



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**  
**CURSO DE MESTRADO**

**INGRID CAROLINNE LOPES MARQUES**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Babesia* spp. EM PEQUENOS RUMINANTES DA  
MICRORREGIÃO DO BAIXO PARNAÍBA, MARANHÃO**

**SÃO LUÍS – MA**

**2020**

**INGRID CAROLINNE LOPES MARQUES**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Babesia* spp. EM PEQUENOS RUMINANTES DA  
MICRORREGIÃO DO BAIXO PARNAÍBA, MARANHÃO**

Exame de Qualificação apresentado ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alcina Vieira Carvalho Neta

**SÃO LUÍS – MA**

**2020**

INGRID CAROLINNE LOPES MARQUES

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Babesia* spp. EM PEQUENOS RUMINANTES DA  
MICRORREGIÃO DO BAIXO PARNAÍBA, MARANHÃO**

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta  
Universidade Estadual do Maranhão  
Orientadora

---

Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa  
Universidade Estadual do Maranhão  
Membro interno

---

Profa. Dra. Larissa Sarmiento dos Santos  
Universidade Estadual do Maranhão  
Membro externo

## RESUMO

A babesiose é uma doença parasitária transmitida por carrapatos e causada por protozoários do gênero *Babesia*, os quais estão amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais no mundo e podem afetar diversas espécies de mamíferos, aves e répteis. A enfermidade tem apresentado importância crescente na Saúde Pública, por tratar-se de uma zoonose, além de causar prejuízos econômicos decorrentes do acometimento dos animais de produção, incluindo caprinos e ovinos. Especificamente nos pequenos ruminantes, três espécies têm sido amplamente detectadas: *Babesia ovis*, *Babesia motasi* e *Babesia crassa*, sendo a *B. ovis* a mais patogênica do grupo, sobretudo em ovinos, podendo inclusive levar à morte. Apesar da notável importância da ovinocaprinocultura no cenário socioeconômico nacional, especialmente na região nordeste, o desenvolvimento de pesquisas sobre patógenos que podem afetar esses rebanhos, incluindo estudos acerca da ocorrência de *Babesia* spp., são pouco relatados ou ausentes na literatura existente até o momento. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo detectar e identificar *Babesia* spp. em ovinos e caprinos da microrregião do Baixo Parnaíba, região leste do Maranhão, através de microscopia direta e ensaios de PCR, e determinar suas relações filogenéticas com espécies relacionadas com base na análise da sequência do gene 18S rRNA. Sendo assim, foram coletadas amostras de sangue de 70 ovinos e 91 caprinos dos municípios de Chapadinha, Brejo, Anapurus e Mata Roma. O material coletado foi submetido a métodos de diagnóstico microscópico direto e molecular, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase do gene 18S rRNA, conservado entre as espécies de *Babesia*. Não foram encontradas formas evolutivas de *Babesia* spp. em nenhuma das 161 lâminas de esfregaços sanguíneo analisadas. Entretanto, com relação à detecção molecular, obteve-se amplificação positiva de DNA de *Babesia* spp. em 64 amostras testadas. Os achados deste estudo evidenciam, pela primeira vez, a detecção molecular de *Babesia* spp. em caprinos e ovinos no Maranhão e no Brasil.

Palavras-chave: *Babesia* spp.; caprinos; ovinos; PCR; Maranhão.

## ABSTRACT

Babesiosis is a parasitic disease transmitted by ticks and caused by protozoa of the genus *Babesia*. It is generally distributed in tropical and subtropical regions worldwide and can affect several species of mammals, birds and reptiles. The disease has become increasingly important in Public Health, as it is a zoonosis, in addition to causing economic losses resulting from the involvement of farm animals, including goats and sheep. Specifically in small ruminants, three species have been widely detected: *Babesia ovis*, *Babesia motasi* and *Babesia crassa*, with *B. ovis* being the most pathogenic of the group, especially in sheep, which can even lead to death. Despite the notable importance of sheep and goats in the national socioeconomic scenario, especially in the northeastern region, the development of research on pathogens that can affect these herds, including studies on the occurrence of *Babesia* spp., are little reported or absent in the existing literature to date. Thus, the present study aimed to detect and identify *Babesia* spp. in sheep and goats from the Baixo Parnaíba microregion, eastern Maranhão, through direct microscopy and PCR assays, and determine their phylogenetic relationships with related species based on the analysis of the 18S rRNA gene sequence. Thus, blood samples were collected from 70 sheep and 91 goats from the municipalities of Chapadinha, Brejo, Anapurus and Mata Roma. The collected material was subjected to direct and molecular microscopic diagnostic methods, using the polymerase chain reaction of the 18S rRNA gene, conserved among *Babesia* species. No evolutionary forms of *Babesia* spp. on any of the 161 blood smear slides analyzed. However, with respect to molecular detection, positive amplification of *Babesia* spp. was observed in 64 tested samples. The findings of this study show, for the first time, the molecular detection of *Babesia* spp. in goats and sheep in Maranhão and Brazil.

Key words: *Babesia* spp.; goats; sheep; PCR; Maranhão.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Região de Desenvolvimento do Baixo Parnaíba Maranhense.....                                                           | 22 |
| <b>Figura 2.</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SybrSafe.....                                          | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SybrSafe.....                                          | 26 |
| <b>Figura 4.</b> Captura de tela do programa BLAST. Notar o percentual de similaridade elevado com a espécie <i>Babesia ovis</i> ..... | 28 |
| <b>Tabela 1.</b> Iniciadores utilizados na PCR convencional.....                                                                       | 24 |

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

|                 |                                                                                |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| %               | Porcentagem                                                                    |
| µL              | Microlitro                                                                     |
| 18s rRNA        | Gene 18S da subunidade pequena nuclear do RNA ribossômico                      |
| SCID            | Do inglês <i>Severe Combined Immunodeficiency</i>                              |
| CEEA            | Comitê de Ética e Experimentação Animal                                        |
| CFT             | Teste de Fixação do Complemento                                                |
| CN              | Controle Negativo                                                              |
| CP              | Controle Positivo                                                              |
| <i>cyt b</i>    | Citocromo b                                                                    |
| DNA             | Ácido desoxirribonucleico                                                      |
| EDTA            | Ácido etilenodiamino tetra-acético                                             |
| ELISA           | Ensaio Imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i> ) |
| EMBRAPA         | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária                                    |
| IBGE            | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                                |
| km <sup>2</sup> | Quilômetros quadrados                                                          |
| mA              | Miliampère                                                                     |
| mL              | Mililitro                                                                      |
| MM              | Marcador de Peso Molecular                                                     |
| °C              | Graus Celsius                                                                  |
| PCR             | Reação em Cadeia da Polimerase                                                 |
| RIFI            | Reação de Imunofluorescência Indireta                                          |
| UEMA            | Universidade Estadual do Maranhão                                              |
| V               | Volts                                                                          |
| W               | Watts                                                                          |
| µm              | Micrômetro                                                                     |

## SUMÁRIO

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                      | <b>9</b>  |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                            | <b>10</b> |
| <b>2.1 A importância da ovinocaprinocultura no Nordeste do Brasil .....</b>                    | <b>10</b> |
| <b>2.2 A ovinocaprinocultura no Maranhão .....</b>                                             | <b>11</b> |
| <b>2.3 Babesiose: definição, etiologia e classificação .....</b>                               | <b>12</b> |
| <b>2.4 Ciclo de vida e Transmissão .....</b>                                                   | <b>13</b> |
| <b>2.5 Epidemiologia .....</b>                                                                 | <b>16</b> |
| <b>2.6 Patogenia e Sinais clínicos.....</b>                                                    | <b>17</b> |
| <b>2.7 Métodos de diagnóstico .....</b>                                                        | <b>18</b> |
| <b>2.8 Diversidade Genética.....</b>                                                           | <b>19</b> |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>                                                                       | <b>21</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral.....</b>                                                                 | <b>21</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos.....</b>                                                          | <b>21</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                              | <b>21</b> |
| <b>4.1 Considerações éticas .....</b>                                                          | <b>21</b> |
| <b>4.3 Animais e Coleta de Amostras.....</b>                                                   | <b>22</b> |
| <b>4.4 Detecção direta por meio de microscopia.....</b>                                        | <b>23</b> |
| <b>4.5 Extração de DNA .....</b>                                                               | <b>23</b> |
| <b>4.6 Análises moleculares .....</b>                                                          | <b>23</b> |
| <b>4.6.1 Detecção do gene endógeno <i>cyt b</i> .....</b>                                      | <b>23</b> |
| <b>4.6.2 Detecção de <i>Babesia</i> spp. ....</b>                                              | <b>24</b> |
| <b>4.6.3 Eletroforese em Gel de Agarose .....</b>                                              | <b>24</b> |
| <b>4.6.4 Purificação, sequenciamento e análise filogenética dos produtos amplificados.....</b> | <b>24</b> |
| <b>4.7 Análise Estatística.....</b>                                                            | <b>25</b> |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>                                                                      | <b>25</b> |
| <b>5.1 Detecção de <i>Babesia</i> spp. em esfregaços sanguíneos .....</b>                      | <b>25</b> |
| <b>5.2 Diagnóstico molecular com base no gene 18S rRNA.....</b>                                | <b>26</b> |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>                                                                       | <b>27</b> |
| <b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                             | <b>29</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                       | <b>30</b> |



## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças parasitárias transmitidas por vetores, a babesiose é, indiscutivelmente, uma das enfermidades mais importantes em rebanhos e animais domésticos. Sua relevância em termos de saúde pública, por se tratar de uma zoonose, têm aumentado, e o impacto econômico da doença, principalmente em criações de bovinos, bubalinos, equinos e pequenos ruminantes, é considerável (LEMPEREUR et al., 2017).

A babesiose é uma enfermidade transmitida por carrapatos e causada por hemoprotozoários do gênero *Babesia* (NADERI, NAYEBZADEH e GHOLAMI, 2017). Os parasitos incluídos nesse gênero estão amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais no mundo e podem afetar diversas espécies de mamíferos, aves e répteis (SCHNITTGER et al., 2012; KAGE et al., 2019; MAGGI e KRÄMER, 2019; BADAWI e YOUSIF, 2020). Especificamente em relação aos ovinos e caprinos, três destas espécies têm sido amplamente detectadas: *Babesia ovis*, *Babesia motasi* e *Babesia crassa*, sendo *B. ovis* a mais patogênica deste grupo, sobretudo em ovinos, podendo levar a uma doença com curso fatal (AKTAS, ALTAY e DUMANLI, 2005; RANJBAR-BAHADORI et al. 2012).

No Brasil, a abundância e diversidade de espécies de carrapatos pode representar riscos potenciais para a saúde animal e humana. Os carrapatos da família *Ixodidae*, em especial a espécie *Rhipicephalus microplus*, são os principais espécimes associados à transmissão de babesiose ao gado bovino e também são amplamente encontrados parasitando ovinos e caprinos (SUASSUNABEZERRA et al., 2010; GARCIA et al., 2014; SOUZA et al., 2018).

De modo geral, o método de diagnóstico mais empregado para a detecção da infecção por *Babesia spp.* é o exame microscópico de esfregaços sanguíneos. Esta técnica permanece sendo considerada “padrão-ouro” para o diagnóstico da babesiose em muitos países (SHABANA, ALHADLAG e ZARAKE, 2018; KAGE et al., 2019). No entanto, em animais em fase crônica ou infecções subclínicas, a detecção dos parasitos é baixa, o que torna esta técnica pouco sensível (AKTAS, ALTAY e DUMANLI, 2005; EKICI e SEVINC, 2011).

Por isso, técnicas sorológicas e moleculares são empregadas para o diagnóstico preciso da infecção (ALTAY, DUMANLI e AKTAS, 2007; MASON et al., 2017). Dentre estas, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada, destacando-se pela maior sensibilidade e especificidade, e também pela extensa capacidade de identificar espécies, subespécies ou coinfeções que podem ocorrer nos rebanhos (NADERI et al., 2017).

O Brasil possui o maior rebanho de ovinos e caprinos da América do Sul, sendo o maior produtor de carne ovina e o segundo de carne caprina e, quanto ao consumo, é o segundo maior consumidor de ambas as carnes (EMBRAPA, 2017). Nesse cenário, a região nordeste apresenta destaque, detendo a maior parte do quantitativo de ambas as espécies em todo território nacional, e vem contribuindo positivamente para o crescimento do setor. Desse total, o estado do Maranhão detém 3,71% do efetivo caprino e 1,54% do efetivo ovino brasileiro (IBGE, 2019).

Apesar da notável importância da ovinocaprinocultura no cenário socioeconômico nacional, o desenvolvimento de pesquisas sobre patógenos que podem afetar esses rebanhos, incluindo estudos acerca da ocorrência de *Babesia* spp., são pouco relatadas ou ausentes na literatura existente até o momento. Nesse sentido, os objetivos do presente estudo foram detectar e identificar *Babesia* spp. infectando ovinos e caprinos da microrregião do Baixo Parnaíba, região leste do Maranhão, através de microscopia direta e ensaios de PCR, e determinar suas relações filogenéticas com espécies relacionadas com base na análise da sequência do gene 18S rRNA.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A importância da ovinocaprinocultura no Nordeste do Brasil**

A caprinocultura e a ovinocultura são atividades difundidas em todo territorial nacional, que destacam-se, há muito tempo, por sua elevada importância na região Nordeste do Brasil, sobretudo no meio rural (CAMPOS e CAMPOS, 2013). Essa assertiva pode ser confirmada pelo evidente crescimento do rebanho nesta região, onde foi observado um aumento de 18,38% no efetivo de caprinos, que passou de 6,4 milhões para 7,6 milhões de cabeças, entre os anos de 2006 e 2017. Do mesmo modo, no caso dos ovinos, a região Nordeste foi a única do país a ter crescimento de rebanho neste período, passando de 7,7 milhões de animais para cerca de 9 milhões, representando um crescimento de 15,94% (IBGE, 2017).

Ainda de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na região nordeste, estão concentrados 93,2% dos caprinos e 64,2% dos ovinos existentes no país (IBGE, 2019). Dados relativos a 2017 evidenciam que os efetivos de ovinos e caprinos, no Nordeste, se encontram dispersos, principalmente, nos estados da Bahia, Pernambuco,

Piauí, Ceará Paraíba, Rio Grande do Norte e Maranhão (3,71% do efetivo caprino e 1,54% do efetivo ovino nacional), seguidos por Alagoas e Sergipe (IBGE, 2017).

O importante significado socioecon mico da ovinocaprinocultura no nordeste brasileiro está relacionado ao fato de ser uma boa alternativa de atividade de produção, tendo em vista as adversidades climáticas encontradas nessa região. Nesse sentido, convém destacar a elevada tolerância dos ovinos e caprinos às altas temperaturas e a combinação adequada entre os seus hábitos alimentares e a flora existente. Além disso, as vantagens representadas pelos reduzidos investimentos necessários ao criatório, em comparação com outras atividades, e o papel destacado que a atividade desempenha no meio rural no suprimento alimentar e na geração de renda, com origem na comercialização da carne, da pele e de subprodutos, são fatores que tornam atraente a criação de pequenos ruminantes (CAMPOS e CAMPOS, 2013; EMBRAPA, 2017).

Entretanto, apesar de apresentar grande parte do rebanho efetivo do país, a maioria das criações de pequenos ruminantes, na região Nordeste, ainda é desenvolvida sob as formas extensiva ou ultraextensiva, que tem como características principais: baixa ou nenhuma tecnologia; rebanho formado por animais sem raça definida ou de raças nativas; alimentação deficiente; manejo sanitário, nutricional e reprodutivo inadequado, o que resulta em baixos índices de produtividade e, conseqüentemente, resultados econ mico-financeiros insatisfatórios (AQUINO et al., 2016). Contudo, mesmo diante desses entraves, a ovinocaprinocultura é um dos segmentos da pec  ria nacional com grande potencial de crescimento, devido ao aumento pelo interesse de vários criadores na atividade, que não necessita de grandes extensões de área para criação dos animais (ROCHA et al., 2009).

## **2.2 A ovinocaprinocultura no Maranhão**

Os rebanhos maranhenses de caprinos e ovinos concentram-se nas mesorregiões Leste, Norte e Oeste do Estado, detendo aproximadamente 80% do rebanho total do Estado (IBGE, 2017). Da mesorregião Leste, a microrregião do Baixo Parnaíba, que inclui onze municípios, apresentou um quantitativo de 49.417 caprinos e 4.921 ovinos na última Pesquisa da Pecuária Municipal, divulgada pelo IBGE (IBGE, 2017).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicaram que o efetivo do rebanho caprino no estado do Maranhão, em 2017, era de 359.757 cabeças, ocupando a 7  pos  o no ranking nacional de efetivo de rebanho caprino, precedido por outros estados do Nordeste, como Bahia, Pernambuco, Piauí, Ceará, Paraíba e Rio Grande do

Norte, respectivamente. Já o efetivo de ovinos no estado, no mesmo período, era de 292.217 cabeças, dando ao Maranhão a 12ª posição no ranking nacional de efetivo do rebanho ovino (IBGE, 2019)

O Estado do Maranhão conta com diversos fatores propícios para a consolidação da ovinocaprinocultura, tais como boas condições edafoclimáticas, produção constante de alimentos para consumo animal, aptidão e tradição na bovinocultura, o que permite a criação consorciada de espécies, aliado ao interesse dos produtores familiares e empresários, bem como articulação de instituições públicas e privadas. Além disso, as características inerentes às espécies caprina e ovina, como docilidade, porte pequeno e relativa rusticidade, favorecem a sua exploração, que pode ser feita utilizando mão-de obra familiar e instalações pequenas, simples e de baixo custo (BANDEIRA, 2005).

### **2.3 Babesiose: definição, etiologia e classificação**

A babesiose é uma doença parasitária causada por espécies de *Babesia*, protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, subordem Piroplasmidea e família Babesiidae, que infectam eritrócitos de mamíferos domésticos e selvagens (BEUGNET e MOREAU, 2015). Trata-se de uma das doenças infecciosas transmitidas por carrapatos mais importantes em todo o mundo e apresenta desafios diagnósticos e terapêuticos significativos para médicos veterinários, além de gerar perdas que incluem mortalidade, diminuição de produção, custos com cuidados médico-veterinários e controle de carrapatos (LEMPEREUR et al., 2017).

Descrita pela primeira vez em bovinos e ovinos no ano de 1888 pelo bacteriologista romeno Victor Babes, que identificou o protozoário como o causador de uma doença endêmica que cursava com febre, prostração, anemia, icterícia, sintomatologia nervosa e morte, atualmente a doença representa um problema crescente em todo o mundo devido à expansão dos *habitats* dos carrapatos e ao aumento da mobilidade dos animais, que promovem a disseminação de parasitas para novas áreas geográficas (BEUGNET e MOREAU, 2015).

Até o presente momento, são conhecidas mais de 100 espécies de *Babesia*, as quais são consideradas muito específicas e, portanto, não podem infectar uma ampla gama de hospedeiros. Em ruminantes, as espécies relacionadas às infecções são *B. bigemina*, *B. major*, *B. divergens*, *B. bovis* e *B. motasi*, sendo estas duas últimas encontradas também em ovinos (BEUGNET e MOREAU, 2015). Embora tanto os membros da família Theileriidae quanto Babesiidae possam ser chamados de piroplasmas, causando a piroplasmose, o fato de as

espécies de *Babesia* invadirem somente eritrócitos as difere da família Theileriidae (*Theileria* e *Cytauxzoon*), cujos membros também podem infectar leucócitos e células endoteliais dos vasos sanguíneos (BEUGNET e MOREAU, 2015).

Com relação à classificação, tradicionalmente, o gênero *Babesia* foi organizado com base em sua morfologia, especificidade hospedeiro/vetor e suscetibilidade a drogas/medicamentos (LEVINE, 1985). De maneira pragmática, os parasitos foram divididos em dois grupos, de acordo com o tamanho do merozoíto: o grupo das pequenas babesias, que engloba trofozoítos de 1,0–2,5  $\mu\text{m}$  (a exemplo, *B. gibsoni*, *B. microti* e *B. rodhaini*) e o grupo das grandes babesias, de 2,5–5,0  $\mu\text{m}$  (como, por exemplo, *B. bovis*, *B. caballi* e *B. canis*) (SÁ et al., 2006). Quanto à forma, os parasitos podem apresentar-se nos formatos piriformes, redondos, ovais, alongados ou ameboides (ALMOSNY, 2002).

Esta classificação morfológica é geralmente consistente com a caracterização filogenética baseada nas sequências do gene da subunidade pequena nuclear do RNA ribossômico (18S rRNA), que evidencia que as grande e pequena babesia caem em dois agrupamentos filogenéticos, com esta última sendo mais intimamente relacionada a *Theileria* spp. (com exceção de *B. divergens*, que é morfolologicamente pequena [0,4-1,5  $\mu\text{m}$ ], porém é geneticamente mais próxima do grupo da grande babesia) (BEUGNET e MOREAU, 2015).

Avanços na biologia molecular, representados principalmente pelas análises genéticas moleculares, têm resultado na descoberta de novas espécies de *Babesia* ou novos grupos. Assim, foi proposta uma nova classificação para agrupamento dos piroplasmas, na qual estes deveriam ser divididos em cinco clados, sendo: (1) o grupo *B. microti*, contendo *B. rodhaini*, *B. felis*, *B. leo*, *B. microti* e isolados semelhantes a *B. microti*; (2) o grupo semelhante a *Theileria* do oeste dos Estados Unidos (EUA), contendo *B. conradae*; (3) o grupo *Theileria*, contendo todas as espécies de *Theileria* que afetam ruminantes; (4) o grupo *Babesia* spp. sensu stricto incluindo espécies de *Babesia* que afetam carnívoros, como *B. canis* e *B. gibsoni*; e, por fim, (5) um segundo grupo *Babesia* spp. sensu stricto composto principalmente por *Babesia* spp. que afetam ungulados, como *B. divergens*, *B. odocoilei*, *B. bigemina*, *B. ovis* e *B. bovis* em ruminantes e *B. caballi* em cavalos (BEUGNET e MOREAU, 2015).

## 2.4 Ciclo de vida e Transmissão

A babesiose tem se tornado um problema crescente em todo o mundo devido à expansão dos *habitats* dos carrapatos para novas áreas geográficas, decorrentes das grandes mudanças climáticas e ambientais (ANTUNES et al., 2017). O papel destes como vetores dos

parasitas foi descoberto por Smith e Kilbourne em 1893, que foram os primeiros a demonstrar a transmissão de um agente da doença por artrópodes (SMITH e KILBOURNE, 1893).

Desde então, numerosas espécies de carrapatos ixodídeos têm sido listadas como vetores na literatura. Atualmente, existem 22 espécies de carrapatos confirmadas como vetores de 18 espécies de *Babesia* que infectam animais de produção, de companhia ou humanos (GRAY, ESTRADA-PEÑA e ZINTL, 2018). Nesse contexto, todo o gênero ixodídeo está representado, com a notável exceção de *Amblyomma*. Na América do Sul, os carrapatos do antigo gênero *Boophilus* e, agora, *Rhipicephalus*, são todos vetores de *Babesia* spp. *Rhipicephalus microplus* é evidentemente uma espécie de origem asiática, mas agora também coloniza a América Central e do Sul e partes da África (MADDER et al., 2011).

Um ponto importante a ser destacado é que a maioria das espécies de carrapatos transmite apenas uma espécie de *Babesia* economicamente ou clinicamente importante, e a maioria das espécies de *Babesia* spp. são transmitidas por relativamente poucas espécies de carrapatos (com exceção de *B. caballi*, a causa da babesiose equina, que possui 7 vetores confirmados). Embora os humanos possam ser hospedeiros acidentais de carrapatos ixodídeos (ESTRADA-PEÑA e JONGEJAN, 1999), muito poucas espécies (todas elas do gênero *Ixodes*) transmitem espécies zoonóticas de *Babesia* spp.. Trinta associações adicionais de babesia-vetor, com credibilidade de transmissão epidemiológica, mas sem confirmação, foram relatadas (GRAY, ESTRADA-PEÑA e ZINTL, 2018).

O conhecimento acerca dos eventos relacionados à transmissão de parasitas do gênero *Babesia* de e para hospedeiros vertebrados por carrapatos ixodídeos têm sido bastante discutido na literatura ao longo do tempo (PETNEY, 1977; MEHLHORN e SCHEIN, 1985; RIZZOLI et al., 2014). No geral, acredita-se que ocorra o desenvolvimento de estágios sexuais na corrente sanguínea dos vertebrados e a formação de zigotos no intestino do vetor, seguidos por fissão múltipla em vários tecidos do carrapato, culminando no desenvolvimento de estágios infecciosos nas glândulas salivares (GRAY, ESTRADA-PEÑA e ZINTL, 2018).

A maioria das espécies de *Babesia* pode invadir os ovários do carrapato e persistir nas larvas resultantes, de modo que a infecção é transmitida verticalmente (transmissão transovariana), exceto no caso de *B. microti*, na qual este tipo de transmissão não ocorre (GRAY et al., 2010). Nesse caso específico, os parasitas são adquiridos dos hospedeiros por larvas ou ninfas e podem ser transmitidos apenas via transestadial. Para as espécies de *Babesia* nas quais ocorre a transmissão transovariana, há muito se afirma que a infecção pode ser adquirida apenas por carrapatos fêmeas. Entretanto, várias espécies de carrapatos, nos

estágios imaturos, se alimentam nos hospedeiros de *Babesia* e, portanto, em princípio, têm a oportunidade de adquirir infecções (GRAY, ESTRADA-PEÑA e ZINTL, 2018).

Embora a sobrevivência transestadial ocorra na maioria das espécies de *Babesia* spp., nem todos os estágios podem transmitir o parasita. Por exemplo, apenas larvas transmitem *B. bovis*, enquanto a transmissão de *B. bigemina* não ocorre até os estágios ninfal e adulto. Em outros casos, os estágios imaturos não se alimentam de hospedeiros que são suscetíveis às espécies relevantes de *Babesia* (por exemplo, *Dermacentor reticulatus*, algumas espécies *Hyalomma* spp.). Em contraste, muitas espécies do parasita (*B. divergens*, *B. major*, *B. ovata*, *B. motasi*, *B. rossi*, *B. vogeli*, *B. venatorum*) podem aparentemente persistir do estágio larval para o adulto de seus vetores por pelo menos uma geração sem reinfecção (GRAY, ESTRADA-PEÑA e ZINTL, 2018).

De modo sucinto, o ciclo de vida de *Babesia* pode ser descrito da seguinte forma: o hospedeiro vertebrado é infectado pelo esporozoíto infeccioso durante a alimentação do carrapato. Os esporozoítos invadem os eritrócitos do hospedeiro, onde se desenvolvem em trofozoítos. Os trofozoítos se dividem em merozoítos por meio do processo de merogonia (fissão binária), subsequentemente saem e reinfectam outros eritrócitos hospedeiros. A gamogonia (reprodução sexuada) é iniciada pelo compromisso sexual de merozoítos com gametócitos intraeritrocíticos, o estágio transitório que infecta o vetor do carrapato (hospedeiro definitivo). Os gametócitos que são absorvidos pelo lúmen do intestino do carrapato durante a alimentação se desenvolvem posteriormente em gametas. Os gametas de *Babesia*, conhecidos como corpos de raios ou Strahlenkörper, se fundem e criam um zigoto móvel denominado oocineto. O oocineto penetra na matriz peritrófica (membrana não celular semipermeável que envolve o lúmen do intestino médio do carrapato) e invade as células intestinais do carrapato (GRAY, ESTRADA-PEÑA e ZINTL, 2018; JALOVECKA et al., 2019).

Uma vez dentro do epitélio, o zigoto sofre divisão meiótica, resultando na produção de cinetos. Os cinetos se disseminam através do fluido corporal do carrapato (hemolinfa) aos tecidos periféricos, incluindo as células ovarianas. A invasão dos ovários do carrapato resulta na infecção dos ovos e leva à transmissão transovariana de *Babesia*. Paralelamente, os cinetos primários invadem outros órgãos do carrapato e, por meio da esquizogonia (fissão múltipla), se multiplicam para criar cinetos secundários que invadem as glândulas salivares do carrapato. Dentro das células das glândulas salivares, os cinetos invasores se desenvolvem em um sincício multinucleado (esporoblasto), que permanece dormente durante a ecdise do carrapato, garantindo a transmissão transestadial do parasita. Assim que o próximo instar do carrapato

infectado inicia a alimentação de sangue no hospedeiro, o esporoblasto é ativado e múltiplos esporozoítos infecciosos são produzidos continuamente pelo processo de esporogonia e liberados na corrente sanguínea do hospedeiro (GRAY, ESTRADA-PEÑA e ZINTL, 2018; JALOVECKA et al., 2019).

## 2.5 Epidemiologia

Os inquéritos epidemiológicos com o intuito de identificar espécies de *Babesia* em caprinos e ovinos têm sido realizados em diversas partes do mundo, sendo que o primeiro relato da infecção por *B. ovis* em um animal da espécie ovina foi feito por Delpy (1936).

Desde então, já foram publicados diversos estudos que demonstram a ocorrência de diferentes espécies de *Babesia* acometendo caprinos e ovinos. Nesses animais, já foi descrita a infecção por *B. motasi*, *B. ovis*, *B. taylori* e *B. foliate* (WENYON, 1926; SARWAR 1935; RAY e RAGHAVACHARI, 1941; UILENBERG, 2001). Além destas, outras espécies já foram diagnosticadas, como *B. crassa* (HASHEMI-FESHARKI e UILENBERG, 1981), *Babesia* (Lintan) (GUAN et al. 2008) e *Babesia* sp. Mymensingh (SIVAKUMAR et al., 2020).

Das espécies citadas acima, *B. ovis* é, de longe, a mais patogênica para ovelhas e cabras, enquanto as outras duas espécies mais comumente encontradas, *B. crassa* e *B. motasi*, não são ou são menos patogênicas do que *B. ovis* (UILENBERG, 2001). A babesiose causada por *B. ovis* ocorre na América do Sul e é considerada endêmica no sul da Europa, África, Oriente Médio e Ásia (MEHLHORN e SCHEIN, 1985; AHMED et al., 2002; SCHNITTGER et al., 2012). Possivelmente por essa razão, a grande maioria dos estudos recentes em pequenos ruminantes se concentra em países como a Grécia (CHALIGIANNIS et al., 2018), Turquia (BENEDICTO et al., 2020), Portugal (HORTA et al., 2014), Sudão (LEE et al., 2018), Irã (HAKIMI et al., 2019) e em outros onde a doença apresenta grande relevância devido às importantes perdas econômicas causadas (MIRA et al., 2020).

No Brasil, grande parte das pesquisas têm investigado a ocorrência de *Babesia* sp. em bovinos e animais de companhia, sendo o estudo em caprinos e ovinos considerado escasso (MONGRUEL et al., 2020). Em cães, existem relatos da infecção por *B. vogeli* no Rio de Janeiro e em Minas Gerais (COSTA-JÚNIOR et al., 2009; PAULINO et al., 2018;). Em bovinos, *B. bigemina* e *B. bovis* são as espécies comumente encontradas (HENKER et al., 2020; VANAZZI et al., 2020).



## 2.6 Patogenia e Sinais clínicos

A sucessão de eventos relacionados à infecção por *Babesia* spp. tem início após a penetração da célula pelo parasita, que se multiplica repetidas vezes via fissão binária dentro do eritrócito, resultando em até 16 merozoítos. O processo de multiplicação dos parasitas danifica a membrana celular dos eritrócitos, causando aumento da fragilidade osmótica e subsequente hemólise intravascular e extravascular. As vias indiretas de destruição celular também são importantes contribuintes para a patogenicidade da anemia induzida por *Babesia*, que é a síndrome clínica predominante decorrente da infecção. Presume-se que a anemia hemolítica imunomediada ocorre com todas as espécies de *Babesia* spp. após a produção de anticorpos anti-membrana eritrocitária (HUNFELD, HILDEBRANDT e GRAY, 2008). *Babesia* spp. ativam a destruição citotóxica de eritrócitos mediada por anticorpos, levando à anemia, hemoglobinemia, hemoglobinúria, trombocitopenia e, em casos de infecção maciça, morte por síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (CHAUVIN et al., 2009). Além disso, a hipóxia tecidual é encontrada na babesiose severa em cães e ruminantes, afetando particularmente o sistema nervoso central, rins e músculos (BEUGNET e MOREAU, 2015).

O quadro clínico é bastante semelhante para todas as infecções por *Babesia*. Os sinais clínicos dependem da virulência da espécie do parasita e da cepa envolvida, do estado imunológico e fisiológico do hospedeiro e da infecção ou doença concomitante (LEMPEREUR et al., 2017). As espécies de *Babesia* possuem graus variáveis de virulência, com algumas espécies capazes de causar doenças graves, enquanto outras induzem apenas doenças leves a moderadas. No geral, os hospedeiros infectados podem apresentar febre de início agudo e letargia, e a doença pode progredir para falência orgânica fatal grave (SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2011; MOSQUEDA et al., 2012).

Em pequenos ruminantes, as infecções normalmente se manifestam como subclínicas. Porém, três espécies morfológicamente diferentes, *B. ovis*, *B. motasi* e *B. crassa*, afetam severamente ovelhas e cabras, e os animais podem apresentar sintomas como febre, anemia, icterícia, emagrecimento, hemoglobinúria e morte (RANJBAR-BAHADORI et al., 2012). Em animais que sobrevivem à doença aguda, pode se instalar o estado de portador crônico, no qual o animal não manifesta anormalidades clínicas, uma condição que está associada à queda na produção e perdas econômicas em longo prazo (BILGIC et al., 2017). Além disso, os animais portadores assintomáticos são importantes reservatórios para a transmissão de patógenos por meio da alimentação de larvas, ninfas e/ou carrapatos adultos (SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2011).

## 2.7 Métodos de diagnóstico

A suspeita inicial de babesiose é feita com base em dados epidemiológicos e achados clínicos (BEUGNET e MOREAU, 2015). Atualmente, os principais métodos utilizados para a detecção de *Babesia* spp. para fins de diagnóstico, bem como estudos epidemiológicos envolvendo seus hospedeiros vertebrados e vetores artrópodes, são o exame microscópico, detecção molecular, cultura *in vitro* e xenodiagnóstico (LEMPEREUR et al., 2017).

O exame microscópico de esfregaços sanguíneos para detecção de *Babesia* ainda é considerado uma importante ferramenta para diagnóstico do agente. Ainda que seja considerada barata, de fácil realização e esteja prontamente disponível em todos os laboratórios padrão e, possivelmente, até mesmo no campo para a detecção de casos agudos, a realização desta técnica apresenta alguns entraves representados pela experiência do examinador, que influencia diretamente na sensibilidade e especificidade da identificação do parasita. Além disso, a presença de muitos artefatos produzidos por este método atrapalham a identificação do protozoário, sobretudo quando este encontra-se fora da célula hospedeira, e em infecções subclínicas ou latentes, os parasitas podem não ser observados devido à baixa parasitemia (LEMPEREUR et al., 2017).

Os métodos de diagnóstico molecular têm sido cada vez mais empregados para o diagnóstico da babesiose. Vários ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencionais e em tempo real foram descritos para a detecção de *Babesia* spp. em hospedeiros vertebrados e carrapatos. Essas técnicas são mais sensíveis do que a microscopia (WANG et al., 2015) e têm sido bastante utilizadas para fins diagnósticos ou para estudos epidemiológicos da distribuição de uma determinada espécie de *Babesia*, além de que, dependendo do alvo e do tamanho do gene, podem permitir a identificação em nível de gênero ou espécie e ou análise filogenética (LEMPEREUR et al., 2017).

Métodos moleculares alternativos incluem *Reverse line blot*, que permite a triagem simultânea de um grande número de patógenos usando hibridização de sonda (HURTADO, 2015) e métodos modernos de triagem de alto rendimento, como o sistema microfluídico de PCR em tempo real (Fluidigm) (MICHELET et al., 2014) e sequenciamento da próxima geração (BONNET et al., 2014).

Outro método diagnóstico que pode ser utilizado é a cultura do parasito *in vitro*. Entretanto, devido ao uso generalizado de ferramentas moleculares, os métodos tradicionais, incluindo a cultura *in vitro*, são usados com menos frequência nas pesquisas atuais. Pode-se argumentar, entretanto, que sem informações detalhadas sobre a biologia do parasita e sua

interação com o hospedeiro, os dados moleculares são de uso limitado. A pesquisa baseada em cultura de células é uma ferramenta importante para obter essas informações, por permitir uma fácil manipulação das condições e por reduzir a necessidade de experimentação animal (LEMPEREUR et al., 2017).

O xenodiagnóstico utilizando inoculação animal é usado, em raras situações, para auxiliar no diagnóstico de casos humanos, embora, em comparação com os métodos moleculares, o procedimento seja demorado, caro e questionável por razões éticas. Entretanto, pesquisas recentes se utilizaram deste método para auxiliar na identificação de agentes zoonóticos recém-descobertos, como *Babesia venatorum* e *Babesia Duncani*, isolando os parasitas em camundongos SCID e *hamsters*, respectivamente (CONRAD et al., 2006; JIANG et al., 2015).

Por fim, é importante mencionar os métodos sorológicos para diagnóstico da babesiose, que são considerados ferramentas essenciais para estudos epidemiológicos e para avaliação de medidas preventivas, por exemplo, vacinação, prevenção e controle de carrapatos (GUAN et al., 2010).

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) fornece um resultado quantitativo, é mais sensível e não subjetivo, pode ser automatizado para alto rendimento e é facilmente padronizado, em comparação com o Teste de Fixação do Complemento (CFT) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (TENTER e FRIEDHOFF, 1986; GUAN et al., 2010). Assim, levando em consideração essas características, vários protocolos de ELISA foram desenvolvidos para o diagnóstico da infecção por *Babesia* spp. (IKADAI et al., 2000; GOFF et al., 2003).

Entretanto, poucos estudos têm como foco o desenvolvimento de técnicas sorológicas de rotina simples, rápidas e estáveis para detectar babesiose em caprinos e ovinos. Nessas espécies, a importância da sorologia é prejudicada pelo fato de que os anticorpos não podem ser detectados em portadores de longo prazo e a presença de piroplasmas e reatividade cruzada de anticorpos contra outras espécies pode levar a resultados falsos positivos. Por isso, a grande maioria das pesquisas utiliza técnicas de biologia molecular, sobretudo a PCR, para o diagnóstico da infecção nessas espécies animais (GUAN et al., 2010).

## 2.8 Diversidade Genética

O avanço das técnicas moleculares têm permitido a caracterização genotípica e têm se mostrado muito úteis para a identificação e classificação de muitas espécies de hemoparasitas

do gênero *Babesia* (MIRA et al., 2020). Um amplo ensaio de PCR do gene 18S rRNA, seguido por sequenciamento parcial, foi usado com sucesso para identificar e classificar vários piroplasmas anteriormente desconhecidos, como os parasitas dos grupos *Babesia* e *Theileria* (RANJBAR-BAHADORI et al., 2012).

Ainda que outros alvos moleculares também sejam utilizados (como, por exemplo, os genes HSP70, ITS1, CCTeta, Ema-1 e Tams), o gene 18S rRNA é, de longe, o gene alvo mais comumente usado nos estudos (BENEDICTO et al., 2020; MIRA et al., 2020). A utilização frequente de genes de RNA nuclear ribossômico como alvos para identificação de espécies (ALLSOPP e ALLSOPP, 2006; CHALIGIANNIS et al., 2018) se deve à sua natureza conservada e arranjo repetitivo dentro do genoma, que fornecem grandes quantidades de DNA molde para a PCR. Embora um alto grau de conservação da sequência deste gene tenha sido relatado entre as espécies de *Babesia* e *Theileria*, tem sido recomendada amplificação completa do gene 18S, particularmente ao lidar com novos organismos a fim de garantir que a variação genética não seja esquecida (HERWALDT et al., 2003; HUNFELD, HILDEBRANDT e GRAY, 2008; BHOORA et al. 2009).

Variações genéticas intra e interespecies e relações evolutivas dentro de gêneros de piroplasmas também foram caracterizadas usando as sequências do gene 18S rRNA, especialmente no caso daqueles que causam doenças humanas e animais (JALALI et al., 2014; VANSTREELS et al., 2015). A realização dessas análises, além de fornecer informações importantes sobre a diversidade genética dos parasitos, sua distribuição e comportamento em determinada população, contribui para os estudos de desenvolvimento de vacinas, visto que é imprescindível conhecer as cepas do parasito que ocorrem em determinada região, pois o desenvolvimento de uma vacina viva atenuada baseada em uma única cepa pode não proteger contra desafios de outras cepas que ocorram em uma determinada população (MIRA et al., 2020).

No Brasil, os estudos sobre detecção e diversidade genética de espécies de *Babesia* têm sido realizados em bovinos (DE SOUZA et al., 2018; VIEIRA et al., 2019), animais silvestres (ANDRÉ et al., 2011) e equídeos (BRAGA et al., 2017). Em pequenos ruminantes, até o momento, não foram encontrados registros na literatura.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Detectar e identificar *Babesia* spp. em ovinos e caprinos da microrregião do Baixo Parnaíba, região leste do Maranhão, através de ensaios de PCR, e determinar suas relações filogenéticas com espécies relacionadas com base na análise da sequência do gene 18S rRNA.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar a detecção direta de formas evolutivas de *Babesia* spp. em esfregaços sanguíneos;
- Detectar DNA de *Babesia* spp. em amostras de sangue por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Avaliar a diversidade genética de *Babesia* spp. por meio do sequenciamento do gene 18S rRNA.

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

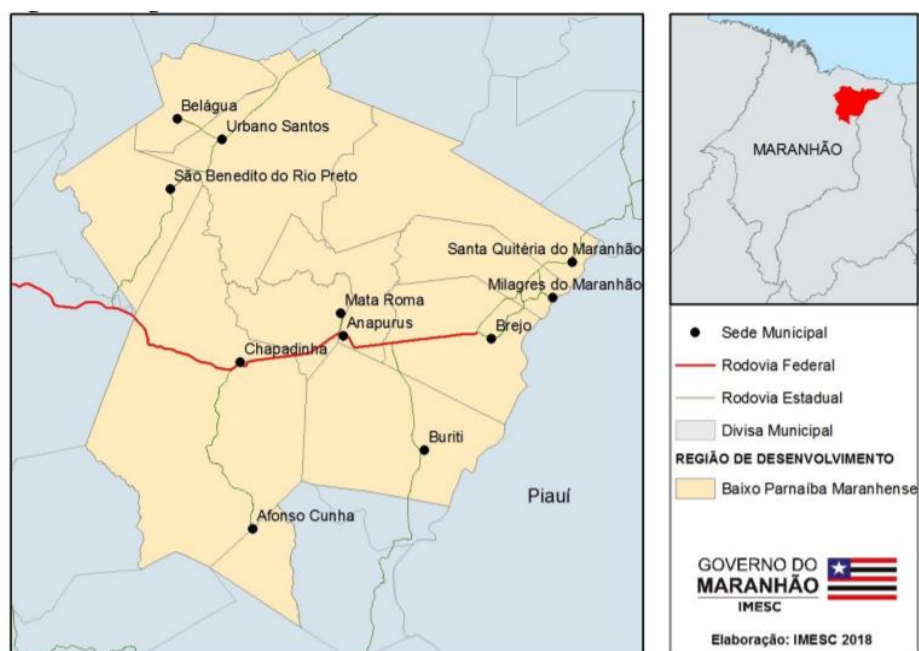
#### 4.1 Considerações éticas

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (CEEa-UEMA) com protocolo de número 019/2019.

#### 4.2 Local de Estudo

A pesquisa foi realizada em amostragem colhida de pequenos ruminantes da região do Baixo Parnaíba Maranhense (Figura 1), situada no Nordeste da Mesorregião Leste do Maranhão e formada por onze municípios, a saber: Afonso Cunha, Anapurus, Belágua, Brejo, Buriti, Chapadinha, Mata Roma, Milagres do Maranhão, Santa Quitéria do Maranhão, São Benedito do Rio Preto e Urbano Santos. Possui uma área total de 12.600,342 km<sup>2</sup>, apresenta clima úmido seco, com chuvas mal distribuídas e muito irregulares ao longo do ano; é drenada pelos rios que se desenvolvem na bacia do Alto Munim e do Parnaíba (IMESC, 2018).

**Figura 1.** Região de Desenvolvimento do Baixo Parnaíba Maranhense.



Fonte: IMESC - Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos (2018).

### 4.3 Animais e Coleta de Amostras

Neste estudo, foram coletadas amostras de sangue de pequenos ruminantes de sete (7) propriedades, sendo quatro (4) localizadas no município de Chapadinha, uma (1) em Anapurus, uma (1) em Brejo e uma (1) em Mata Roma, totalizando 161 animais, sendo 91 da espécie caprina e 70 da espécie ovina. As coletas foram realizadas entre os meses de novembro e dezembro de 2019.

Os animais incluídos no estudo eram mestiços ou sem raça definida, com idade variando entre 3 meses a 6 anos, e não apresentavam manifestações clínicas aparentes de hemoparasitoses no momento da colheita das amostras.

Foram coletados 8 mL de sangue da veia jugular de cada animal, utilizando-se seringas e agulhas descartáveis, os quais foram acondicionados em tubos esterilizados contendo anticoagulante universal EDTA, devidamente identificados e armazenados para posteriores análises laboratoriais. Concomitante ao procedimento de obtenção de amostras, foram realizados esfregaços sanguíneos e colhidas informações relacionadas aos animais, como idade, sexo e sanidade, incluindo histórico de abortamentos, nascimentos de crias fracas e/ou natimortos, dentre outras informações.

#### 4.4 Detecção direta por meio de microscopia

O exame direto, para detecção e identificação de *Babesia* spp. em amostras de sangue de caprinos e ovinos, foi realizado por meio da utilização de sangue venoso, com o qual foram confeccionados esfregaços sanguíneos finos, de acordo com o protocolo padrão descrito por Benjamin (2005). As lâminas foram deixadas para secar ao ar antes de serem fixadas com metanol absoluto. Posteriormente, os esfregaços fixos foram corados com solução de Giemsa e examinados em microscópio óptico, com uso de óleo de imersão (KESSLER e SCHENK, 1998). *Babesia* spp. foram identificadas com base em sua morfologia (BOWMANN, 2009).

#### 4.5 Extração de DNA

Para a extração de DNA a partir de amostras de sangue total e dos carrapatos coletados, foi utilizado o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do DNA extraído foi avaliada e determinada através de leitura em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, San Jose CA, USA).

#### 4.6 Análises moleculares

##### 4.6.1 Detecção do gene endógeno *cyt b*

Com o intuito de verificar a qualidade da extração, a integridade do DNA obtido e/ou a presença de inibidores da reação, todas as amostras foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação da presença da região conservada do gene *cyt b* do DNA mitocondrial de vertebrados, utilizando os oligonucleotídeos previamente descritos por Steuber, Abdel-Rady e Clausen (2005), e que produzem um fragmento de 359 pares de base (Tabela 1). Cada reação teve um volume total de 12,5 µL, sendo: 6,25µL de PCR Master mix Promega® (Taqpolymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, buffer); 0,5 µL de cada *primer* (10pmol); 4,25 µL de água DNase e RNase free; e 1 µL de amostra de DNA extraído (250ng/reação). Foram utilizados controles positivo e negativo em cada reação. O protocolo de amplificação foi o seguinte: uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados na PCR convencional.

| Gene                        | Agentes/alvo       | Oligonucleotídeos (5'-3')                                                | Referência                           |
|-----------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>18SrRNA<br/>(146 pb)</b> | <i>Babesia</i> sp. | BABF: GCGATGGCCCATTTCAAGTTT<br>BABR: CGCCTGCTGCCTTCCTTAGA                | Theodoropoulos et al. (2006)         |
| <b>cyt b<br/>(359 pb)</b>   | <i>cyt b</i>       | Cyt b1: CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA<br>cyt b2: GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA | Steuber, Abdel-Rady e Clausen (2005) |

#### 4.6.2 Detecção de *Babesia* spp.

A amplificação do DNA de *Babesia* sp. foi realizada conforme a técnica descrita por Theodoropoulos et al. (2006), que tem como alvo um fragmento de 146 pb da sequência 18S rRNA de *Babesia* (Tabela 1). Cada reação teve um volume final de 25 µL, sendo: 1 µL de cada *primer* (10 pmol), 12,5 µL de PCR Master mix Promega® (Taqpolymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, buffer); 8,5 µL de água DNase e RNase free; e 2 µL de amostra de DNA extraído (500ng/reação). As condições de amplificação foram: 5 min a 95°C para a desnaturação inicial e, em seguida, a reação será repetida por 35 ciclos nas seguintes condições: 1 min de desnaturação a 95°C, 1 min de anelamento a 56°C e 1 min de extensão a 72°C seguindo por uma etapa de extensão final de 5 min a 72°C. Todas as amostras foram amplificadas contendo controles positivo e negativo.

#### 4.6.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos amplificados foram avaliados em gel de agarose a 1,5%, utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (1Kb DNA ladder Promega®), programação na cuba de eletroforese de 100V, 100 mA, 100W e 50 minutos de corrida. Após, os amplificados serão visualizados em transiluminador.

#### 4.6.4 Purificação, sequenciamento e análise filogenética dos produtos amplificados

Os produtos amplificados do gene 18S rRNA serão purificados utilizando-se o kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), de acordo com as recomendações dos fabricantes. A quantificação do DNA purificado será realizada por meio de leitura em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, San Jose CA, USA). Os produtos de PCR purificados foram serão sequenciados em ambas as



direções usando os mesmos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR (*forward* e *reverse*).

O sequenciamento será realizado de acordo com o método de terminação de cadeia de dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977) no sequenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). O sequenciamento será feito no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (CREBIO/FCAV/UNESP). As sequências de consenso serão obtidas através da análise das sequências *sense* e *antisense* usando o programa CAP3 (HUANG e MADAN, 1999). As comparações com as sequências depositadas no GenBank serão feitas usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica (BLASTn - usando parâmetros padrão) (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências do gene 18S rRNA serão alinhadas com sequências publicadas no GenBank usando Clustal/W (THOMPSON et al., 1994) e ajustadas em Bioedit v.7.0.5.3 (HALL, 1999). A inferência filogenética baseada no critério de máxima verossimilhança (ML) será inferida com RAxML-HPG BlackBox 7.6.3 (STAMATAKIS et al., 2008) por meio do CIPRES Science Gateway (MILLER et al., 2011). O critério de informação de Akaike (AIC) será usado no Mega 5.05 para identificar o modelo mais apropriado de substituição de nucleotídeos. A análise de Máxima Verossimilhança do alinhamento do 18S rRNA será feita pelo modelo GTRGAMMA+.

#### **4.7 Análise Estatística**

Os dados serão submetidos à análise descritiva, em que serão calculados os percentuais de positividade obtidos por cada método de diagnóstico. A análise estatística será feita com base no teste qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) e o teste Exato de Fisher, utilizando o programa GraphPad Prism (OSB Software®). Um valor  $p < 0,05$  será considerado estatisticamente significativo.

### **5 RESULTADOS**

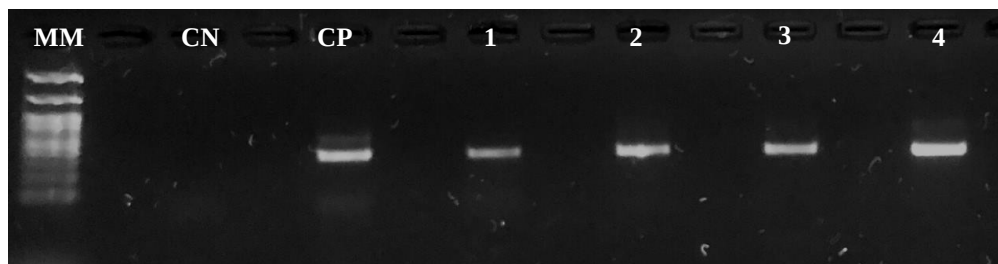
#### **5.1 Detecção de *Babesia* spp. em esfregaços sanguíneos**

Um total de 161 lâminas de esfregaços sanguíneos de caprinos e ovinos foram confeccionadas, sendo examinados 50 campos por lâmina, porém, não foram encontradas formas evolutivas de *Babesia* spp. em nenhum dos esfregaços analisados.

## 5.2 Diagnóstico molecular com base no gene 18S rRNA

Todas as 161 amostras de DNA de sangue foram submetidas à PCR para detecção do gene endógeno *cyt b* e mostraram amplificação positiva (Figura 2), evidenciando a qualidade e integridade do DNA extraído.

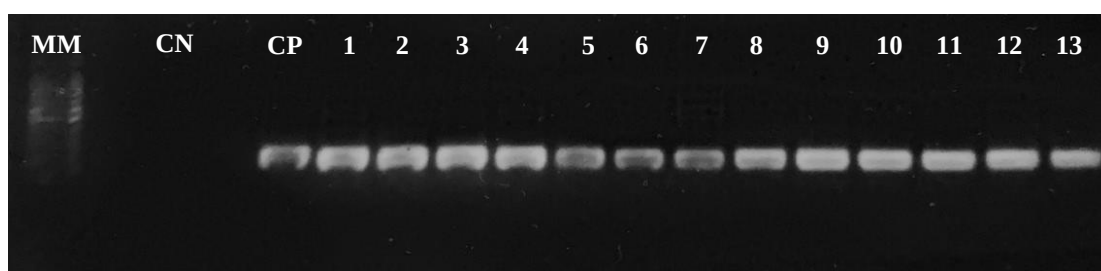
**Figura 2.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SybrSafe.



Legenda: Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para o gene endógeno *cyt b*. MM: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); CN: controle negativo; CP: controle positivo; Canaletas 1, 2, 3 e 4: amostra positivas.

Com relação à detecção de *Babesia* spp. nos animais do estudo, 64 amostras, sendo 41 de caprinos e 23 de ovinos, foram testadas para a presença do gene 18S rRNA do parasito e todas (64/64) mostraram amplificação positiva, como pode ser visto na Figura 3.

**Figura 3.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SybrSafe.



Legenda: Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para o gene 18S rRNA. MM: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); CN: controle negativo; CP: controle positivo de *Babesia bigemina*; Canaletas 1 a 13: amostras positivas.

## 6 DISCUSSÃO

No Brasil, até o presente momento, não existem relatos da infecção de pequenos ruminantes por espécies de *Babesia*. Deste modo, os achados deste estudo evidenciam, pela primeira vez, a detecção molecular de *Babesia* spp. em caprinos e ovinos no país.

No exame microscópico direto dos esfregaços sanguíneos, não foram encontradas formas evolutivas características de *Babesia* spp. nos animais amostrados. Este resultado pode estar relacionado ao grau de parasitemia no momento da colheita das amostras. Sabe-se que, nos casos de parasitemia baixa, a detecção do parasita é dificultada pela baixa sensibilidade da técnica, o que representa um fator limitante para a sua aplicação em estudos epidemiológicos (HILDEBRANDT et al., 2013). Por outro lado, o exame de esfregaços de sangue periférico fino ou obtidos de coletas seriadas pode melhorar as taxas de detecção (HILDEBRANDT et al., 2013); porém, essa alternativa não foi viável neste estudo.

Em trabalho recente realizado por Kage et al. (2019) com o intuito de avaliar a incidência de *Babesia* spp. em caprinos e ovinos por meio de técnicas de diagnóstico parasitológico, os autores encontraram positividade em apenas 8/225 (3,55%) dos ovinos e 1/118 (0,84%) dos caprinos do estudo. De maneira semelhante, Ozubek e Aktas (2017) detectaram o parasita em apenas 11/200 (5%) animais, ao passo que a PCR com base no gene 18S rRNA detectou o parasita em 31/200 (21,5%) dos animais analisados. Os autores de ambos os trabalhos argumentaram sobre a baixa sensibilidade da técnica de microscopia direta relacionada à parasitemia. É válido ressaltar que a alta parasitemia será observada durante o estágio agudo/clínico da doença, ao passo que a baixa parasitemia é uma característica do portador assintomático ou em estágio crônico da doença (RANJBAR-BAHADORI et al., 2012).

A detecção molecular por meio da PCR, conforme observado neste estudo, sugere que a técnica é uma ferramenta de diagnóstico mais sensível quando comparada com a microscopia direta. Pesquisadores relataram que a PCR apresenta sensibilidade mais alta, uma vez que pode detectar animais com infecções precoces/subclínicas e portadores crônicos da infecção (BENEDICTO et al., 2020). Por isso, abordagens moleculares, incluindo a PCR e sequenciamento genético, têm sido efetivamente utilizadas para estudos epidemiológicos e análises filogenéticas de patógenos transmitidos por carrapatos (AYDIN et al., 2015). Neste estudo, a PCR foi usada para detectar o DNA de *Babesia* direcionado ao gene 18S rRNA.

Diversos estudos têm utilizado com sucesso ensaios de PCR deste gene, seguidos por sequenciamento parcial, para identificar e classificar parasitas pertencentes aos gêneros

*Babesia* e *Theileria*, cujas espécies ou variantes antes eram desconhecidas (RANJBAR-BAHADORI et al.; 2012; AYDIN et al. 2015; OZUBEK e AKTAS, 2017).

No nosso estudo, o fragmento alvo do gene 18S rRNA das espécies de *Babesia* foi amplificado em 64/64 (100%) animais testados. Theodoropoulos et al. (2006), utilizando as mesmas sequências de oligonucleotídeos, detectaram positividade em 19/124 (15%) animais, e o sequenciamento realizado posteriormente revelou que tratava-se de *B. ovis*.

Vale ressaltar que o produto amplificado constitui-se de 146 pares de base e é consistente com o alvo buscado pelos oligonucleotídeos iniciadores delineados para esse fim, conforme relatado por Theodoropoulos et al. (2006). Entretanto, para confirmação do resultado obtido nas reações de PCR, foi refeita a análise da região do produto amplificado em que o *primer* apresenta anelamento no programa BLAST a fim de garantir que o anelamento era específico do gene 18S rRNA de *Babesia* sp. e que não estava ocorrendo nenhum anelamento inespecífico (Figura 4). Adicionalmente, é importante destacar que o controle negativo da reação permaneceu negativo (Figura 3), conforme esperado, o que também nos dá garantias de que não houve qualquer contaminação por fragmentos de DNA inesperados.

**Figura 4.** Captura de tela do programa BLAST. Notar o percentual de similaridade elevado com a espécie *Babesia ovis*.

The screenshot displays the BLAST search results for the query YSHRNUE8016. The search was performed against the nt database. The results show a high degree of similarity with *Babesia ovis* sequences, with the top hit having a 100% identity and 100% coverage.

**Sequences producing significant alignments**

| Description                                                                  | Common Name  | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession  |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|------------|
| Babesia ovis from goat 18S ribosomal RNA gene, partial sequence              | Babesia ovis | 3088      | 3088        | 100%        | 0.0     | 100.00%    | 1672     | AY150058.1 |
| Babesia ovis 18S ribosomal RNA gene, complete sequence                       | Babesia ovis | 3057      | 3057        | 100%        | 0.0     | 99.64%     | 1698     | AY260178.1 |
| Babesia ovis isolate goat 2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence         | Babesia ovis | 3044      | 3044        | 100%        | 0.0     | 99.52%     | 1672     | DQ287954.1 |
| Babesia ovis 18S small subunit ribosomal RNA gene, complete sequence         | Babesia ovis | 3018      | 3018        | 100%        | 0.0     | 99.17%     | 1683     | AY533146.1 |
| Babesia ovis isolate 8kz1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence | Babesia ovis | 2780      | 2780        | 90%         | 0.0     | 99.67%     | 1521     | MN493112.1 |
| Babesia ovis isolate SEL38 18S ribosomal RNA gene, partial sequence          | Babesia ovis | 2772      | 2772        | 90%         | 0.0     | 99.67%     | 1517     | MG569902.1 |
| Babesia ovis isolate 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence              | Babesia ovis | 2747      | 2747        | 93%         | 0.0     | 98.28%     | 1572     | AY998123.1 |
| Babesia sp. isolate P34 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence   | Babesia sp.  | 2651      | 2651        | 86%         | 0.0     | 99.59%     | 1454     | MH618772.1 |

Trabalhos publicados recentemente têm identificado a presença de *B. ovis* em caprinos e ovinos de diversas regiões em todo o mundo. Benedicto et al. (2020) encontraram alta taxa de infecção por essa espécie em caprinos e ovinos oriundos da Turquia. Da mesma forma, Bazmani et al. (2018) detectaram positividade para *B. ovis* em pequenos ruminantes do Irã.

No Brasil, a maioria das pesquisas recentes sobre babesiose em animais de produção têm como foco a espécie bovina (DE SOUZA et al., 2018; VIEIRA et al., 2019), à exceção de Mongruel et al. (2020), que investigaram a pesquisa do parasita em pequenos ruminantes da região sudeste do país, mas não obtiveram resultados positivos para essa hemoparasitose. A carência de estudos em território nacional reforça a necessidade de se investigar essa hemoparasitose em caprinos e ovinos.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos por meio da PCR revelaram elevada positividade (64/64) para *Babesia* spp. nos animais do estudo, quando comparados ao exame microscópico de esfregaços sanguíneos. Entretanto, com o intuito de confirmar os resultados preliminares e caracterizar as espécies de *Babesia* detectadas nos animais, foram selecionadas 4 amostras, dentre as positivas, as quais foram enviadas para sequenciamento. As sequências obtidas serão submetidas ao GenBank e posteriormente analisadas. Os achados deste estudo podem contribuir para uma melhor compreensão da distribuição e diversidade filogenética de espécies de *Babesia* em pequenos ruminantes.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, J.; YIN, H.; SCHNITTGER, L.; JONGEJAN, F. Ticks and tick-borne diseases in Asia with special emphasis on China. **Parasitology Research**, v. 88, n. 1, p. S51-S55, 2002.
- AKTAS, M.; ALTAY, K.; DUMANLI, N. Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. **Veterinary parasitology**, v. 133, n. 4, p. 277-281, 2005.
- ALLSOPP, M.; ALLSOPP, B. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1081, p. 509–517, 2006.
- ALMOSNY, N. R. P. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. Rio de Janeiro: L. F. **Livros de Veterinária**, p. 58-87, 2002.
- ALTAY, K.; DUMANLI, N.; AKTAS, M. Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 161-165, 2007.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* v. 215, p. 403–410, 1990.
- ANDRE, M. R.; ADANIA, C. H.; HIDALGO, R.; TEIXEIRA, F.; LLEGRETTI, S. M.; MACHADO, R. Z. Molecular and serological detection of *Babesia* spp. in neotropical and exotic carnivores in brazilian zoos. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine. Yulee: Amer Assoc Zoo Veterinarians**, v. 42, n. 1, p. 139-143, 2011.
- ANTUNES, S.; ROSA, C.; COUTO, J.; FERROLHO, J.; DOMINGOS, A. Deciphering *Babesia*-vector interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 429, 2017.
- AQUINO, R. S.; LEMOS, C. G.; ALENCAR, C. A.; SILVA, E. G.; LIMA, R. S.; GOMES, J. A. F.; SILVA, A. F. A realidade da caprinocultura e ovinocultura no semiárido brasileiro: um retrato do sertão do Araripe, Pernambuco. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n. 4, p.271-281, 2016.
- AYDIN, M. F.; AKTAS, M.; DUMANLI, N. Molecular identification of *Theileria* and *Babesia* in ticks collected from sheep and goats in the Black Sea region of Turkey. **Parasitology Research**, v. 114, p. 65–69, 2015.
- BADAWI, N. M.; YOUSIF, A. A. *Babesia canis* spp. in dogs in Baghdad Province, Iraq: First molecular identification and clinical and epidemiological study, **Veterinary World**, v. 13, n. 3, p. 579, 2020.
- BANDEIRA, D. A. **Características sanitárias e de produção da caprinocultura nas microrregiões do Cariri do Estado da Paraíba**. 2005. 117f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.
- BENEDICTO, B.; CEYLAN, O.; MOUMOUNI, P. F. A.; LEE, S. H.; TUMWEBAZE, M. A.; LI, J.; GALON, E. M.; LIU, M.; LI, Y.; JI, S.; RINGO, A.; RIZK, M.; SEVINC, F.; XUAN, X. Molecular Detection and Assessment of Risk Factors for Tick-Borne Diseases in Sheep and Goats from Turkey. **Acta Parasitologica**, v. 65, n. 3, p. 723-732, 2020.

BENJAMIN, M. M. **Outline of veterinary clinical pathology**. III ed. New Delhi: Kalyani Publishers; 2005.

BEUGNET, F.; MOREAU, Y. Babesiosis. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 2, p. 627-639, 2015.

BHOORA, R.; FRANSSEN, L.; OOSTHUIZEN, M.; GUTHRIE, A.; ZWEYGARTH, E.; PENZHORN, B. L.; JONGEJAN, F.; COLLINS, N. E. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 112–120, 2009.

BILGIC, H. B.; BAKIRCI, S.; KOSE, O.; UNLU, A. H.; HACILARLIOGLU, S.; EREN, H.; KARAGENC, T. Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 211, 2017.

BONNET, S.; MICHELET, L.; MOUTAILLER, S.; CHEVAL, J.; HÉBERT, C.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; ELOIT, M. Identification of parasitic communities within European ticks using next- generation sequencing. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e2753, 2014.

BOWMANN, D. D. **George's parasitology for veterinarians**. 9th ed. Louis: Saunders Elsevier, St; 2009.

BRAGA, M. S. C. O.; COSTA, F. N.; GOMES, D. R. M.; XAVIER, D. R.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; FRESCHI, C. R.; MACHADO, R. Z. Diversidade genética de espécies de piroplasmídeos em equídeos na ilha de São Luís, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n.3, 2017.

CAMPOS, R. T.; CAMPOS, K. C. Diagnóstico técnico-econômico da ovinocaprinocultura no estado do Ceará. **Revista Teoria e Evidência Econômica**, v. 19, n. 40, 2013.

CHALIGIANNIS, I.; FERNÁNDEZ DE MERA, I. G.; PAPA, A.; SOTIRAKI, S.; DE LA FUENTE, J. Molecular identification of tick-borne pathogens in ticks collected from dogs and small ruminants from Greece. **Experimental and Applied Acarology**, v. 74, n. 4, p. 443-453, 2018.

CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. *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.

CONRAD, P. A.; KJEMTRUP, A. M.; CARRENO, R. A.; THOMFORD, J.; WAINWRIGHT, K.; EBERHARD, M.; QUICK, R.; TELFORD, S. R.; HERWALDT, B. L. Description of *Babesia duncani* n.sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasms. **International Journal of Parasitology**, v. 36, p. 779–789, 2006.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; RIBEIRO, M. F.; REMBECK, K.; RABELO, E. M.; ZÄHLER-RINDER, M.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 257-60, 2009.

DE SOUSA, K. C. M.; FERNANDES, M. P.; HERRERA, H. M.; FRESCHI, C. R.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 2, p. 245-253, 2018.

DELPY, R. L. P. Agents en Iran dans le sang des animaux domestiques. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, v. 29, p. 157–161, 1936.

EKICI, O. D.; SEVINC, F. Comparison of cELISA and IFA tests in the serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 10, p. 1188–1191, 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Ovinocultura e Caprinocultura Conjuntura econômica, aspectos produtivos de 2017 e perspectivas para 2018**. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. Sobral, CE, n. 2, dezembro de 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/>> Acesso em junho de 2020.

ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 685–715, 1999.

GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; REIS, F. A.; AGUIRRE, A. D. A. R.; BARROS, J. C.; MATIAS, J.; KOLLER, W. W. Contributions of the hair sheep breed Santa Ines as a maintenance host for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 515, 2014.

GOFF, W. L.; MCELWAIN, T. F.; SUAREZ, C. E.; JOHNSON, W. C.; BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis* infected cattle. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 38–43, 2003.

GRAY, J. S.; ESTRADA-PEÑA, A.; ZINTL, A. Vectors of Babesiosis. **Annual Review of Entomology**, v. 64, p. 149–165, 2018.

GRAY, J. S.; ZINTL, A.; HILDEBRANDT, A.; HUNFELD, K-P.; WEISS, L. Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, p. 3–10, 2010.

GUAN, G. Q.; CHAUVIN, A.; ROGNIAUX, H.; LUO, J. X.; YIN, H.; MOREAU, E. Merozoite proteins from *Babesia* sp. BQ1 (Lintan) as potential antigens for serodiagnosis by ELISA. **Parasitology**, v. 137, n. 6, p. 927–938, 2010.

GUAN, G.; CHAUVIN, A.; LUO, J.; INOUE, N.; MOREAU, E.; LIU, Z.; GAO, J.; THEKISOE, O. M.; MA, M.; LIU, A.; DANG, Z.; LIU, J.; REN, Q.; JIN, Y.; SUQIMOTO, C.; YIN, H. The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Babesia* spp. infective to sheep and goats in China. **Experimental parasitology**, v. 120, n. 1, p. 39–44, 2008.

HAKIMI, H.; SARANI, A.; TAKEDA, M.; KANEKO, O.; ASADA, M. Epidemiology, risk factors, and co-infection of vector-borne pathogens in goats from Sistan and Baluchestan province, Iran. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, p. 1–10, 2019.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, pp. 95–98, 1999.

HASHERNI-FESHARKI, R.; UILENBERG, G. *Babesia crassa* n. sp. (Sporozoa, Babesiidae) of domestic sheep in Iran. **Veterinary Quarterly**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 1981.

HENKER, L. C.; LORENZETT, M. P.; FAGUNDES-MOREIRA, R.; DALTO, A. G. C.; SONNE, L.; DRIEMEIER, D.; SOARES, J.F.; PAVARINI, S. P. Bovine abortion, stillbirth



and neonatal death associated with *Babesia bovis* and *Anaplasma* sp. infections in southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, p. 101443, 2020.

HERWALDT, B. L.; CACCIÒ, S.; GHERLINZONI, F.; ASPÖCK, H.; SLEMENDA, S. B.; PICCALUGA, P.; MARTINELLI, G.; EDELHOFER, R.; HOLLENSTEIN, U.; POLETTI, G.; PAMPIGLIONE, S.; LÖSCHENBERGER, K.; TURA, S.; PIENIAZEK, N. J. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 942–948, 2003.

HILDEBRANDT, A.; GRAY, J. S.; HUNFELD, K.P. Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. **Infection**, v. 41, p. 1057–1072, 2013.

HORTA, S.; BARRETO, M. C.; PEPE, A.; CAMPOS, J.; OLIVA, A. Highly sensitive method for diagnosis of subclinical *B. ovis* infection. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 902-906, 2014.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

HUNFELD, K. P.; HILDEBRANDT, A.; GRAY, J. S. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1219–1237, 2008.

HURTADO, A. Reverse line blot hybridization with species-specific oligonucleotide probes: Application to piroplasm detection. **Methods in Molecular Biology**, v. 1247, p. 183–192, 2015.

IBGE. **Estimativas da população residente no Brasil e unidades da Federação**. 2019. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv100923 .pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv100923.pdf)>. Acesso em: 22 jun. 2020.

IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal 2017**. Tabela 3939: efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho, 2008 a 2017. [Rio de Janeiro, 2017e]. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>. Acesso em: 22 jun. 2020.

IKADAI, H.; OSORIO, C. R.; XUAN, X. N.; IGARASHI, I.; KANEMARU, T.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. Detection of *Babesia caballi* infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant 48-kDa merozoites rhoptry protein. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 633–635, 2000.

INSTITUTO MARANHENSE DE ESTUDOS SOCIOECONÔMICOS E CARTOGRÁFICOS – IMESC. **Regiões de Desenvolvimento do Estado do Maranhão - Proposta Avançada**. 2018. Disponível em: < [https://seplan.ma.gov.br/files/2013/02/Proposta-IMESC\\_22-Regi%C3%B5es-de-Desenvolvimento-do-Estado-do-Maranh%C3%A3o-2018.pdf](https://seplan.ma.gov.br/files/2013/02/Proposta-IMESC_22-Regi%C3%B5es-de-Desenvolvimento-do-Estado-do-Maranh%C3%A3o-2018.pdf)>. Acesso em: 03 nov 2020.

JALALI, S. M.; KHAKI, Z.; KAZEMI, B.; RAHBARI, S.; SHAYAN, P.; BANDEHPOUR, M.; YASINI, S. P. Molecular detection and identification of *Theileria* species by PCR- RFLP method in sheep from Ahvaz, Southern Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 9, p. 99–106, 2014.

JALOVECKA, M.; SOJKA, D.; ASCENCIO, M; SCHNITTGER, L. Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 5, 2019.

JIANG, J. F.; ZHENG, Y. C.; JIANG, R. R.; LI H.; HUO, Q.; JIANG, B.; SUN, Y.; JIA, N.; WANG, Y.; MA, L.; LIU, H.; CHU, Y.; NI, X.; LIU, K.; SONG, Y.; YAO, N.; WNAG, H.; SUN, T.; CAO, W. Epidemiological, clinical, and laboratory characteristics of 48 cases of

“*Babesia venatorum*” infection in China: A descriptive study. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 15, p. 196–203, 2015.

KAGE, S.; MAMATHA, G. S.; LAKKUNDI, J. N.; SHIVASHANKAR, B. P.; D’SOUZA, P. E. Detection of incidence of *Babesia* spp. in sheep and goats by parasitological diagnostic techniques. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 43, n. 3, p. 452–457, 2019.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. Diagnóstico parasitológico da tristeza parasitária bovina. In: **CURSO SOBRE CONTROLE DO CARRAPATO EM BOVINOS**, 1998, Campo Grande. Compilação dos trabalhos apresentados. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998.

LEE, S. H.; MOSSAAD, E.; IBRAHIM, A. M.; ISMAIL, A. A.; ADJOU MOUMOUNI, P. F.; LIU, M.; RINGO, A. E.; GAO, Y.; GUO, H.; LI, J.; EFSTRATIOU, A.; MUSINGUZI, P.; ANGARA, T. E.E.; SUGANUMA, K.; INOUE, N.; XUAN, X. Detection and molecular characterization of tick-borne pathogens infecting sheep and goats in Blue Nile and West Kordofan states in Sudan. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 3, p. 598–604, 2018.

LEMPEREUR, L.; BECK, R.; FONSECA, I.; MARQUES, C.; DUARTE, A.; SANTOS, M.; ZÚQUETE, S.; GOMES, J.; WALDER, G.; DOMINGOS, A.; ANTUNES, S.; BANETH, G.; SILAGHI, C.; HOLMAN, P.; LEVINE, N. D. **Veterinary protozoology**. 1st edition. Iowa State University Press, Ames, p. 306–309, 1985.

MADDER, M.; THYS, E.; ACHI, L.; TOURÉ, A.; DE DEKEN, R. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a most successful invasive tick species in West-Africa. **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, p. 139–45, 2011.

MAGGI, R. G.; KRÄMER, F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 145, 2019.

MASON, K. L.; GONZALEZ, M. V.; CHUNG, C.; MOUSEL, M. R.; WHITE, S. N.; TAYLOR, J. B.; SCOLES, G. A. Validation of an improved *Anaplasma* antibody competitive ELISA for detection of *Anaplasma ovis* antibody in domestic sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 5, p. 763–766, 2017.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, p. 38–103, 1985.

MICHELET, L.; DELANNOY, S.; DEVILLERS, E.; UMHANG, G.; ASPAN, A.; JUREMALM, M.; CHIRICO, J.; VAN DER WAL, F. J.; SPRONG, H.; PIHL, T. P. B.; KLITGAARD, K.; BØDKER, R.; FACH, P.; MOUTAILLER, S. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. 103, 2014.

MIRA, A.; UNLU, A. H.; BILGIC, H. B.; BAKIRCI, S.; HACILARLIOGLU, S.; KARAGENC, T.; CARLETTI, T.; WEIR, W.; SHIELS, B.; SHKAP, V.; AKTAS, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SCHNITTGER, L. High genetic diversity and differentiation of the *Babesia ovis* population in Turkey. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 52, p. 26–35, 2020.

MONGRUEL, A. C. B.; SPANHOL, V. C.; VALENTE, J. D. M.; PORTO, P. P.; OGAWA, L.; OTOMURA, F. H.; MARQUEZ, E. S.; ANDRÉ, M. R.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. Survey of vector-borne and nematode parasites involved in the etiology of anemic syndrome in sheep from Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 29(3), p. e007320, 2020.

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

NADERI, A.; NAYEBZADEH, H.; GHOLAMI, S. Detection of Babesia infection among human, goats and sheep using microscopic and molecular methods in the city of Kuhdasht in Lorestan Province, West of Iran. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 3, p. 837-842, 2017.

OZUBEK, S.; AKTAS, M. Molecular evidence of a new *Babesia* sp. in goats. **Veterinary Parasitology**, v. 233, p. 1-8, 2017.

PAULINO, P. G.; PIRES, M. S.; SILVA, C. B.; PECKLE, M.; COSTA, R. L.; VITARI, G. L. V.; ABREU, A. P. M.; MASSAR, C. L.; SANTOS, H. A. Molecular epidemiology of *Babesia vogeli* in dogs from the southeastern region of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 13, p. 160-165, 2018.

PETNEY, T.N. Ecological implications of control strategies: arthropods of domestic and production animals. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 155–65, 1997.

RANJBAR-BAHADORI, S.; ECKERT, B.; OMIDIAN, Z.; SADR SHIRAZI, N.; SHAYAN, P. *Babesia ovis* as the main causative agent of sheep Babesiosis in Iran. **Parasitol Res**, v. 110, p. 1531–1536, 2012.

RAY, H. N.; RAGHAVACHARI, K. Observations on *Babesia foliata* n. sp. from a sheep. **Indian J Vet Sci**, v. 11, p. 239-242, 1941.

RIZZOLI, A.; SILAGHI, C.; OBIEGALA, A.; RUDOLF, I.; HUBÁLEK, Z.; FÖLDVÁRI, G.; PLANTARD, O.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BONNET, S.; ŠPITALSKÁ, E.; KAZIMÍROVÁ, M. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 251, 2014.

ROCHA, L. P.; FRAGA, A. B.; ARAÚJO FILHO, A. J. T.; FIGUEIRA, B. R. F.; PACHECO, K. M. G.; SILVA, A. F. L.; RODRIGUES, B. E. D. S. Desempenho de cordeiros cruzados em Alagoas, Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, p. 145-148, 2009.

SÁ, A. G.; CERQUEIRA, A. M. F.; O'DWYER, L. H.; MACIEIRA, D. B.; ABREU, F. S.; FERREIRA, R. F. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected Brazilian dogs. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 4, n. 2, p. 163-168, 2006.

SANGER, F.; NIKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA Sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, p. 5163–5169, 1977.

SARWAR, S. M. A hitherto undescribed piroplasm of goats (*Piroplasma taylori*). **Indian Jour Vet Sci and Anim Husb**, v. 5, p. 171-176, 1935.

SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A. E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; MORRISON, D. A. Babesia: a world emerging. *Infection*. **Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1788-1809, 2012.

SIVAKUMAR, T.; TUVSHINTULGA, B.; KOTHALAWALA, H.; SILVA, S. S. P.; LAN, D. T. B.; LONG, P. T.; YBAÑEZ, A. P.; YBAÑEZ, R. H. D.; BENITEZ, D. F.; TAYEBWA, D. S.; DE MACEDO, A. C. C.; SCHNITTGER, L.; YOKOYAMA, N. Host range and geographical distribution of *Babesia* sp. Mymensingh. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 5, 2020.

SMITH, T.; KILBOURNE, F. L. Investigations into the nature causation and prevention of Texas or southern cattle fever. **In Ninth Annual Report of the Bureau of Animal Industry for the Year 1892**. Washington, DC: Gov. Print. Off, 1893.

SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. Babesiosis in dogs and cats - Expanding parasitological and clinical spectra. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 48–60, 2011.

SOUZA, F. D. A. L.; LIARTE, A. D. S. C.; CASTRO, K. N. D. C.; BESERRA, E. E. A.; BERNARDI, J. C. M.; SOUSA, G. V. D.; SILVA, S. M. M. D. S. Dynamics of natural infection by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in dairy cattle from an enzootic instability area in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J.; RENNER, S. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. **Systematic Biology**, v. 57, n. 5, p. 758-771, 2008.

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P. H. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology Research**, v. 997, p. 247-254, 2005.

SUASSUNABEZERRA, A. D.; AHID, S. M. M.; DA SILVA VIEIRA, L.; SOARES, H. S. Ectoparasitos em caprinos e ovinos no município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 110-116, 2010.

TENTER, A. M.; FRIEDHOFF, K. T. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 20, p. 49–61, 1986.

THEODOROPOULOS, G.; GAZOULI, M.; IKONOMOPOULOS, J. A.; KANTZOURA, V.; KOMINAKIS, A. Determination of prevalence and risk factors of infection with *Babesia* in small ruminants from Greece by polymerase chain reaction amplification. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 99-104, 2006.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22 pp. 1673-4680, 1994.

UILENBERG, G. **Babesiosis. Encyclopaedia of Arthropod-transmitted Infections of Man and Domesticated Animals**. CABI, Wallingford, pp 53–60, 2001.

VANAZZI, D. L.; RIGO, T. C.; BALDASSO, N. D.; COLLET, S. G.; PRESTES, A. M.; BIONDO, N.; SAVARIS, T.; CAMILLO, G. Occurrence of *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in clinically affected cattle in western Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 21, 2020.

VANSTREELS, R. E.; WOEHLER, E. J.; RUOPPOLO, V.; VERTIGAN, P.; CARLILE, N.; PRIDDEL, D.; FINGER, A.; DANN, P.; HERRIN, K. V.; THOMPSON, P.; FERREIRA JUNIOR, F. C.; BRAGA, E. M.; HURTADO, R.; EPIPHANIO, S.; CATÃO-DIAS, J. L. Epidemiology and molecular phylogeny of *Babesia* sp. in Little Penguins *Eudyptula minor* in Australia. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 198–205, 2015.

VIEIRA, L. L.; CANEVER, M. F.; CARDOZO, L. L.; CARDOSO, C. P.; HERKENHOFF, M. E.; NETO, A. T.; COGEL, C. I. G.; MILETTI, L. C. Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina

state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. **Parasite epidemiology and control**, v. 6, p. e00114, 2019.

WANG, G.; VILLAFUERTE, P.; ZHUGE, J.; VISINTAINER, P.; WORMSER, G. P. Comparison of a quantitative PCR assay with peripheral blood smear examination for detection and quantitation of *Babesia microti* infection in humans. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, p. 109–113, 2015.

WENYON, C. M. Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists. **Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists.**, v. 2, 1926.

ZINTL, A. Guidelines for the Detection of *Babesia* and *Theileria* Parasites. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 51-65, 2017.