

DIAGNÓSTICO DE *Babesia bigemina* POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) UTILIZANDO OS PRIMERS GAU6 E GAU7 PARA UM FRAGMENTO DE SSrRNA

(DIAGNOSIS OF *Babesia bigemina* BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) USING GAU6 AND GAU7 PRIMERS FOR SSrRNA FRAGMENT)

A. P. SANTANA¹, G. F. C. LINHARES², G. T. BORGES¹, A. J. MESQUITA², A. H. MIRANDA², C. R. MADRUGA³, S. B. MINHARRO⁴

RESUMO

O presente trabalho teve como finalidade avaliar o protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers GAU6 e GAU7 para amplificação específica de um fragmento do gene que codifica para SS rRNA de *B. bigemina* com amostras de sangue de bovino contendo os isolados de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*. Foram realizadas 40 reações para as amostras de sangue que continham hemoparasitos, sendo 14 reações de PCR para *Babesia bigemina*, 12 para reações para *Babesia bovis* e 14 para *Anaplasma marginale*. Para a extração do DNA das amostras de sangue, seguiu-se o protocolo de extração do kit comercial GFX™ Pharmacia Biotech; as amostras foram submetidas à reação do PCR previamente descrita por LINHARES et al. (2000). Os resultados obtidos demonstraram ser os primers GAU6 e GAU7 específicos para *Babesia bigemina*, não apresentando reação positiva para os parasitos *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*, bem como o DNA extraído de sangue de bovino livre de infecção.

PALAVRAS-CHAVE: *Babesia bigemina*, polimerase, PCR.

SUMMARY

The present study was carried out to evaluate the polymerase chain reaction (PCR) protocol with GAU6 and GAU7 primers for the SSrRNA of *Babesia bigemina* in cattle blood containing *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale*. Forty reactions were carried out for blood samples with haemo-parasites, 14 PCR for *Babesia bigemina*, 12 for *Babesia bovis* and 14 for *Anaplasma marginale*. DNA was extracted from the blood samples using the commercial GFX™ Pharmacia Biotech, and then the PCR protocol as described by LINHARES et al. (2000). The results show that the GAU6 and GAU7 primers are specific for *Babesia bigemina* and did not show a positive reaction for the *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* parasites. No reaction was obtained with DNA extracted from blood of healthy cattle.

KEY-WORDS: *Babesia bigemina*, polymerase, PCR

1 Professoras da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

End.: Campus Universitário Darcy Ribeiro CX.: 4508 Cep.: 70910-970 Brasília - DF - E-mail: patvet@unb.br

2 Professores do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

3 Embrapa-CNPQC - MS.

4 Professora da Universidade Católica de Goiás.

INTRODUÇÃO

O emprego de tecnologia para o melhoramento genético e para a nutrição do rebanho bovino assim como o uso de técnicas avançadas de manejo e o desenvolvimento de pastagens melhoradas têm contribuído para o crescimento da bovinocultura brasileira. No entanto, problemas sanitários, entre eles doenças parasitárias, como as hemoparasitoses, permanecem como entraves, que impedem a máxima produtividade. O desenvolvimento e a viabilização de métodos de diagnóstico precisos, confiáveis e de baixo custo são necessários, com vistas nos avanços nos programas de profilaxia e controle.

A babesiose dos bovinos é causada pelos hematozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, transmitidas pelo carrapato *Boophilus microplus*. Em sua manifestação clínica pode-se observar febre, anemia, hemoglobinúria e a presença do parasito no sangue (RIBEIRO & SALCEDO, 1982).

Trabalhos realizados em diferentes regiões do país têm demonstrado que a babesiose bovina ocorre de uma forma endêmica no Brasil (ALVES, 1987; PATARROYO *et al.*, 1987; ARAÚJO *et al.*, 1997; MADRUGA *et al.*, 2000).

As condições epidemiológicas são de alto risco para animais procedentes de áreas livres, tornando-se uma barreira aos programas de melhoramento genético.

Os métodos de diagnóstico vêm sendo aperfeiçoados nos últimos anos. KESSLER *et al.* (1987) relataram as dificuldades no diagnóstico das babesioses devido à falta de tecnologia mais eficiente. Segundo os autores, o método de diagnóstico pela pesquisa do parasito em esfregaços sanguíneos corados, procedimento adotado pelos médicos veterinários em regiões de ocorrência, limita-se ao acompanhamento de casos clínicos. Entretanto, vários estudos têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados na área de imunodiagnóstico, e técnicas sorológicas, tais como fixação de complemento, teste da congutinação rápida, imunofluorescência indireta (IFI), hemoaglutinação indireta e imunoadsorção enzimática (ELISA), estão sendo amplamente utilizadas, principalmente para levantamento epidemiológico de rebanhos, como pode ser observado nos trabalhos realizados por RODRIGUEZ *et al.* (1988), VIDOTTO *et al.* (1997), REDDY *et al.* (1997), ARAÚJO *et al.* (1997), MADRUGA *et al.* (2000), entre outros.

Atualmente, com a introdução da biologia molecular na detecção e caracterização de agentes patogênicos e, principalmente, a introdução das técnicas de sondas de DNA, com sensibilidade descrita em torno de 10^5 a 10^8 hemácias infectadas (MCLAUGHLIN *et al.*, 1992; BUENING & FIGUEROA, 1992) e da reação em cadeia da polimerase (PCR), com sensibilidade entre 10^8 e 10^9 hemácias infectadas, alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos desde 1986 para adaptá-las ao diagnóstico de *B. bovis* e *B. bigemina* (FIGUEROA *et al.*, 1992; BÖSE *et al.*, 1995). A alta especificidade e custos menos elevados quando comparados com as sondas de DNA, fizeram com que o PCR se tornasse o método mais adequado para estudos epidemiológicos em áreas geográficas específicas (FIGUEROA & BUENING, 1995; OHTA

et al., 1995).

A reação do PCR para *B. bigemina* e *B. bovis* tem sido utilizada em diferentes protocolos, empregando-se *primers* construídos a partir de diferentes genes, que se encontram referenciados na literatura como segue: *Spel*-Aval fragmento de 0,3 kb, oriundo do gene pBbiló (um derivado do gene pBR322 de *B. bigemina*, de 6.3-kb, subclonado no vetor "pBluescript" (FIGUEROA *et al.*, 1992); gene que codifica a *small-subunit* do rRNA (SSrRNA) de *B. bovis* (CALDER *et al.*, 1996); gene que codifica uma proteína de superfície do merozoíto de *B. bovis*, de 60-kDa (SUAREZ *et al.*, 1991, FIGUEROA *et al.*, 1993); gene BabR de *B. bovis* (MCLAUGHLIN *et al.*, 1992); gene Bv80 de *B. bovis* (BROWN *et al.*, 1993), gene BvVAL de *B. bovis* (DALRYMPLE *et al.*, 1992, LEW *et al.*, 1997). Existem informações disponíveis sobre seqüências de *primers* que permitem o diagnóstico direto de *Babesia* spp. pela PCR com alta especificidade e sensibilidade.

O presente trabalho teve como finalidade avaliar o protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* descritos originalmente por LINHARES *et al.* (2000) para a amplificação específica de um fragmento do gene que codifica para uma pequena subunidade de RNAr (SS rRNA) de *B. bigemina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das amostras de sangue para o PCR

As amostras de sangue positivas para *B. bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* utilizadas neste trabalho foram cedidas pela Embrapa - CNPGC - MS (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte - Mato Grosso do Sul), as quais foram preparadas a partir de amostra de sangue de bovino infectado com amostra pura dos respectivos parasitos, em condições de isolamento, conforme KESSLER *et al.* (1987).

Foi realizado um total de 40 reações com sangue de animais parasitados oriundos de diversas regiões do Brasil, sendo 14 reações para *Babesia bigemina*, 12 reações para *B. bovis* e 14 reações para *Anaplasma marginale*. Concomitantemente, foram realizadas reações de PCR com DNA extraído de sangue de bovino livre de infecção.

Extração do DNA genômico da *Babesiu bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*

Uma alíquota de cada amostra de sangue colhida com anticoagulante foi submetida ao processo de extração do DNA genômico, utilizando-se *kit* comercial¹, seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante, padronizando-se o volume da amostra para extração de 300µl de sangue total.

“Primers” utilizados

Para a execução da reação em cadeia da polimerase foram utilizados os primers GAU6 (*re verse*) e GAU7 (*forward*), previamente descritos por LINHARES *et al.* (2000) (Quadro 1), para a amplificação espécie-específica de um fragmento de 687 pares de bases do gene que codifica para SSrRNA (*small subunit rRNA*) de *B. bigemina*.

As seqüências dos oligonucleotídeos foram sintetizadas previamente por uma companhia especializada², numa escala de síntese de 50 nmol, sob a forma liofilizada.

Os nucleotídeos liofilizados foram ressuspensos em água ultrapura (Milli-Q), ajustando-se a concentração da solução estoque em 1 mg/1 mL. A concentração da solução de trabalho foi ajustada para 20µmol, e alíquotada em tubos do tipo Eppendorf 1.5 mL foram armazenadas sob temperatura de -20°C.

Avaliação da especificidade dos primers

Para a verificação da especificidade dos primers para *B. bigemina* foram utilizadas sete amostras de sangue de isolados do parasito (duas amostras oriundas do Estado de Goiás, uma amostra de cada um dos seguintes Estados: Mato Grosso do Sul, Rondônia, São Paulo, Rio Grande

do Sul e Bahia), seis amostras de sangue contendo isolados de *B. bovis* (duas amostras oriundas de Goiás, duas amostras do Mato Grosso do Sul, uma amostra de São Paulo e uma da Bahia) e uma amostra de sangue contendo isolados de *Anaplasma marginale* oriunda do Mato Grosso do Sul. Os primers foram testados também contra o DNA de bovino livre de infecção. As amostras de sangue usadas neste experimento apresentavam níveis de parasitemia variando entre 0,1 e 0,5%, determinado por exame em microscopia direta, em lâminas de esfregaço sanguíneo coradas pela coloração de Giemsa.

Reação do PCR

Como medida de segurança, para prevenir qualquer tipo de contaminação, as diferentes fases de desenvolvimento da técnica do PCR foram executadas em quatro laboratórios, fisicamente separados, conforme LAUERMAN (1998), sendo um laboratório para a extração do DNA genômico das amostras, outro para a preparação da mistura de reação, outro para a inoculação do DNA e o quarto para amplificação, eletroforese e documentação fotográfica.

Para o desenvolvimento da técnica adotou-se protocolo de reação previamente descrito por LINHARES *et al.* (2000), conforme os seguintes parâmetros: para cada amostra foi preparada uma mistura (*master mix*) contendo 24,75µL de água altamente purificada (Milli-Q) em um tubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL, onde adicionaram-se 5µL de solução tampão (buffer 10X³, 1 mL de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato⁴ (dNTP) na concentração de 10mM, 0,5µL de cada primer (*forward primer*: GAU7 5'-GTTGGG TCTTTTCGC TGG C-3' e *reverse primer*: GAU6 5'-CCA CGC TTG AAG CAC AG G A-3'), 0,25 µL de *Taq* DNA polimerase⁵ (5 U/µL). O volume obtido

Quadro 1 - Seqüência de oligonucleotídeos (*primers*) para a amplificação específica de fragmento do gene SSrRNA de *B. bigemina* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme LINHARES *et al.* (2000).

Primer	Seqüência	Posição no seqüenciamento do gene	Especificidade
GAU6 (R ^o)	5'-CCA CGCTTGA A GCA CA GGA -3'	1532-1515	<i>B. bigemina</i>
GAU7 (F*)	5'-GTTGGGTCTTTTCGCTGGC-3'	848-866	<i>B. bigemina</i>

<pR = reverse primer *F-forward primer.

Tabela 1 - Resultados da reação de PCR usando a combinação dos primers GAU7 e GAU6 para a amplificação de fragmento de DNA (gene SSrRNA) de *B. bigemina*, com o respectivo amplicon.

Primers	DNA testado	N ^o de amostras	PCR - positivo	Amplicon
GAU7/ GAU6	<i>B. bigemina</i>	14	14	687 bp
GAU7/ GAU6	<i>B. bovis</i>	12	00	-
GAU7/ GAU6	<i>A. marginale</i>	14	00	-
Total		40	14	

(35µL) para cada amostra a ser testada foi então transferido para um tubo de PCR de 0,2mL, no qual foram inoculados 15µL de DNA genômico da amostra, perfazendo um volume total de 50µL. Para cada bateria de testes, foi incluída uma amostra inoculada com DNA genômico de *B. bigemina*, como controle positivo, e uma amostra inoculada com água altamente purificada (sem DNA), como controle negativo para a reação. Os tubos de PCR foram então tampados e transferidos para um aparelho termociclador automático¹⁰, previamente programado para os seguintes ciclos de temperatura: 94° C por dois minutos (etapa de desnaturação inicial), 39 ciclos sucessivos nas temperaturas de 94° C por 30 segundos (desnaturação das fitas de DNA), 55° C por 30 segundos (anclamento dos *primers*) e 72° C por um minuto (extensão das fitas de DNA) e, por último, apenas um ciclo a 72° C por cinco minutos, para otimizar a extensão final das fitas.

Em seguida, 12µL do produto do PCR (*amplicon*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose¹¹ a 2,0% em solução de TAE IX pH 8,3¹² (LAUERMAN *et al*, 1995), em cuba de eletroforese¹³, com capacidade para 28 amostras. A distribuição das amostras no gel seguiu o modelo de COSTA (1999); no primeiro poço foi colocado o marcador de DNA¹⁴, no segundo, o controle positivo, no último poço, o controle negativo, e nos demais poços foram colocados os produtos de PCR das amostras em estudo. A eletroforese foi realizada a 94 volts por 50 minutos. Posteriormente o gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,25µg/mL durante 20 minutos, e em seguida o produto amplificado foi visualizado em um transiluminador de ultravioleta¹⁵, comparando-se o peso das bandas amplificadas (687bp) com as bandas do marcador de DNA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da reação do PCR empregando-se os *primers* GAU7 e GAU6¹² para a amplificação específica de um fragmento de 687bp do gene que codifica a SSrRNA de *B. bigemina* apresentou resultados que demonstraram sua especificidade, discriminando esse parasito de outros hemoparasitos endêmicos na região estudada (*B. bovis* e *Anaplasma marginale*), assim como o DNA do hospedeiro. De um total de 40 reações executadas (14 com DNA genômico de isolados de *B. bigemina*, 12 de *B. bovis* e 14 de *A. marginale*), o par de *primers* utilizado demonstrou ser 100% específico na amplificação do DNA de *B. bigemina* e não apresentou nenhuma reação cruzada com DNA de *B. bovis*, *A. marginale* ou DNA genômico da espécie bovina (Tabela 1 e Figura 1).

Estes resultados são semelhantes e confirmam aqueles reportados originalmente por LINHARES *et al.*

(2000) para o mesmo par de *primers* e protocolo e ainda se assemelham aos resultados de FIGUEROA *et al.* (1992) no que se refere à especificidade do teste da reação em cadeia da polimerase ao parasito.

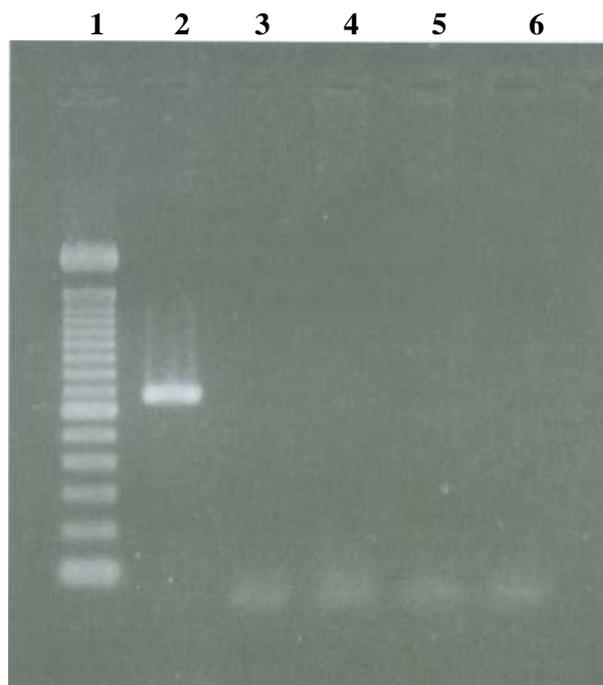


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 2% de 10µL de produto de PCR na amplificação de fragmento do gene SSrRNA de *B. bigemina* com os *primers* GAU7/ GAU6. 1) marcador DNA 100bp; 2) *Amplicon* de 687 bp de *B. bigemina* (PCR positivo); 3) DNA de *B. bovis*; 4) DNA de *A. marginale*; 5) DNA genômico de bovino livre de infecção; 6) Controle negativo.

CONCLUSÃO

O protocolo com *primers* avaliados foram efetivos para a amplificação específica de um fragmento do gene que codifica a SSrRNA de *B. bigemina*, discriminando-a de forma precisa de *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, assim como do DNA do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L.C. **Prevalência da babesiose em gado leiteiro no município de Garanhuns, Estado de Pernambuco.** São Paulo, SP. 1987. 124p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- ARAÚJO, F.R., MADRUGA, C.R., ALMEIDA, M.A.O., LEAL,

¹⁰ Marca MJ Research Incorporation (modelo PTC-100)

* Life Technologies - Gel de Agarose

¹² TAE IX: 2ml de TAE 50X pH 8,3(121g de Tris Base, 28,6ml de ácido glacial acético e 50 ml de EDTA à concentração de 0,5 molar) e 98 ml de água destilada. PH final de 8,3.

¹³ marca Life Technologies - modelo Horizon 11-14

¹⁴ Life Technologies- 100bp (pares de bases) DNA Ladder 1 mg/ml
marca Hoefer-Amersham Pharmacia Biotech - modelo UV-25

- C.R.B., MIGUITA. M. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste da conglutinação rápida, **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 111-115, 1997.
- BÕSE R., JORGENSEN, W.K., DALGLIESH, R.J., FRIEDHOFF, K.T., VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.61-74, 1995.
- BROWN. W.C., ZHAO, S., WOODS, V.M. Identification of two Th1 cell epitopes on the *Babesia bovis* - encoded 77 kD merozoite protein (*Babesia* - I) by use of truncated recombinant fusion proteins. **Infection and Immunity**, 61, p.236-244, 1993.
- BUENING. M.G., FIGUEROA, J.V. Detection of *Babesia bigemina* infection: use of a DNA probe - a review. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87, suppl.III, p.207-211, 1992.
- CALDER, J.A.M., REDDY, G.R., CHIEVES, L., COURTNEY, C.H., LITTEL, R., LIVENGOOD, J.R., NORVAL, R.A.I., SMITH, C., DAME, J.B.. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR - Based tests. **Journal of Clinical Microbiology**, p.2.748-55, 1996.
- COSTA, I.C. **Etiologia das bursites cervicais de bovinos abatidos em estabelecimentos sob Inspeção Federal no Estado de Goiás**. Goiânia, GO. 1999. 57 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás.
- DALRYMPLE, B.P., JORGENSEN, W.K., DE VOS, A.J., WRIGHT, I.G. Analysis of the composition of samples of *Babesia bovis* and the influence of different environmental conditions on genetically distinct subpopulations. **International Journal for Parasitology**, v. 22, p.731-7, 1992.
- FIGUEROA, J.V., CHIEVES, L.P., JONHSON, G.S., BUENING, G.M., Detection of *Babesia bigemina* - infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n. 10, p.2.576-82, 1992.
- FIGUEROA, J.V., BUENING, G.M. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.75, p.75-92, 1995.
- FIGUEROA, J.V., CHIEVES, L.P., JONHSON, G.S., BUENING, G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v.50, p.69-81. 1993.
- KESSLER, R.H., MADRUGA, C.R., JESUS, E.F., SEMPREGOM, D.V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n. 7, p. 747-52, jul.1987.
- LAUERMAN, L.H. **Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Ed. AAVLD, 152p., 1998.
- LAUERMAN, L.H., CHILINA, A.R., CLOSSER, J.A., JOHANSEN, D., Avian *Mycoplasma* identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. **Avian diseases**, v. 39, p.804-11, 1995.
- LEW, A.E., DALRYMPLE, B.P., JESTON, P.J., BOCK, R.E., PCR methods for the discrimination of *Babesia bovis* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p.223-237, 1997.
- LINHARES, G.F.C., SANTANA, A.P., LAUERMAN, L.H., MADRUGA, C.R. **Assesment of primers designed for the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR**. The American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD). Meeting, Birmingham, Alabama. October 20-4, 2000.
- MADRUGA, C.R., BRAGA, M.M., OLIVEIRA, D.B., MASSARD, C.L., SOARES, C.O. Prevalência de anticorpos contra *Babesia bovis* (Babès, 1988) e *B. bigemina* (Smith e Kilborne, 1893) (Apicomplexa: Babesiidae) em bovinos de quatro municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v.7, n.2, p.113-6, 2000.
- MCLAUGHLIN, G.L., MONTENEGRO-JAMES, S., VODKIN, M.H., HOWE, D., TORO, M., LEON, E., ARMIJOS, R., KAKOMA, I., GREENWOOD, B.M., HASSANKING, M., MARICH, J., RUTH, J., JAMES, M.A. Molecular approaches to malaria and babesiosis diagnosis. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 87, suppl. III, p.57-68, 1992.
- OHTA, M., KAWASU, S., TSUJI, N. Rapid and sensitive method for detection of newly isolated *Babesia* parasite (*Babesia* spp.) in the anticipated vector-tick using the polymerase reaction technique. **Journal of Protozoology**, v. 5, p. 108-17, 1995.
- PATARROYO, J.H., RIBEIRO, M.F.B., SANTOS, J.L. Epidemiologia das babesioses bovinas no Estado de Minas Gerais I: prevalência de anticorpos fluorescentes na Zona da Mata - MG. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, p.423-9, 1987.
- REDDY, G.G.B., MISIIRA, A.K., RAO, J.R., TEWARI, A.K., Comparison of indirect immunofluorescence (IIF) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in detecting *Babesia bigemina* infection in cattle, **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 45, n. 1, p.67-74. 1997.
- RIBEIRO, M.E.B., SALCEDO, J.H.P. Anaplasmoses e Babesioses. **Informativo Agropecuário de Belo Horizonte**, v. 8, n. 95, 1982.
- RODRIGUEZ, O.N., ESPAINÉ, L., RODRIGUES, P., RIVAS, A. Resultados obtenidos con cuatro pruebas serológicas en estudio de la anaplasmosis y babeiosis bovinas, **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 19, n.2, p.85-92, 1988.
- SUAREZ, C.E., PALMER, C.H., JASMER, D.P., Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 46, p.45-52, 1991.
- VIDOTTO, O., ANDRADE, G.M., AMARAL, C.H.S., BARBOSA, C.S., FREIRE, R.L., ROCHA, M.A., VIDOTTO, M.C., Freqüência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *Bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná, **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.5, p.655-9, 1997.