma marginale*, é responsável pela enfermidade conhecida como Tristeza Parasitária Bovina (GRISE et al. 2002). Espécies do gênero *Babesia* podem infectar diferentes hospedeiros, como ruminantes selvagens, canídeos, felídeos, roedores, inclusive o búfalo d'água e o búfalo africano, por meio de vetores biológicos e mecânicos (DE LA FUENTE et al. 2005). Esta enfermidade é responsável por perdas significativas com mortalidade e redução da produção, além de gastos na utilização de medicamentos.

O diagnóstico da babesiose tem sido feito por identificação dos parasitos em esfregaço sanguíneo. Porém, embora rápido e barato, este teste não apresenta alta sensibilidade, sendo indicado apenas para animais com doença clínica, por gerar resultados inconsistentes quando empregado em animais com infecção subclínica ou crônica (TERKAWI et al. 2011).

A partir da década de 1990, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem apresentado maior sensibilidade e especificidade do que o diagnóstico por microscopia óptica (FAHRIMAL et al. 1992, FIGUEROA et al. 1993). Além dos testes moleculares, os testes sorológicos, ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), têm mostrado alta capacidade de detectar anticorpos em animais cronicamente infectados, sendo frequentemente utilizados em estudos de levantamentos epidemiológicos (ARAÚJO et al. 1998).

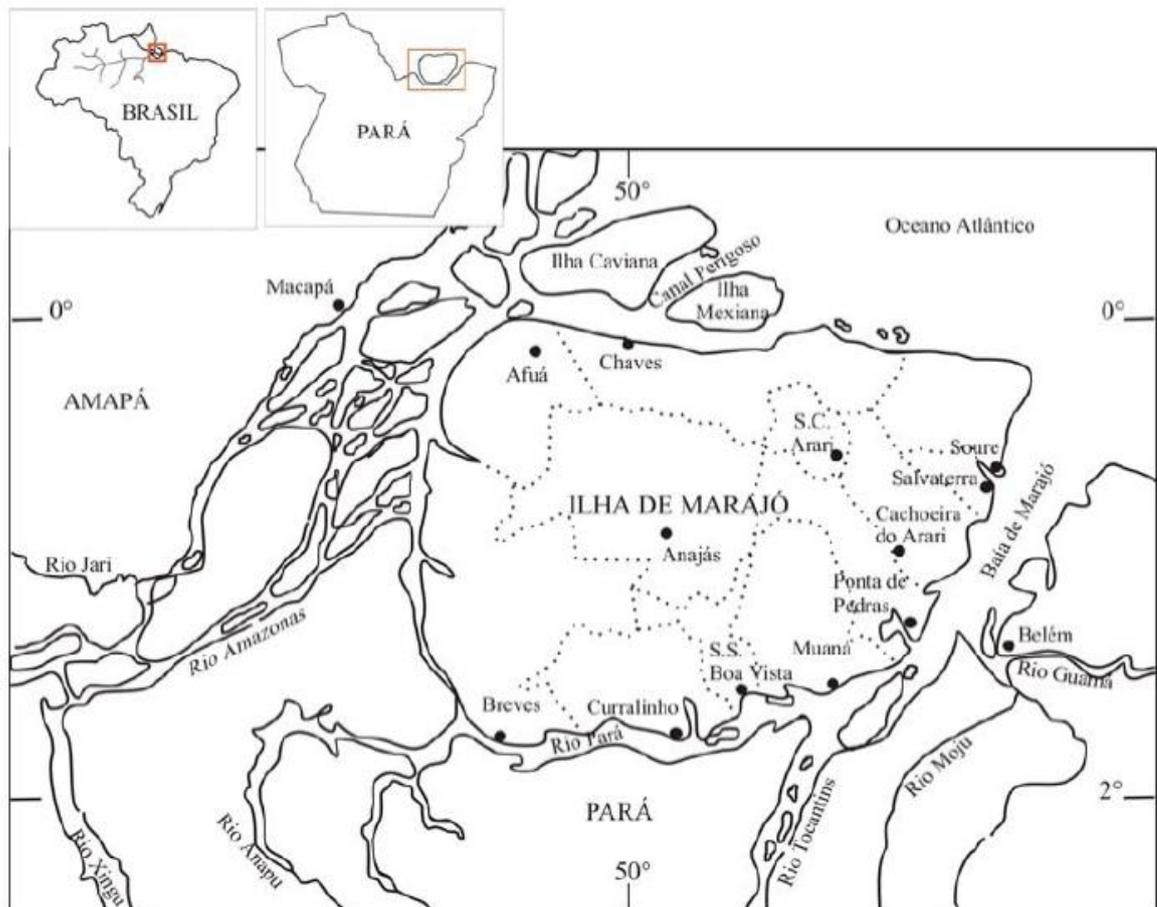
Assim, a associação entre estudos moleculares e sorológicos tem mostrado ser uma poderosa ferramenta para levantamentos epidemiológicos, sobretudo em agentes que se apresentam em baixa prevalência (GOO et al. 2008, TERKAWI et al. 2011). Neste contexto, o objetivo do estudo foi detectar por ELISA e PCR *B. bovis* e *B. bigemina* em búfalos na Ilha

de Marajó, Estado do Pará, Brasil

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no município de Soure, microrregião do Arari, Ilha do Marajó, estado do Pará, Brasil. A Ilha localiza-se a uma latitude de 00°43'00" sul e a uma longitude de 48°31'24" oeste, a uma altitude de 10 metros (Figura 2).

Figura 2: Ilha de Marajó com 12 municípios, limitada pela Baía de Marajó, rio Pará e Oceano Atlântico.



O cálculo do tamanho mínimo da amostra foi determinado pela fórmula do Centro Panamericano de Zoonoses (1997), em que:  $N = p \cdot (100 - p) Z^2 / (d \cdot p / 100)^2$ , sendo N=número de amostras; p=prevalência esperada; Z=grau de confiança e d=margem de erro. Para os valores de prevalência esperada (p) para *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos, foi utilizado o estudo de Guedes Jr et al. (2008). O intervalo de confiança foi de 95% e a margem de erro foi de 5%. Desta forma, selecionou-se 800 bubalinos por amostragem aleatória. Os animais eram da raça Murrah, com idade entre um e três anos, fêmeas e

mantidas em sistema de criação extensiva.

Os títulos de anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* foram determinados pelo Ensaio de Imunoadsorção Enzimático indireto (iELISA), segundo Machado et al. (1997). Como controles positivos, foram utilizados soros de bubalinos com alta parasitemia (qPCR) e título de anticorpos (ELISA e RIFI). Como controles negativos, utilizaram-se soros de bubalinos recém nascidos que não ingeriram colostro e negativos na PCR e ELISA/RIFI. A leitura foi realizada em leitor de ELISA, em um comprimento de onda de 405nm.

A atividade enzimática de cada soro no ELISA foi calculada mediante determinação do valor da amostra em relação ao referencial positivo (A/P). Os valores A/P foram agrupados em níveis ELISA (NE), que variaram de zero a nove. A amplitude máxima do NE zero foi determinada pela média dos valores em absorbância de soros de animais soronegativos acrescida de dois desvios padrões da média, conforme estabelecido por Machado et al. (1997). A partir deste limite, os intervalos entre os outros níveis no ELISA foram acrescidos de 35% cada, segundo Wilson et al. (1984) para o sistema Newcastle. O ponto de corte do teste foi determinado usando a média da densidade óptica (DO) de soros de animais negativos para *B. bovis* e *B. bigemina* multiplicado por 2,5.

Foram selecionados aleatoriamente 25% (200/800) das amostras para realização da PCR. A PCR e o ELISA foram feitos de forma independentes. Para maior integridade e confiabilidade dos dados o ELISA foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ e a PCR no Laboratório de Biologia Molecular Animal da Embrapa Gado de Corte. Todas as amostras colhidas foram submetidas ao ELISA. Porém, apenas uma parte foi aleatoriamente selecionada para a PCR logo após a colheita. Essa seleção foi feita antes mesmo que as amostras tivessem sido submetidas ao ELISA. A PCR foi realizada segundo Buling et al. (2007). Para isso o DNA das amostras foi extraído, utilizando o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®), para determinar e quantificar os níveis parasitêmicos de *B. bovis* e *B. bigemina*.

As frequências de animais positivos no ELISA e na PCR para *B. bovis* e *B. bigemina* foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado com 95% de confiabilidade. A concordância entre a frequência de animais positivos na PCR e no ELISA foi avaliada utilizando o índice Kappa (KRAMER & FEINSTEIN 1981). Os procedimentos operacionais foram feitos utilizando o software Rstudio, Foundation computação estatística, versão 2.12.2 (2011).

### 4.3 RESULTADOS

Os valores médios e desvios padrões da densidade óptica dos controles negativos e positivos para *Babesia bovis* foi  $0.127 \pm 0.01$  e  $1.026 \pm 0.04$  e para *Babesia bigemina* foi  $0.121 \pm 0.01$  e  $1.008 \pm 0.06$ , respectivamente. A classificação dos soros em níveis de ELISA (NE) está representada na tabela 1.

Tabela 1: Valores de densidade óptica dos níveis de ELISA (NE) para *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e percentual de animais (%) em cada intervalo.

NE	A/P	B.bovis	A/P	B. bigemina
0	0 - 0.147	20%	0 - 0.129	25%
1	0.148 - 0.200	35%	0.130 - 0.175	21%
2	0.201 - 0.271	15%	0.176 - 0.238	23%
3	0.272 - 0.367	10%	0.239 - 0.323	13%
4	0.368 - 0.497	10%	0.324 - 0.437	9%
5	0.498 - 0.672	4%	0.438 - 0.591	3%
6	0.673 - 0.908	2%	0.592 - 0.799	1%
7	0.909 - 1.227	3%	0.800 - 1.080	2%
8	1.228 - 1.658	2%	1.081 - 1.459	3%
9	>1.658	0%	>1.459	0%

Entre as amostras avaliadas simultaneamente por ELISA e PCR, observou-se que a positividade foi de 20% no ELISA e 15% na PCR e que apenas 5% das amostras foram positivas no ELISA e na PCR. Esses resultados demonstram que apenas 33% das amostras positivas na PCR foram diagnosticadas como positivas no ELISA. Porém, quando somado as amostras positivas dos dois testes, observou-se que 35% das amostras foram positivas, demonstrando um acréscimo na sensibilidade, o que aumentou as chances de diagnóstico positivo (Tabela 2).

Tabela 2: Detecção sorológica e molecular de *Babesia* sp. em búfalos, Ilha do Marajó, Pará.

<i>Babesia</i> sp.	PCR	
	Positivo	Negativo
ELISA		
Positivo	5	20
Negativo	10	65

A soroprevalência para *B. bovis* foi de 24.87% (199/800) e para *B. bigemina* 20.75% (166/800). Entre os animais soropositivos, 22.79% (49/215) possuíam anticorpos apenas anti-*B. bovis* e, 7.44% (16/215) apenas para *B. bigemina* e 69.76% (150/215) possuíam anticorpos circulantes contra os dois agentes (Tabela 3).

Tabela 3: Prevalência de búfalos soropositivos para *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* por ensaio de imunoadsorção enzimático, Ilha do Marajó, Pará.

ELISA	<i>Babesia bigemina</i>	
	Positivo	Negativo
<i>Babesia bovis</i>		
Positivo	150	49
Negativo	16	585

Pela PCR foi detectada a presença de *B. bovis* em 9% (18/200) de *B. bigemina* em 9,5% (19/200) dos animais, sendo que destes, 58% (11/19) apresentavam-se co-infectados (Tabela 4).

Tabela 4: Prevalência de búfalos positivos para *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* por reação em cadeia da polimerase, Ilha de Marajó, Pará.

PCR	<i>Babesia bigemina</i>	
	Positivo	Negativo
<i>Babesia bovis</i>		
Positivo	11	7
Negativo	8	174

#### 4.4 DISCUSSÃO

A prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* observadas neste estudo foi inferior aos resultados encontrados por Guedes et al. (2008) no Brasil e superiores aos encontrados por Terkawi et al. (2011) na Tailândia e por He et al. (2012) na China. A prevalência sorológica neste estudo foi 1.7 e 4.1 vezes maior do que Terkawi et al. (2011) observaram na Tailândia e 24 e 28 vezes maior do que He et al. (2012) observaram na China, para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Neste estudo, o número de amostras co-infestadas (18.75%) foram superiores aos 3.9% observados por He et al. (2012).

A baixa frequência de búfalos soropositivos para *B. bovis* e *B. bigemina* sugere uma baixa taxa de transmissão desses organismos por carrapatos na região estudada. Esses resultados classificam a área como endemicamente instável para estes hemoprotozoários, segundo classificação de Mahoney & Ross (1972) e Terkawi et al. (2011). Assim, os búfalos podem atuar como reservatórios da babesiose bovina, representando um risco para rebanhos onde búfalos e bovinos são mantidos juntos.

Na avaliação molecular, os resultados deste estudo são 1.3 e 4.4 vezes superiores aos observados por Terkawi et al. (2011) para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. No Brasil poucos estudos moleculares foram realizados para agentes da babesiose em búfalos. Corrêa (2011), embora tenha observado alta soroprevalência para *Babesia* sp., encontrou apenas um animal positivo na PCR para *B. bovis* e nenhum para *B. bigemina*.

Os resultados dos testes moleculares e sorológicos não apresentaram alta concordância ( $\kappa = 0.62$ ). Estes resultados são similares aos observados por Corrêa (2011) e diferentes dos de Terkawi et al. (2011), que observaram alta concordância entre os testes. Porém, o número de animais positivos nestes dois estudos foi muito baixo, dificultando uma análise mais detalhada dos dados. Nossos resultados demonstram que a melhor alternativa em estudos sanitários e levantamentos epidemiológicos da babesiose bubalina seria a combinação entre as duas técnicas.

Na Argentina, Ferreri et al. (2008) observaram na província de Corrientes que, de 103 amostras de búfalos examinadas para *B. bovis*, apenas 35 (34%) tiveram reação positiva, enquanto um significativo número de amostras positivas na PCR foram detectadas em amostras da província de Lavalle 22/36 (61%). O hábito dos bubalinos manterem-se submersos na água pode ser a explicação mais aceitável para a baixa prevalência de carrapatos e, conseqüentemente de *Babesia* sp. em relação aos resultados observados para

bovinos (TERKAWI et al. 2011).

Na Índia, os búfalos, em condições naturais, são raramente acometidos pela forma clínica da babesiose e acredita-se que sejam refratários a essa infecção devido à resistência imunológica natural (ROYCHOUDHURY & GAUTAM, 1979). Porém, outros trabalhos relatam a babesiose como preocupante no rebanho bubalino da Índia. Muraleedharan et al. (1984) mencionaram que *B. bigemina* era comum tanto em búfalos quanto em bovinos.

Banerjee et al. (1988) observaram que os búfalos quando parasitados por *B. bigemina* não sofrem severamente, mas podem ser reservatórios em potencial para os bovinos, quando estes coabitam as mesmas pastagens. Assim, o elevado número de animais positivos na PCR e o baixo percentual de animais soropositivos no ELISA demonstram que estes animais podem ser vulneráveis e funcionar como um reservatório do agente no estado do Pará, o qual tem um dos maiores rebanhos bovino do país e encontra-se em franca expansão.

#### 4.5 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados mostram uma baixa prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em búfalos da Ilha de Marajó.

Porém, observou-se através da PCR que os agentes da babesiose bovina circulam em búfalos, podendo os mesmos atuar como reservatórios.

Verificou-se uma moderada concordância entre os testes realizados no presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. R. et al. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination test in detecting antibodies against *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 101- 108, 1998.
- BANERJEE, D. P.; MOMIM, R. R.; SAMANTA, R. A.Y. Cross transmission of *Babesia bigemina* from cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*) to buffalo (*Bubalus bubalis*). In: WOLRD BUFFALO CONGRESS, 2, 1998, New Delhi Proceedings...New Delhi: **Indian Council of Agricultural Research**, 1988. p. 329.
- BARBOSA, M. F. R.; COSTA, J. O.; TAFURI, W. L. Transmissão congênita de *Babesia bovis*: relato de um caso em Minas Gerais – Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 519-526, 1994.
- BARREIRA, J. D. et al. Caracterização morfológica e aspectos biológicos das formas evolutivas de *Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2005.
- BERTO, R. S. et al. Frequência de anticorpos IgG anti - *Babesia bovis* e anti - *Babesia bigemina* em bovinos no Município do Paudalho, Zona da Mata do estado de Pernambuco. **Medicina Veterinária**, v. 2, n. 3, p. 9-12, 2008.
- BOCK, R. E. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. S247-S269, 2004.
- BÖSE, R. et al. Current state and future trends in the diagnosis of babesioses. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 61-74, 1995.
- BRACARENSE, A. P. F. L.; VIDOTTO, O.; CRUZ, G. D. Transmissão congênita de *Babesia bovis*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 4, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Rebanho bubalino brasileiro: Efetivo por Unidade de Federação**. 2011. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 22 julho 2013.
- BRITO, L. G. et al. *Babesia bovis* infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 4, p. 78-82, 2013.
- BROWN, W. C. et al. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 75-87, 2006.
- BULING, A. et al. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 16-25, 2007.
- CALLOW, L. L. **Animal health in Australia. Protozoal and rickettsial diseases**. Canberra: Australian Government Publishing Service, 1984, v. 5, 264 p.
- CENTRO PAN-AMERICANO DE ZOONOSES. **Procedimientos para Estudios de Prevalencia por Muestreo**. Ramos Mejia: Buenos Aires, 1979. 35 p. (Nota Técnica 18).

COCKRILL, W. R. O búfalo em ascensão: animal doméstico fundamental, criação, proteção e saúde animal. In: RAMOS, A. A.; VILLARES, J. B.; MOURA, J. C.(Ed.). **Os búfalos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1981. p. 01-54.

CORRÊA, F. N. **Estudo epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigeminae* *Anaplasma marginale* em búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro**. 2011. 99 f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2011.

COSTA, C. L. et al. Determinação dos níveis de anticorpos anti-*Babesia* spp. em bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis*), desde o nascimento até um ano de idade. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 117-121, 1997.

CHAUVIN, A. et al. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p. 37, 2009.

DALGLIESH, R. J.; STEWART, N. P. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. **Veterinary Parasitology**, v. 13, n. 4, p. 317-323, 1983.

DE LA FUENTE, J. et al. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in Central Spain. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 5, p. 390-401, 2005.

DOMINGUEZ, M. et al. Use of a Monoclonal Antibody against *Babesia bovis* Merozoite Surface Antigen-2c for the Development of a Competitive ELISA Test. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1026, n. 1, p. 165-170, 2004.

FAHRIMAL, Y.; GOFF, W. L.; JASMER, D. P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1374-1379, 1992.

FARIAS, N. A. Doenças parasitárias - Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD A.L.; LEMOS R.A.A; BORGES J.R.J. (Eds), **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3. ed. v.1. Santa Maria: Pallotti, 2007. p. 524-530.

FERRERI, L. et al. Water Buffalos as Carriers of *Babesia bovis* in Argentina. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 149-151, 2008.

FIGUEROA, J. V. et al. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, p. 69-81, 1993.

FRANQUE, M. P. **Perfil da Pecuária Leiteira e Aspectos Epidemiológicos do Complexo Tristeza Parasitária Bovina na Mesorregião Sul Espírito-santense, ES**. 2010. 115 f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

FRANZOLIN NETO, R; DELL'PORTO, A.; LACAZ RUIZ, R. Anaplasmosis and babesiosis: a clinical case in Buffalo (*Bubalus bubalis*) calf in Brazil. **Buffalo Bulletin**, v. 8, n. 3, p. 54-68, 1989.

FRASER, C. M. **Manual Merck de Veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário**. 7. ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 81-83.

GOMES, R. A. **Resposta imune-humoral de búfalos (*Bubalus bubalis*) infectados naturalmente por *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale***. 2007. 92 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007.

GONÇALVES, P. M. Epidemiology and control of bovine babesioses and anaplasmosis in southeast region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p.187-194, 2000.

GOO, Y. K. et al. *Babesia gibsoni*: serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 555-560, 2008.

GORDON, J. L.; SIBLEY, L. D. Comparative genome analysis reveals a conserved family of factin-like proteins in apicomplexan parasites. **BMC Genomics**, v. 6, n. 1, p. 179, 2005.

GRISI, L. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, v.21, p. 8-10, 2002.

GUEDES JR, D. S. et al. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

HE, L. et al. Occurrence of *Theileria* and *Babesia* species in water buffalo (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) in the Hubei province, South China. **Veterinary Parasitology**, v. 186. p. 490-496. 2012.

HODGSON, J. H. Biology and transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 653, n. 1, p. 42-51, 1992.

HOWARD, J. et al. **Babesiose bovina in: Exploring global issues in veterinary medicine, 2001**. Disponível em: <<http://www.vet.uga.edu/VPP/nsep/Brazil2001/index.htm>>. Acesso em: 03 setembro de 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivo de bubalinos no Brasil**. 2008. Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)> Acesso em: 10 de setembro de 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012. **Produção da pecuária municipal**. ISSN 0101-4234. Rio de Janeiro, v.40, 68p.

IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. **Técnicas para el diagnóstico de babesioses y anaplasmosis bovina**. San José: IICA, 1987. 79p.

- ISEKI, H. et al. Seroprevalence of *Babesia* infections of dairy cows in northern Thailand. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 193–196, 2010.
- KESSLER, R.H. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babes, 1888; Starcovici, 1893) em bezerros, no estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18, n. 8, p. 931-935, 1983.
- KRAMER, M. S.; FEINSTEIN, A. R. Clinical biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, p. 111-123, 1981.
- KUTTLER, K.L. “**Bovine Babesiosis.**” In **Foreign Animal Diseases**. Richmond, VA: United States Animal Health Association. 1998. Disponível em: [http://www.vet.uga.edu/vpp/gray\\_book02/fad/bab.php](http://www.vet.uga.edu/vpp/gray_book02/fad/bab.php) Acesso em: 4 setembro de 2013.
- LAÚ, H. D. **Doenças em búfalos no Brasil – Diagnóstico, epidemiologia e controle**. Belém: Embrapa, 1999. 202p.
- LIU, Z. et al. *Babesia orientalis* sp. nov., a parasite of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in China. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, v. 28, n. 1, p. 84-89, 1997.
- LOPES, C. T. A. et al. Detecção sorológica de *Babesia bovis* em búfalos na Ilha de Marajó, estado do Pará, Brasil. In: X Congresso Brasileiro de Buiatria, 2013, Belém, Pará. **Anais do X Congresso Brasileiro de Buiatria**, setembro 2013.
- MACHADO R. Z. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection on antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 17-26. 1997.
- MADRUGA, C. R. et al. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p.1163-1168, 1984.
- MADRUGA, C. R. et al. **Diagnóstico da tristeza parasitária bovina no estado do Mato Grosso do Sul: inquérito de opinião**. Ministério Agricultura EMBRAPA - CNPGC, 1986. 32p. Circular Técnica, n.18.
- MADRUGA, C. R. et al. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and it's application in an epidemiological survey in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 72-76, 2001.
- MAHONEY D. F.; ROSS D. R. 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 292-298.
- MATHIAS, L. A. et al. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 3-4, p. 111-114, 1998.

MURALEEDHARAN, K. et al. Some observations on clinical cases of *Babesia bovis* (BABES, 1888) Starcovici, 1893, in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **The Indian Veterinary Journal**, v. 61, p. 76-79, 1984.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Aspectos epidemiológicos da babesiose bovina em São Carlos, SP. **Comunicado Técnico Embrapa Pecuária Sudeste**, São Carlos, 6p., n. 49, jun. 2004. Disponível em:<<http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacao gratuita/boletim-de-pesquisa-desenvolvimento>> Acesso em: 24 agosto 2013.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. et al. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 105–111, 2005.

OSAKI, S. C. et al. Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça nelore na região de Umuarama, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 77-83, 2002.

PATARROYO, J. H.; VARGAS, M. I.; BICUDO, P. L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 11, n. 4, p.301-308, 1982.

PINHEIRO, C. P. et al. Níveis de fósforo, cobre, cobalto e zinco em bubalinos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 193-198, 2011.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. Doenças causadas por riquetsias **Clínica Veterinária – Um Tratado De Doenças Dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. Doenças causadas por protozoários 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. p.1132-1136.

RIET-CORREA, F.; RIET-CORREA, G.; SCHILD, A.L.; Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e eqüídeos, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.161-168, 2002.

RISTIC, M.; MONTENEGRO-JAMES, S. Immunization against *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. New York: CRC, 1988. p.131-142.

RODRIGUES, A. et al. Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.121-125, 2005.

ROYCHOUDHURY, G. K.; GAUTAM, O. P. Experimental studies on the pathogenicity of *Babesia bigemina* in buffalo calves. **Tropical Animal Health and Production**, v. 11, p. 91-93, 1979.

SCHNITTGER, L. et al. *Babesia*: A world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1788–1809, 2012.

SINGH, H. et al. Seroprevalence of babesiosis in cattle and buffaloes by indirect fluorescent antibody test. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 1, p. 1-4, 2007.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos, e caprinos**, São Paulo. Editora Manole, 1993. p.1079 -1085.

SOARES, C. O. et al. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na região Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.

SOUZA, J. C. P. et al. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 26-30, 2000.

TERKAWI, M.A. et al. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 201–207, 2011.

UILENBERG, G. *Babesia*-A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p.3–10, 2006.

YAO, B. et al. Studies on the pathogenicity of *Babesia bovis* in water buffaloes after cryopreservation and resuscitation. **Tropical Animal Health and Production**.v. 29, p. 40S–42S, 1997.

WILSON, R. A. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens. **Avian Diseases**. v. 28, p. 1079-1085, 1984.

WRIGHT, I. G. et al. Immunopathophysiology of babesial infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, supl. 1, p.11-13, 1989.