

ARTÍCULO ORIGINAL

Diagnóstico de *Babesia bovis* en búfalos de la región occidental de Cuba a través de un ensayo de nPCR

D. Obregón^I, Marcia Cristina de Sena Oliveira^{II}, Polyana Cristine Tizioto^{III},
Maribel Elizabeth Funnes^{IV}, Siomara Martínez^V, E. Roque^I, A. Henrique Fonseca^{VI},
Belkis Corona^V

^IUniversidad Agraria de La Habana (UNAH), Autopista Nacional y Carretera de Tapaste, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: dasiel@isch.edu.cu; ^{II}Embrapa. Pecuária Sudeste, São Carlos, Sao Paulo, Brasil;

^{III}Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil; ^{IV}Universidad de São Paulo, Sao Paulo, Brasil;

^VCentro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Correo electrónico: bcorona@censa.edu.cu; ^{VI}Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro, Brasil

RESUMEN: Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar si los búfalos en el Occidente de Cuba son portadores de la infección por *Babesia bovis*, empleando un ensayo de PCR Anidada (nPCR). Se procesaron 222 muestras de ADN, extraído de sangre de búfalos, de diferentes edades, procedentes de siete granjas de la región occidental de Cuba, a los que también se les realizó frotis sanguíneo. Como resultado encontramos que todas las muestras resultaron negativas al frotis sanguíneo. Sin embargo, 94 de ellas (42,1%) resultaron positivas en el nPCR, visualizándose bandas de 298pb. La infección estuvo presente en animales de todas las granjas y de las cuatro categorías estudiadas. Se secuenció el producto del nPCR de una muestra positiva. La secuencia obtenida se depositó en el GenBank y se comparó con otras secuencias disponibles en diversas bases de datos, verificándose elevada identidad con respecto a aislados geográficos de *B. bovis*. Se concluye que los búfalos en Cuba son portadores de la infección por *Babesia bovis*.

Palabras clave: *Babesia bovis*, PCRn, *rap1*.

Diagnostic of *Babesia bovis* in buffaloes from the western region of Cuba by an nPCR assay

ABSTRACT: The objective of this work was to determine if water buffaloes from the western region of Cuba are carrier of *Babesia bovis* infection, using a nested PCR (nPCR) test. Two hundred twenty two DNA samples, extracted from buffalo blood at different ages, from six farms in the western region of Cuba were processed. Visualization of blood smear in the optical microcopy was previously carried out. The results showed that all the samples were negative to blood smear; however, 94 (42.1%) samples were positive in the nPCR, visualizing bands of 298 pb. Infection was present in animals from all farms and categories studied. A positive nPCR sample was sequenced and such sequence was deposited in the GenBank, comparing it with others available in diverse databases. Its high identity was verified with several geographical isolates of *B. bovis*. It is concluded that water buffaloes in the western region of Cuba are carrier of *Babesia bovis* infection.

Key words: *Babesia bovis*, nPCRn, *rap1*.

INTRODUCCIÓN

La babesiosis constituye una de las principales enfermedades que afectan a los bovinos en Cuba (1) y la mayoría de los países tropicales (2), causada por *Babesia bovis* (3) y *Babesia bigemina* (4). De ellas, *B.*

bovis tiene mayor significación, por su patogenicidad en el ganado bovino (5, 6).

La especie bubalina (*Bubalus bubalis*) fue introducida en Cuba en la década de los 80, adaptándose muy bien a nuestras condiciones de crianza (7). Has-

ta la actualidad no se han realizado estudios que aborden la incidencia de las hemoparasitosis en los rebaños bubalinos, aunque tampoco se ha registrado la ocurrencia de cuadros clínicos de estas patologías, predominando el criterio de que los búfalos son refractarios a las hemoparasitosis (8).

En los búfalos ha sido demostrada la infección por tres especies de *Babesias* (9), que están incluidas en la lista de 18 *Babesia* sp., que afectan a los mamíferos domésticos (10). Dos de ellas son *B. bovis* y *B. bigemina*, detectadas en búfalos en países tropicales y subtropicales (11, 12,13) y la otra es *B. orientalis*, que fue diagnosticada únicamente en China (14), con alta incidencia y ocasionando grandes prejuicios a la especie (15).

En América Latina se ha informado la presencia de las infecciones por *B. bovis* y *B. bigemina* en búfalos (13,16). En varias de esas investigaciones se ha descrito la amplia distribución de estos hemoparásitos en los rebaños bubalinos (13,17,18), e incluso la ocurrencia de cuadros clínicos agudos, que incluyen aborto y hasta la muerte de animales infectados (19, 20). Además se ha asociado estas infecciones con la infestación por la garrapata *Rhipicephalus (Bophilus) microplus* (18), que es el vector de *B. bovis* y *B. bigemina* en Suramérica y el Caribe (2, 21).

Varios autores coinciden en que los búfalos son muy resistentes a la babesiosis, que generalmente padecen de forma subclínica (11,13,18). Por esta situación se considera que los búfalos sirven de reservorio a estos hemoparásitos, facilitando su propagación a los rebaños bovinos (11,18). Igualmente se ha indicado la necesidad e importancia de caracterizar la situación epidemiológica de estas infecciones en los rebaños bubalinos, en especial la identificación de animales portadores (13,18).

El inconveniente para la identificación de animales portadores, es que los niveles de parasitemia permanecen muy bajos (22), de manera que los métodos

convencionales de diagnóstico, como el frotis sanguíneo (23,24), carecen de sensibilidad analítica para detectar estos protozoarios en animales portadores (25,26). Además se han empleado las pruebas de diagnóstico serológico, en la identificación de animales portadores de *Babesia* sp. (25,27); pero esas técnicas tienen la limitante de la reacción cruzada entre *B. bovis* y *B. bigemina* (28) y no permiten discriminar entre infecciones previas o latentes, incluyendo las crías de madres inmunes (29).

Con el empleo de protocolos diagnósticos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se obtienen resultados más precisos, en la detección y caracterización de *Babesia* sp. (30, 31,32). En especial, los ensayos PCR anidada (nPCR), poseen elevada especificidad y sensibilidad analítica (33) y posibilitan la identificación de bovinos y búfalos portadores de diferentes especies (13, 25, 30, 31).

El objetivo del presente trabajo fue determinar si los búfalos en el occidente de Cuba son portadores de la infección por *Babesia bovis*, empujando un ensayo de PCRn.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras trabajadas

Se analizaron 222 búfalos, seleccionados al azar, de cuatro categorías y procedentes de siete unidades de producción, localizadas en cuatro provincias del occidente de Cuba (Tabla 1). Ningún caso presentaba manifestaciones clínicas de síndrome hemolítico.

De cada animal se realizaron dos frotis sanguíneos. Para esto se extrajo sangre periférica, por punción de una vena de la cara interna de la oreja, con aguja de calibre 26 X 1/2, desechando las primeras gotas. Las extensiones fueron llevadas al laboratorio, fijadas con metanol absoluto (Uni-Chem) y teñidas durante 30 min con Giemsa. La lectura se realizó en un microscopio óptico (Opton), empleando lente de inmersión de 100X.

TABLA 1. Procedencia y categoría de los animales estudiados./ *Origin and category of the animals studied*

Provincia	Granja	No. de Muestras	Categoría
Artemisa	Piragual	43	Bucarro
Mayabeque	ICA	46	Búfala
	Mayabeque	38	Búfala
	UBPC. Güines	18	Búfala
	Siberia	10	Semental
Ciudad Habana	Bacuranao	15	Semental
Matanzas	Guamuta	52	Búfala
Total	7	222	3

La sangre para extraer el ADN se obtuvo por punción de la vena yugular, utilizando agujas hipodérmicas y el sistema de extracción al vacío, en frascos colectores (GPlast), que contenían 7, 24 mg de EDTA. Las muestras fueron identificadas y congeladas a -20°C hasta el momento de la extracción del ADN.

Controles positivos

Como control positivo se utilizó sangre de dos becerros infectados naturalmente, positivos al frotis sanguíneo. La sangre fue colectada por punción de la vena yugular, en frascos de extracción al vacío (GPlast), conteniendo EDTA. La extracción de ADN se realizó empleando el kit de purificación GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Bioscience), según las indicaciones del fabricante.

Purificación del ADN de las muestras

La extracción de ADN se realizó según lo descrito por Ambrosio y Potgieter (34), a partir de 500 µL de sangre.

Cebadores

Se utilizaron los cebadores descritos por Figueroa *et al.* (30) con los que se amplifica un fragmento de ADN de 298pb, correspondiente al gen *rap1* de *B. bovis*. En la primera etapa (PCR₁) se empleó el par de cebadores externos:

5'-CACGAGGAAGGAAGTACCGATGTTGA-3';

5'-CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA-3' y en el PCR₂ se emplearon los cebadores internos:

5'-TCAACAAGGTACTCTATATGGCTACC-3'.

Para comprobar la especificidad de los cebadores, se efectuó una prueba *in silico*, mediante el programa Vector NTI 11.0 (Invitrogen), a partir de la secuencia del gen *rap1* de *B. bovis*, depositada por Suárez *et al.* (35) en el GenBank (número de acceso AF030061).

Ensayo de nPCR

El ensayo de nPCR se desarrolló en las condiciones descritas por Oliveira-Sequeira *et al.* (2005) (31), en el Laboratorio de Biotecnología Animal de Embrapa. Pecuária Sudeste, Sao Paulo, Brasil.

En las reacciones de nPCR se utilizó Taq Polimerase Master Mix Red (NeoBio): (2X) Tris-HCl 150mM (pH 8.5), (NH₄)₂SO₄ 40mM, MgCl₂ 4.0mM, dNTPs 0.4mM, Taq polimerasa 0.05 U/µl y colorante rojo inerte.

En la PCR₁ las reacciones se desarrollaron en un volumen final 25 µl, incluyendo 12.5 µl de Master Mix Red, 10 pmol de los cebadores 1 y 2; 5.5µl H₂O y 5µl

DNA. En el PCR₂ se trabajó en un volumen final de 20µl, empleando 10µl de Master Mix Red, 10pmol de los cebadores 3 y 4; 7µl H₂O y 1µl del producto del PCR₁.

El programa de amplificación utilizado fue similar en ambos ensayos, excepto en el valor de temperatura de unión, que fue 64°C en el PCR₁ y 66°C en el PCR₂. Se realizó un ciclo de 96°C durante 1 minuto, 39 ciclos de 94°C, 30 segundos, 64°C ó 66°C durante 30 segundos, según correspondía y 72°C durante 30 segundos y una extensión final de 2 minutos a 72°C. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf).

Visualización del producto del nPCR

Los productos de amplificación de la nPCR se aplicaron en geles de agarosa al 1,5% en solución tampón TBE 05X y se corrieron a 100Volts y 50mA, durante 30 minutos, posteriormente se tiñeron con Bromuro de Etidio (0.5µg/mL) durante 10 min. Las bandas se visualizaron en un transluminador de luz ultravioleta, empleando un marcador de peso molecular de 100pb (Amersham Biosciences).

Secuenciación y análisis del producto amplificado en la nPCR

Para la secuenciación se seleccionó al azar uno de los amplímeros obtenidos en la nPCR y se empleó el Kit ABI PRISM® Big Dye terminator v. 3.1 cycle sequencing (Applied Biosystem).

La secuencia nucleotídica resultante fue depositada en el GenBank con número de acceso JF279443. Posteriormente se comparó con todas las secuencias de nucleótidos disponibles en las bases de datos: GenBank, EMBL, DDBJ y PDB, utilizando el programa Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>) y se seleccionaron y alinearon las secuencias con las que presentó mayor similitud, mediante el programa MEGA 5 (36).

Procesamiento estadístico

Los resultados del nPCR fueron agrupados en tablas de contingencia. Se analizó la frecuencia de casos, según las granjas de procedencia y las categorías de los animales. Para ello se realizó una comparación de proporciones, siguiendo el algoritmo de X², empleando la comparación de muestras múltiples, del paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de los frotis sanguíneos, todas las muestras resultaron negativas a la presencia de *B.*

bovis, resultado que era esperado, según los criterios de varios autores, los cuales demostraron que con esta técnica no es posible identificar los animales portadores de *B. bovis* (23,25,37). El frotis sanguíneo posee baja sensibilidad analítica, solo detecta la infección en casos de babesiosis aguda, cuando el nivel de parasitemia es elevado (25,26), por lo que no se recomienda su uso para identificar animales portadores (22,25,33).

Las limitaciones del frotis sanguíneo para el diagnóstico de *B. bovis*, también responden a la tendencia vicerotrópica del parásito, que generalmente se localiza en la circulación capilar de órganos centrales, donde producen el secuestro de los eritrocitos parasitados, retirándolos de la circulación general (38,39,40). Se plantea que en casos agudos, la parasitemia de *B. bovis* rara vez alcanza el 1% (medido en la circulación general), diferente de *B. bigemina*, que llega a registrarse hasta un 30% (33).

En la prueba *in silico* realizada a los cebadores, se obtuvo que el segmento de ADN del gen *rap1*, amplificado con el nPCR, fue de 298pb. Este resultado no coincide con los planteamientos de otros autores que utilizaron el mismo diseño de cebadores, según los cuales el tamaño del segmento amplificado fue de 291pb (30,31).

De la realización del nPCR a las 222 muestras analizadas, 94 resultaron positivas (42,1%), visualizándose bandas con peso molecular de 298pb (Figura 1), lo que se corresponde con los resultados obtenidos en la prueba *in silico* de los cebadores. Este hallazgo de-

muestra que los búfalos en el occidente de Cuba son portadores de la infección por *B. bovis*.

Los resultados positivos obtenidos con el ensayo de nPCR, confirman la eficacia de esta técnica para el diagnóstico en portadores (13, 30, 31), donde se mantienen muy bajos los niveles de parasitemia, aproximadamente inferiores a 0,0001% EI/ml de sangre (26).

La importancia de utilizar métodos con alta sensibilidad analítica en el diagnóstico de *B. bovis* (25,37), fue reafirmada por Nascimento (41), que estudió 162 búfalos asintomáticos del estado Río de Janeiro en Brasil y encontró que el 52,3% fue seropositivos, según un ensayo de ELISA indirecto, sin embargo, ninguno de los casos fue positivo en el análisis mediante un ensayo de PCR simple, con límite de detección de 0,003% EI/ml.

La secuencia de uno de los fragmentos amplificados en el nPCR fue depositada en el GenBank, con número de acceso JF279443. Esta secuencia presentó 298pb, confirmando los resultados de la prueba *in silico* realizada.

Al comparar esta secuencia, se encontró elevada identidad con respecto a la mayoría de las secuencias existentes del gen *rap1* de *B. bovis*, correspondientes a aislados de diversos países. Además se determinó que el polimorfismo entre ellas, se localizaba en tres posiciones de nucleótidos específicamente (Tabla 2).

Estos resultados se corresponden con los presentados anteriormente por Suárez *et al.* (35) quienes demostraron que el gen *rap1* es ampliamente conserva-

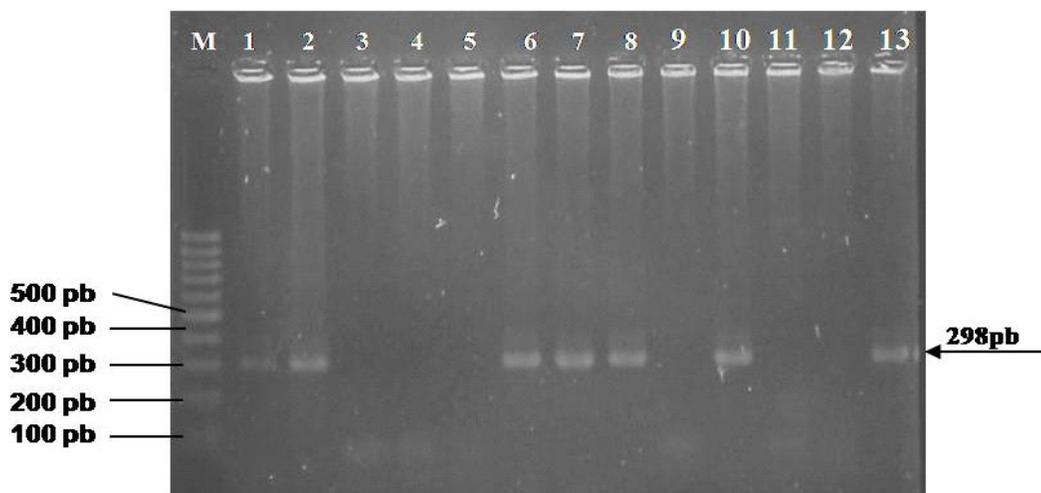


FIGURA 1. Resultados de nPCR con muestras de ADN, extraído de sangre de búfalos. **M**-Marcador 100 pb, **1**- Control positivo (1/100), **2 a 13**- Muestras./ *nPCR results with buffalo blood DNA samples, M*-Marker (100 pb), **1** - Positive control (1/100), **2 at 13** - Samples.

TABLA 2. Resultados de la comparación de secuencias del gen *rap1* de *B. bovis*./ *Results of comparison of B. bovis rap1 gene sequences*

Secuencias (GenBank)	País de Origen	Identidad	Posiciones de nucleótidos en el gen <i>rap1</i>		
			644	699	710
JF279443*	Cuba	-	C	T	A
AF030061	Uruguay	298/298 (100%)	C	T	A
FJ588011	Brasil (Norte)	298/298 (100%)	C	T	A
AF027149	México	297/298 (99%)	C	T	G
AF030059	USA	297/298 (99%)	C	T	G
AF030062	Argentina	295/298 (98%)	T	C	G
FJ588013	Brasil (Sur)	295/298 (98%)	T	C	G

*Secuencia determinada en este trabajo

do entre los diferentes aislados geográficos de *B. bovis*, diferente a lo que ocurre con *B. bigemina*, donde la secuencia de este gen es variable, según los aislamientos de diferentes regiones (42). La causa de esta diferencia radica en que el gen *rap1* está representado en el genoma de *B. bovis* por dos copias monomórficas, alineadas en tandem, mientras que en *B. bigemina*, el gen presenta 4 copias polimórficas, organizados en un locus de estructura más compleja, con posibilidades de combinaciones génicas, que se expresan en la síntesis de la proteína RAP-1 (42, 43).

Por su parte Rios *et al.* (44), después de una amplia revisión de los trabajos que abordan la estructura del gen *rap1* en las diferentes especies de *Babesias*, señalaron que el gen *rap1* muestra alta conservación entre las cepas de *B. bovis*, y no así entre las cepas de *B. bigemina*, por lo que identificaron este gen como un marcador molecular específico de la especie *B. bovis*, útil para estudios donde se pretenda detectar este patógeno exclusivamente.

Los trabajos realizados por Suarez *et al.* (42) y Brown *et al.* (45), demostraron que las variaciones registradas en la secuencia del gen *rap1*, entre diferentes aislados geográficos, no alteraban la estructura de los epítopes existentes en la proteína RAP-1. Estos autores trabajaron con aislados de México, Argentina y Uruguay, cuyas secuencias del gen *rap1* fueron incluidas en la comparación realizada en el presente estudio (43, 45).

La infección se detectó en animales procedentes de todas las granjas, sin que existieran diferencias significativas entre las proporciones de casos registrados en cada una de ellas ($p=0.5835$) (Figura 2). Además encontramos animales infectados en las tres categorías analizadas y las diferencias entre las proporciones tampoco resultaron significativas ($p=0.3369$) (Figura 3).

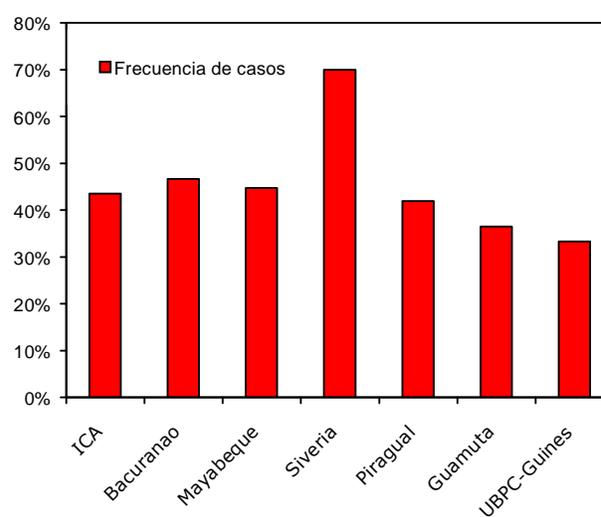


FIGURA 2. Distribución de casos según las granjas./ *Distribution of cases according to the farms.*

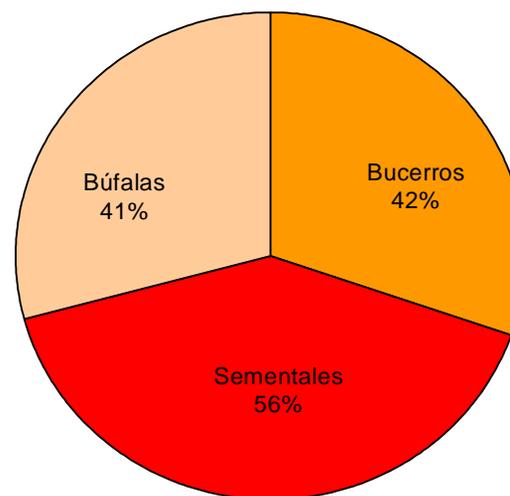


FIGURA 3. Distribución de casos según las categorías./ *Distribution of cases according to the categories.*

Estos resultados permiten inferir que *B. bovis* se encuentra ampliamente distribuida en los rebaños bubalinos, similar a lo que ocurre en los rebaños bovinos de la región, donde esta hemoparasitosis presenta una vasta distribución (8). Aún cuando este análisis no es un estudio de prevalencia, la proporción de casos (42,1%) se aproxima al índice de prevalencia de 34%, registrado por Ferreri *et al.* (13) en búfalos portadores en Argentina y al índice de seroprevalencia de 49,4%, reportado por Guido *et al.* (17) en Brasil.

El hallazgo de *B. bovis* en el 46,7% de los bucerros, permite inferir que la primera infección en los búfalos se produce durante el primer año de vida (46), cuando todavía están protegidos por los anticuerpos colostrales, y desarrollan una inmunidad que persiste durante varios años; de la misma forma en que ocurre con la infección por *A. marginale* en búfalos (47). Este hecho, unido a la resistencia natural de la especie (11), puede ser la causa de la forma asintomática de presentación de la babesiosis en búfalos (13).

La presencia de *B. bovis* en búfalos adultos puede ser consecuencia de la reinfección frecuente, mediado por la infestación por garrapatas (48), como ocurre en los bovinos (49); aunque también la infección puede iniciarse desde el primer año de vida y prevalecer persistentemente, sin necesidad de reinfección (50). Este protozoario logra evadir la respuesta inmune en los bovinos a través los mecanismos del secuestro eritrocítico (40) y de la variabilidad antigénica (51, 52), prevaleciendo por períodos de hasta 3 años en las razas del tipo *Bos indicus*, mientras que en las razas del tipo *Bos taurus* puede mantenerse de por vida (53,54).

La detección del hemoparásito en los búfalos desde la categoría de bucerros, se corresponde con la dinámica de la infestación por *R. (Boophilus) microplus* en los búfalos en Cuba, que alcanza tasas de infestación elevadas en los bucerros (55). Varios autores demostraron anteriormente la asociación entre la infección con *B. bovis* y otros hemoparásitos en búfalos, con la infestación por la garrapata *R. (Boophilus) microplus* (12,48). Según estos criterios consideramos que esta garrapata es el vector de la infección por *B. bovis* en los búfalos de Cuba.

Los resultados de este trabajo permiten afirmar que los búfalos en la región occidental de Cuba son portadores de la infección por *B. bovis*, y que el nPCR constituye una herramienta diagnóstica eficaz para el monitoreo epidemiológico de esta hemoparasitosis en los animales portadores. Se recomienda un estudio epidemiológico de la babesiosis en los rebaños bovinos y bubalinos de la región y de la importancia de *R. (Boophilus) microplus*

como vector, además de caracterizar la dinámica de la infección en los rebaños bubalinos y su costo metabólico para los animales portadores.

REFERENCIAS

1. Pérez BH, Valdés RM, Vitorte SE.. Epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas en Cuba. Rev Cub Cienc Vet. 2002; 20:78-87.
2. Guglielmone AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Vet Parasit. 1995; 57: 109-119.
3. Babés V. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. C. Hebd. Seances Acad. Sci., 1888; 107: 692-694.
4. Smith T, Kilborne FL. Investigations in to the nature, causation and prevention of Southern cattle fever. Annual Report of the Bureau of Animal Industry for the Year . 1893; 177-304.
5. Callow LL. Piroplasms. In: Animal Health in Australia, protozoan and rickettsial diseases. Australian Bureau of Animal Health, AGPS, Canberra. 1984; 5:121-160.
6. Blandino T, Alonso M. Evaluación de la patogenicidad de cepas de *Babesia bovis*. VII Conferencia de Ciencia Animal. Univ. Central de Las Villas, Cuba. 1989.
7. Mitat AOB. Búfalos de agua en Cuba. Origen y evolución. Rev ACPA. 2009; 3: 45-48.
8. IMV. Informe de Balance anual. Taller regional de hemoparasitosis.2009. Centro Nacional de Parasitología. Cuba.
9. Levine ND. Taxonomy of the piroplasmic. Trans Microsc Infect Immun. 1997;160:5139-5144.
10. Uilenberg G. *Babesia*. Hitorical overview. Vet Parasit. 2006;138:3-10.
11. Banerjee DP, Momim RR, Samanta RA. Cross transmisión of *Babesia bigemina* from cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*) to buffalo (*Bubalus bubalis*). In: Wolrd Buffalo Congress 2, New Delhi. Council of Agricultural Research. 1998; 329.
12. Rajput ZI, Hu SH; Arijo AG, Habib M, Khalid M.Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. J of Zhejiang University Sci. 2005; 6(11):1057-1062.
13. Ferreri L, *et al.* Water Buffalos as carriers of *Babesia bovis*. Anim. Biodiv. and Emerging Diseases. N. Y. Acad. Sci. 2008; 1149: 149-151.

14. Liu Z, Zhao J, Ma L, Yao B. *Babesia orientalis*. Novel parasite of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in China. *Acta Vet Zootec*. 1997;28(1): 84-89.
15. Zhao JL, Liu ZL, Yao BA, Ma LH. Culture-derived *Babesia orientalis* exoantigens used as a vaccine against buffalo babesiosis. *Parasit Res*. 2002; 88: 38-40.
16. Prada-Sanmiguel GA. Determination of endoparasites population in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Magdalena Medio. *Jornada Científica*. Universidad de La Salle, Colombia. 2006.
17. Guido MC, Dell'porto A, Fujii TU, Artes R. Prevalence of hemoparasites in buffaloes from Ribeira Valley south coast of São Paulo, Brazil State-Brazil. In: *World Buffalo Congress 4, Brazil*. 1994; 325-327.
18. Jacobo RA, Cipolini MF, Storani CA, Martínez DE, Martínez EI. Infección con el complejo tristeza del bovino en búfalos. *Rev Med Vet*. 2004;85(5): 203-204.
19. Lau HD. Babesiose e anaplasmoses. Doenças em búfalos no Brasil. *Diagnostico epidemiologia e controle*. EMBRAPA, Brasilia. 1999; 99-145.
20. Escobar LO. Enfermedades de los búfalos. *Asociación Colombiana de Criadores de Búfalos*. Simposio anual. 2010.
21. Oliveira MCS, Oliveira-Sequeira TCG, Araujo JP, Amarante AFT, Oliveira HN. *Babesia spp.* infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in Sao Paulo State, Brazil. *Vet Parasit*. 2005;130:61-67.
22. Costa-Junior LM, Leite EM, Assis OM, Barbosa MF. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. *Vet Parasit*. 2006;139:231-236.
23. Fahrimal Y, Goff WL, Jasmer DP. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J Clin Microbiol*. 1992;30:1374-1379.
24. Callow LL, Rogers RJ, de Vos AJ. Tick-borne diseases: cattle-pathology and serology. *Australian standard diagnostic techniques for animal diseases*. Ed Corner, L. A. & Bagust, T. J. East Melbourne, CSIRO. 1993; 1-16.
25. Almería S, Castella J, Ferrer D, Ortuño A, Estrada-Peña A, Gutierrez JF. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Vet Parasit*. 2001;99:249-259.
26. Bose R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasit*. 1995;57: 61-74.
27. Madruga CR, *et al.* Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. *Pesq Vet Bras*. 2001;21(2):72-76.
28. Passos LMF, Bell-Sakyi L, Brown CGD. Immunochemical characterization of in vitro culture-derived antigens of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Vet Parasit*. 1998; 76: 239-249.
29. Wagner G, *et al.* Non-immunologic methods of diagnosis of babesiosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1992; 87(3): 193-199.
30. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasit*. 1993;50: 69-81.
31. Oliveira-Sequeira TCG, Oliveira MCS, Araujo JP, Amarante AFT. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int. J Parasit*. 2005; 35:105-111.
32. Criado-Fornelio A *et al.* New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Vet Parasit*. 2006; 142: 238-247.
33. OIE. *Terrestrial Manual*. Bovine babesiosis. Chapter 2.4.2. 2010; 1-15.
34. Ambrosio RE, Potgieter FT. The genome of *Anaplasma*: DNA composition and DNA/DNA hybridization. *J Vet Res*. 1987; 54: 53-65.
35. Suarez CE, Palmer GH, Hotzel I, McElwain TF. Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis rap-1* multigene locus. Genbank, accession: AF030061. 1997. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

36. Tamura K, *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011. <http://www.kumarlab.net/publications/>.
37. Zulfiqar. *et al.* Detection of *Babesia bovis* in blood samples and its effect on the hematological and serum biochemical profile in large ruminants from Southern Punjab. *Asian Pacific J. of Trop. Biomed.* 2012. 104-108.
38. Massard CL, Freire RB. Etiologia, manifestações e diagnóstico das babesioses bovinas no Brasil. *Hora Vet.* 1985; 23: 53-56.
39. Kakoma I, Melhorn H. *Babesia* of domestic animals. Parasitic Protozoa. Academic Press, New York. 1994; 141-216.
40. O'connor MR, Long AJ, Allred D. Cytoadherence of *Babesia bovis*-Infected Erythrocytes to Bovine Brain Capillary Endothelial Cells Provides an In Vitro Model for Sequestration. *Infect Immun.* 1999; 67(8): 3921-3928.
41. Nascimento, F.C. Estudo epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. UFRRJ. 2011
42. Suarez CE, Palmer GH, Hotzel I, McElwain TF. Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis rap-1* multigene locus. *Mol Biochem Parasit.* 1998; 93:215-224.
43. Suarez CE, *et al.* Interstrain conservation of babesial RAP-1 surface-exposed B-cell epitopes despite rap-1 genomic polymorphism. *Infect Immun.* 1994;62: 3576-3579.
44. Ríos ST, Ríos LO. Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. *Rev MVZ Córdoba.* 2011;16(2): 2470-2483
45. Brown WC, *et al.* *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T-cell epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains. *Infect Immun.* 1996; 64: 3341-3350.
46. Franzolin-Neto R, Dell'porto A, Lacaz RR. Anaplasmosis and babesiosis: a clinical case in buffalo (*Bubalus bubalis*) calf in Brazil. *Buffalo Bulletin.* 1989;8(3): 54-68.
47. Gomes RA, Machado RZ, Starke-Buzetti WA, Bonesso MA. Resposta imune-humoral de búfalos (*Bubalus bubalis*) contra *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910). *Rev Bras Parasitol Vet.* 2008;17(2): 73-80.
48. Miranpuri GS. Tick parasitising the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) and their possible role in disease transmission. *Vet Parasit.* 1988;27: 357-362.
49. Mahoney DF, Ross DR. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust Vet J.* 1972; 48:292-298.
50. 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. *Vet Res.* 2009; 40:37.
51. Allred DR. Molecular technology and antigenic variation among intraerythrocytic hemoparasites: do we see reality? *Vet Parasit.* 2001;101: 261-274.
52. Berens SJ *et al.* Merozoite surface antigen 2 proteins of *Babesia bovis* vaccine breakthrough isolates contain a unique hypervariable region composed of degenerate repeats. *Infect Immun.* 2005; 73:7180-7189.
53. Mahoney DF, Wright IG, Mirre GB. Bovine babesiasis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. *Ann Trop Med Parasitol.* 1973; 67:197-203.
54. Johnston LAY, Leach G, Jones PN. The duration of latent infection and functional immunity in Droughtmaster and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. *Aust Vet J.* 1978;54:14-18.
55. Obregón DA, Rodríguez JG, Aleman Y, Roque EL. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) en búfalos (*Bubalus bubalis*) en Cuba. *Rev Salud Anim.* 2010;32(2):45-48.

Recibido: 24-2-2012.
Aceptado: 20-6-2012.