

FRANCISCO DE ASSIS LEITE SOUZA

Babesiose e anaplasmose em rebanhos bovinos leiteiros do Estado do Piauí, Brasil

TERESINA/PI

2011

FRANCISCO DE ASSIS LEITE SOUZA

Babesiose e anaplasmosose em rebanhos bovinos leiteiros do Estado do Piauí, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

TERESINA/PI

2011

**BABESIOSE E ANAPLASMOSE EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS DO ESTADO
DO PIAUÍ, BRASIL**

FRANCISCO DE ASSIS LEITE SOUZA

Dissertação aprovada em: 28.01.2011

Banca Examinadora:

**Profa. Dra. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva (Presidente) /
DCCV/CCA/UFPI**

Prof. Dr. Livio Martins Costa Júnior (Titular) / CCAA/UFMA

Profa. Dra. Márcia dos Santos Rizzo (Titular) / DCCV/CCA/UFPI

A toda minha família, especialmente meus pais **Jonas Filho de Oliveira Souza e Rita de Cássia Leite Souza** e às minhas irmãs, **Alinny Kelly Leite Souza, Ana Rúbia Leite Souza e Andréa Cristina Leite Souza**, pelo companherismo e confiança que sempre depositam em mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À DEUS, único digno de toda honra e louvor;

À orientadora Prof^{ra}. Dr^a. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva, pela amizade, por está sempre chamando atenção para o correto, por ter me iniciado no mundo da pesquisa, pela orientação e pelos conselhos dados, sendo para mim uma pessoa de grande admiração;

Ao co-orientador Prof. Dr. Renato de Lima Santos, pela hospitalidade e orientação proporcionada no tempo em que estive sob sua supervisão no Laboratório de Patologia Molecular/EV/UFMG;

Ao Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, uma pessoa de poucas palavras, mas que sempre esteve à postos para ajudar, cedendo os antígenos para sorologia, tirando dúvidas e abrindo as portas do Laboratório de Protozoologia/ICB/UFMG para que eu realizasse treinamento;

Ao Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa, pela amizade, apoio e pelos momentos de brincadeiras proporcionado por seu humor;

Ao Médico Veterinário Eduardo Esmeraldo Augusto Beserra, pela amizade, pelo imprescindível apoio nas atividades de campo e por está sempre querendo desvendar os problemas que afetam a bacia leiteira de Parnaíba, o que acabou proporcionando através do seu contato a realização da pesquisa nessa região;

À Dr^a. Érica de Azevedo Costa, pela paciência em ajudar e ensinar as técnicas de biologia molecular durante estágio no Laboratório de Patologia Molecular/EV/UFMG, sempre procurando respostas e soluções para os erros que encontrávamos;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), na pessoa do Pesquisador Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima, pela atenção e apoio quando recorremos a esta instituição;

Aos colaboradores e amigos Juliana Fortes Vilarinho Braga, Lidiany Viana Pires, Ciro José Sousa de Carvalho e Antônio Bruno Guimarães Leal, que estavam sempre dispostos a viajar para as atividades de campo e para ajudar com as análises laboratoriais;

Aos colegas do Setor de Patologia Animal/CCA/UFPI: Lucilene Silva, Flaviane Alves, Kleverton Ribeiro, Aline Andrade, Geórgia Alves, Fernando Luis, Edson Egedson, Karina Drumond, Larissa Feitosa, Nilton Magalhães, Maria Prianti, Sônia Carvalho, Aíla Alves, Alexandre Alves, Dayana Higino, Fábio Landel e Luciano Feitosa, pelos momentos de descontração e convivência durante todos esses anos;

Às amigadas que fiz durante o mestrado sanduíche realizado na Universidade Federal de Minas Gerais: Ana Patricia, Auricélio Macêdo, Teane Silva, Joice Cortez, Jankerle Boeloni, Juliana Saes, Juliana Paniago, Adriana Amantino, Tatitana Paixão, Luciana Fachini, Custódio Júnior, Diana Abrão, Júlia Silveira, Camila Bastos e Mercês pelos momentos de alegria proporcionados;

Aos produtores da bacia leiteira de Parnaíba, por abrirem as portas de suas propriedades e nos receberam da melhor forma possível, nos deixando à vontade para desenvolver nossa pesquisa;

Aos motoristas da Universidade Federal do Piauí, os quais sempre foram pacientes e prestativos durante as viagens que fazíamos para colheita de amostras;

Aos meus pais, Rita de Cássia Leite Souza e Jonas Filho de Oliveria Souza, por sempre estarem me apoiando em todas as decisões que tomo e pelas orações e amor demonstrado;

Às minhas irmãs Ana Rúbia Leite Souza, Alinny Kelly Leite Souza e Andréa Cristina Leite Souza, por sempre terem tido paciência comigo quando eu estava estressado;

Aos amigos Daniel César da Silva, Gustavo Wilson Mello, André Braga de Sousa, Paulo Alex Bezerra Sales, Ricardo Abílio, Caliandra Bona e Ana Lys Mineiro, pela amizade que perdura até hoje, pelo imenso apoio prestado nos momentos difíceis e por sempre estarem dispostos a ouvirem minhas preocupações;

Aos amigos do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Aline Mendes, Lilian Raquel, Maurício Teixeira, Airton Conde, Keyla Christiane, Miguel Arcanjo, Francisco Cardoso e Luiz Antônio, parceiros do conhecimento;

Aos professores e funcionários da Pós Graduação em Ciência Animal da UFPI, e aos funcionários do Setor de Patologia Animal;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI), pelo apoio financeiro concedido;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que através do Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD), proporcionou que eu realizasse mestrado sanduíche com a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais;

À todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a conclusão desta pesquisa com sugestões e críticas;

MUITO OBRIGADO!!!

"Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve"

(Charles Chaplin)

RESUMO

SOUZA, F. A. L. **Babesiose e anaplasmose em rebanhos bovinos leiteiros do Estado do Piauí, Brasil.** 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

O complexo de enfermidades conhecido no Brasil como Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é causado por agentes etiológicos distintos, os protozoários do gênero *Babesia* (*Babesia bigemina* e/ou *Babesia bovis*) e uma riquetsia *Anaplasma marginale*, porém com sinais clínicos e epidemiologias parecidas, que causam a babesiose e anaplasmose. Acredita-se que esse complexo seja uma das principais doenças que acometem os bovinos da região Norte do estado do Piauí. Assim, objetivou-se com esse trabalho conhecer aspectos epidemiológicos da babesiose e anaplasmose na bacia leiteira de Parnaíba-PI, bem como implantar os métodos de diagnóstico direto e indireto para detecção desses agentes. O estudo foi conduzido em nove municípios, totalizando 22 propriedades estudadas e 202 bovinos avaliados. Em todos os animais foram colhidas amostras de sangue periférico para pesquisa parasitológica e sangue com e sem anticoagulante para exames hematológico (microhematócrito), sorológico (RIFI) e molecular (PCR e nPCR). Foram aplicados em todas as propriedades, questionários envolvendo aspectos epidemiológicos. A soroprevalência de *B. bigemina* e *B. bovis* foi 52,5% (106/202) e 68,8% (139/202), respectivamente; e para *A. marginale* foi 89,1% (180/202). Das amostras analisadas, 148 (73,3%) foram reativas para *Babesia* spp. e *A. marginale*, demonstrando co-infecção. A visualização de merozoítos e corpúsculos intraeritrocitários pelo exame parasitológico foram demonstrados em 33,2% (67/202) dos animais, para *B. bigemina*, 23,3% (47/202) para *B. bovis* e 77,7% (157/202) para *A. marginale*. A co-infecção estava presente em 44,5% (90/202) dos esfregaços analisados. A análise por meio de PCR e nPCR mostraram a presença de DNA de *B. bigemina* e *B. bovis* em 52,0% (105/202) e 33,2% (67/202) das amostras, respectivamente. No caso da *A. marginale* essa positividade foi observada em 76,2% (154/202). Dessas, 104 (51,5%) amplificaram DNA dos dois gêneros. Dos 22 produtores entrevistados, a criação semi-intensiva predominou em 68,0%. Grande parte dos produtores (95,0%) cultivam pasto, e somente 59,0% fazem rotação de pastagem. Em 100% das propriedades existiam animais parasitados por carrapatos e 64,0% relataram presença de dípteros hematófagos. Todos controlavam a população de carrapatos, realizando aplicação de acaricidas quando os animais estavam com alta infestação, sendo que, somente 59,0% realizavam mudança de princípio ativo. O histórico clínico de babesiose e ou anaplasmose foram relatados em 73,0% das propriedades, sendo tratado em 68,0%. Em 50,0% das fazendas foi informado que já houve óbito de animais com histórico clínico da doença. Pela análise da soroprevalência, de acordo com a faixa etária não houve diferença significativa ($p>0,05$), nas espécies estudadas. A média do volume globular (VG) de animais positivos comparado aos negativos não diferiu estatisticamente ($p>0,05$). O estudo epidemiológico com *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, é indicativo de que essas enfermidades ocorrem de forma instável na região da bacia leiteira de Parnaíba-PI, com situações de instabilidade (babesiose) ou estabilidade (anaplasmose) enzoótica dependendo do agente estudado, sendo a PCR uma ferramenta valiosa para a realização de estudos epidemiológicos, possibilitando caracterizar uma região geográfica e utilizar medidas adequadas de controle.

Palavras-chave: *Babesia bigemina*; *Babesia bovis*; *Anaplasma marginale*; diagnóstico; epidemiologia.

ABSTRACT

SOUZA, F. A. L. **Babesios and anaplasmosis in dairy cattle herds in Piauí state, Brazil.** 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

The complex of diseases known in Brazil as Tick Fever (TF) is caused by distinct etiological agents, the protozoa of the genus *Babesia* (*Babesia bigemina* or *Babesia bovis*) and a rickettsia *Anaplasma marginale*, but with similar clinical signs and epidemiology, that cause babesiosis and anaplasmosis. It is believed that this complex is a major disease affecting cattle from Northern of Piauí state. Thus, the objective was to work with that know epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in dairy basin Parnaíba-PI and deploy diagnostic methods for direct and indirect detection of these agents. The study was conducted in nine municipalities, comprising 22 farms studied and evaluated 202 cattle. In all the animals were collected peripheral blood samples for parasitological examination and blood with and without anticoagulant for hematologic examinations (microhematocrit), serological (IFA) and molecular (PCR and nPCR). Were applied to all farms, involving epidemiological questionnaires. The seroprevalence of *B. bigemina* and *B. bovis* was 52.5% (106/202) and 68.8% (139/202), respectively, and for *A. marginale* was 89.1% (180/202). Of the samples analyzed, 148 (73.3%) were reactive for *Babesia* spp. and *A. marginale*, demonstrating co-infection. The visualization of merozoites and corpuscles intraeritrocitários by parasitologic examination were demonstrated in 33.2% (67/202) of animals for *B. bigemina*, 23.3% (47/202) for *B. bovis* and 77.7% (157/202) for *A. marginale*. Co-infection was present in 44.5% (90/202) of the smears examined. Analysis by PCR and nPCR showed presence DNA, *B. bigemina* and *B. bovis* in 52.0% (105/202) and 33.2% (67/202) of samples, respectively. In the case of *A. marginale* this positivity was observed in 76.2% (154/202). Of these, 104 (51.5%) amplified DNA from both genus. Of the 22 interviewed farmers, the semi-intensive prevailed in 68.0%. Many farmers (95.0%) cultivated pasture, and only 59.0% are pasture rotation. In 100% of the farms existed animals infected by ticks and 64% reported presence of hematophagous dipterans. All controlled the tick population, making application of acaricides when the animals were highly infested, and only 59.0% performed change of the active ingredient. The clinical history of babesiosis or anaplasmosis and were reported in 73.0% of the farms being handled by 68.0%. In 50.0% of the farms was informed that there have been deaths of animals with a history of the disease. For the analysis of seroprevalence according to age no significant difference ($p>0.05$) in species. The means packed cell volume (PCV) of animals positive compared to negative did not differ statistically ($p>0.05$). The epidemiological study of *B. bigemina*, *B. bovis* and *A. marginale*, indicates that these diseases occur in an unstable region in the dairy region of Parnaíba-PI, with situations of instability (babesiosis) or stability (anaplasmosis) enzootic depending on the agent studied, and the PCR a valuable tool for performing epidemiological studies to characterize a geographic region and use appropriate control measures.

Keywords: *Babesia bigemina*. *Babesia bovis*. *Anaplasma marginale*. cattle. diagnostic. epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1 – Mapa do Piauí mostrando a localização da microrregião Litoral Piauiense e os municípios que compõem a bacia leiteira de Parnaíba, onde foi realizado o estudo de babesiose e anaplasmoses bovina: (1) Ilha Grande, (2) Parnaíba, (3) Luis Correia, (4) Buriti dos Lopes, (5) Murici dos Portelas, (6) Caxingó, (7) Caraúbas do Piauí, (8) São José do Divino e (9) Piracuruca 49

FIGURA 2 – Análise do produto de PCR e nPCR pela eletroforese em gel de agarose a 1,5%. **A.** PCR *B. bigemina*: coluna 1, 100pb DNA ladder; coluna 2, controle positivo; colunas 3, 4, 5, 7 e 8, amostras positivas para *B. bigemina*; coluna 11, controle negativo. **B.** PCR *B. bovis*: coluna 1, 100pb DNA ladder; coluna 2, controle positivo; colunas 4, 5, 9 e 12, amostras positivas para *B. bovis*; coluna 13, controle negativo. **C.** nPCR *A. marginale*: coluna 1, 100pb DNA ladder; coluna 2, controle positivo; colunas 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 11, amostras positivas para *A. marginale*; coluna 12, controle negativo 50

APÊNDICE B

FIGURA 1 – Propriedade leiteira com sistema de criação extensiva. Bovinos da raça Girolando voltando do pasto 69

FIGURA 2 – Sistema de criação semi-intensiva, demonstrando vacas da raça Girolando se alimentando no cocho 69

FIGURA 3 – Bovino da raça Girolando apresentando orelha infestada por carrapatos (*R. microplus*) 70

FIGURA 4 – Bovino da raça Girolando apresentando infestação por mosca do chifre (*Haematobia irritans*) 70

FIGURA 5 – Vaca com mucosa vaginal hipocorada 71

FIGURA 6 – Trofozoítos de *B. bigemina* (→) em eritrócito observado em esfregaço de sangue periférico de bovino naturalmente infectado. (Panótico. 100X) 71

FIGURA 7 – Merozoítos de *B. bovis* (→) em eritrócito observado em esfregaço de sangue periférico de bovino naturalmente infectado. (Panótico. 100X) 72

FIGURA 8 – Corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* (→) observados em esfregaço de sangue periférico de bovino naturalmente infectado. (Panótico. 100X) 72

FIGURA 9 – Reação de imunofluorescência indireta. Formas de *B. bigemina* marcadas por isoticianato de fluoresceína (→), demonstrando reatividade 1:40. Aumento: 100X 73

FIGURA 10 – Reação de imunofluorescência indireta. Formas de *B. bovis* marcadas por isoticianato de fluoresceína (→), demonstrando reatividade 1:40. Aumento: 100X 73

FIGURA 11 – Reação de imunofluorescência indireta. Formas de *A. marginale* marcadas por isoticianato de fluoresceína (→), demonstrando reatividade 1:40. Aumento: 100X 74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Soroprevalência, prevalência da infecção por PCR e VG (%) de bovinos da bacia leiteira de Parnaíba, Piauí, Brasil	48
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Etiologia e taxonomia	17
2.2 Transmissão e ciclo de vida	18
2.3 Epidemiologia	21
2.4 Imunidade	23
2.5 Sinais clínicos e patogenia	26
2.6 Patologia	27
2.7 Diagnóstico	28
2.8 Controle	31
3 CAPÍTULO I: Babesiose e anaplasnose em rebanhos bovinos leiteiros do Estado do Piauí, Brasil	35
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA	52
ANEXO	65
APÊNDICE	67

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com grande vocação para pecuária, tendo atualmente no setor produtivo animal, grande importância econômico-social. É o segundo maior produtor de bovinos do mundo, com aproximadamente 205,3 milhões de cabeças (IBGE, 2010). A produção de leite ou carne do país é uma das fontes de renda, principalmente quando se trata das pequenas propriedades rurais.

O Piauí encontra-se em quinto lugar no Nordeste na produção de bovinos, com um rebanho efetivo de, aproximadamente, 1,7 milhões de cabeças. O Norte do Piauí concentra a maior bacia leiteira do Estado, conhecida como Bacia Leiteira de Parnaíba, e possui uma produção anual de leite de cerca de 16 milhões de litros (IBGE, 2010), sendo essa a sua principal atividade econômica (SEBRAE, 2004). Está situada na microrregião Litoral Piauiense, possuindo localização entre as longitudes 41° 39' W e 42° 05' W e latitudes 2° 51' S e 3° 55' S. O bioma vai da Caatinga, passando por uma área de transição até chegar a Cerrado. É composta por nove municípios: Buriti dos Lopes, Caraúbas do Piauí, Caxingó, Ilha Grande, Luis Correia, Murici dos Portelas, Parnaíba, Piracuruca e São José do Divino, que juntos compõem uma área territorial de 7.742 km², com um rebanho efetivo de 79.060 cabeças (IBGE, 2010).

Para se ter um maior aproveitamento econômico da cadeia produtiva animal e melhorar o desenvolvimento da pecuária de modo sustentável, é necessário utilizar novas tecnologias de diagnóstico e adaptar para essa região as tecnologias já existentes, especialmente na área de doenças infecciosas e parasitárias que acometem os animais de produção.

Dentre as enfermidades parasitárias se destaca as pertencentes ao complexo conhecido como Tristeza Parasitária Bovina (TPB), doença conhecida desde o final do século XIX, quando ainda era enfocada como entidade única e não como um complexo. No Brasil são causadas por um dos protozoários do gênero *Babesia* (*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*) e pela rickettsia *Anaplasma marginale* (OLIVEIRA-SEQUEIRA; AMARANTE, 2002). O principal vetor para os três agentes é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo que a anaplasmosose ainda pode ser transmitida mecanicamente pelos dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys* e de forma iatrogênica, através de fômites com sangue contaminado (KOCAN et al., 2010).

Essas enfermidades caracterizam-se clinicamente por uma síndrome hemolítica e febril cuja gravidade está diretamente relacionada à reação do hospedeiro frente à infecção (McCOSKER, 1981). Mundialmente, a TPB é responsável por grandes perdas econômicas,

decorrentes do menor ganho ou perda de peso dos animais parasitados, decréscimo da produção de leite, infertilidade ou subfertilidade dos touros, abortamentos, mortalidade, gastos com medicamentos e serviço médico veterinário, além do estado crônico portador, que interfere no desenvolvimento normal dos animais (ARAÚJO et al., 1998; ADHAM et al., 2009). De acordo com McLeod e Kristjanson (1999), as perdas e os custos com o controle da babesiose e anaplasmose na indústria bovina Australiana é de US\$ 16,9 milhões por ano, na África do Sul esses gastos superam os US\$ 21 milhões por ano, sendo que a Índia aparece com gastos de US\$ 57,2 milhões. Na pecuária brasileira estima-se que os prejuízos atinjam cerca de US\$ 500 milhões de dólares anuais segundo Ministério da Agricultura (GRISI et al., 2002).

Alguns estudos epidemiológicos da TPB têm sido concentrados em regiões do Sudeste e Sul do Brasil, o que implica numa enorme falta de dados epidemiológicos da região Nordeste. Devido principalmente, ao clima, presume-se que poucos conhecimentos sobre TPB dessas regiões possam ser aplicados à região Nordeste.

Acredita-se que o complexo babesiose e anaplasmose bovina seja uma das principais doenças que acometem os bovinos da região Norte do estado do Piauí. No entanto, o estudo epidemiológico e o diagnóstico dessa enfermidade são escassos nessa área, levando grande parte dos Médicos Veterinários a diagnosticar essa doença baseados apenas nos achados clínicos, o que torna impossível o diagnóstico, uma vez que, os sinais clínicos apresentados pelos animais podem ser comuns a várias enfermidades.

O conhecimento das interações que regulam a epidemiologia dos agentes da TPB em cada região geográfica é indispensável para o desenvolvimento e aplicação de medidas de controle que possam interromper a cadeia epidemiológica de modo a reduzir os prejuízos à pecuária. Dessa forma, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para obter melhores estratégias de controle e profilaxia da doença.

Diante dos fatos, torna-se evidente a importância do estudo epidemiológico dessa enfermidade na bacia leiteira de Parnaíba-PI, possibilitando, se necessário, a adoção de medidas profiláticas e terapêuticas adequadas. Além disso, é importante a implantação de um método de diagnóstico moderno e eficaz desta enfermidade no Estado, fornecendo assim, mais um serviço ao veterinário e com isso uma conduta terapêutica correta. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho conhecer alguns aspectos epidemiológicos da TPB, classificando a região estudada como área de estabilidade ou instabilidade enzoótica, bem como implantar os métodos de diagnóstico direto e indireto para detecção desses agentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O complexo de enfermidades conhecido como Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é causado no Brasil por dois agentes etiológicos distintos, porém com sinais clínicos e epidemiologias parecidas, que também podem ser chamadas de babesiose e anaplasmosse bovina. No Brasil, a babesiose bovina é provocada pelos hemoprotozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a anaplasmosse pela rickettsia intra-eritrocitária *Anaplasma marginale* (MOURA et al., 2003; BARROS et al., 2005).

2.1 Etiologia e taxonomia

A babesiose foi descrita pela primeira vez em 1888, na Romênia por Babés (1888), onde sua equipe começou a investigar surtos de uma enfermidade caracterizada por um quadro de anemia hemolítica que acometia bovinos na Europa. Na época foi chamada de hemoglobinúria enzoótica bovina e os animais enfermos apresentavam microorganismos no interior de eritrócitos. Ele acreditava que fosse uma bactéria, a qual foi nomeada de *Haematococcus bovis* (ANGUS, 1996; BOCK et al., 2004).

Em 1893, os pesquisadores americanos Smith e Kilborne demonstraram o organismo causador da “Febre do Texas” (babesiose), a qual possuía sintomas semelhantes à hemoglobinúria enzoótica bovina e conseguiram caracterizar o microorganismo como um protozoário, que foi denominado de *Pyrosoma bigeminum* (= *Babesia bigemina*) (BOCK et al., 2004).

Ainda no ano de 1893, Starcovici verificou a similaridade entre os organismos descritos por Babés, na Romênia, e Smith e Kilborne nos Estados Unidos, e propôs a inclusão de ambos em um novo gênero chamado *Babesia*, em homenagem ao pesquisador romeno (UILENBERG, 2006).

O gênero *Babesia* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiorida, subordem Piroplasmorina e família Babesiidae (LEVINE, 1988; ALLSOPP et al., 1994). São parasitas intraeritrocitários, os quais possuem mais de 100 espécies, que infectam uma ampla variedade de animais domésticos, incluindo bovinos, caninos, felinos, eqüinos, suínos, ovinos, caprinos e roedores, bem como animais silvestres e ocasionalmente, o homem (BOCK et al., 2004; COOKE et al., 2005; CANTU et al., 2007; HUNFELD; HILDEBRANDT;

GRAY, 2008). O primeiro relato dessa enfermidade no Brasil data de 1901, em animais recém-importados e em fase de aclimação no Rio de Janeiro (FONSECA; BRAGA, 1924).

O gênero *Anaplasma* foi citado pela primeira vez como agente causador de doença específica em 1910 por Arnold Theiler, ao reconhecer “pontos marginais” em eritrócitos de bovinos doentes. Nesse mesmo ano, na África do Sul foi descrito uma nova espécie na tentativa de concluir ser um novo protozoário, denominando de *Anaplasma marginale*. Essas inclusões localizadas marginalmente tinham sido vistas frequentemente em eritrócitos de bovinos anêmicos (KOCAN et al., 2010). Anteriormente, por engano haviam concluído que os “pontos marginais” faziam parte do ciclo de vida da *B. bigemina*, mas Theiler (1910) determinou corretamente que babesiose e anaplasmosose eram doenças separadas, co-existindo muitas vezes no mesmo animal, que foi provado através da separação dos dois agentes e produção de uma “infecção pura” com *A. marginale* (FONSECA; BRAGA, 1924).

Atualmente com base em análises genéticas dos genes 16S rRNA, groESL e de genes que codificam proteínas de superfície, a *A. marginale*, uma bactéria Gram-negativa, foi classificada como um organismo pertencente ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae, sendo a espécie mais patogênica e de maior importância para os bovinos (DUMLER et al., 2001). A *Anaplasma* pode infectar ainda, bubalinos, ovinos e caprinos, além de uma variedade de ruminantes silvestres (ZAUGG et al., 1996; MELO et al., 2001).

2.2 Transmissão e ciclo de vida

O principal vetor biológico para os agentes da TPB na Ásia, África, Austrália e Américas do Sul e Central, é o carrapato monoxeno *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, o qual se distribui em regiões tropicais e subtropicais, sendo que a presença das infecções segue a dispersão do vetor (GUGLIELMONE, 1995; FOIL et al., 2004; OIE, 2007).

O ciclo de vida da babesia é formado por três elementos: o vetor, o parasito e o hospedeiro, e se inicia quando os bovinos, hospedeiros intermediários de *Babesia* spp., se infectam pela inoculação de esporozoítos presentes na glândula salivar dos carrapatos no ato do repasto sanguíneo (RIEK, 1964, 1966). A interação esporozoíto-eritrócito é extremamente específica, já que *Babesia* spp. não invadem outro tipo celular, isto implica que existem receptores no eritrócito que são reconhecidos por moléculas complementares no parasito, provavelmente presentes na membrana externa dos esporozoítos (BUSHELL et al., 1991).

A penetração do esporozoíto no eritrócito se dá com a fixação na hemácia, logo após a ligação, há uma reorientação desses esporozoítos sobre a superfície do eritrócito, de maneira que o complexo apical entra em contato com a membrana plasmática. O conteúdo das roptrias e micronemas é liberado sobre a membrana eritrocitária, induzindo à formação de um vacúolo e internalização do esporozoíto. No interior da hemácia hospedeira, a membrana do vacúolo é destruída e o esporozoíto fica em contato com o citoplasma, sendo uma invasão ativa, mas sem que haja o rompimento do eritrócito (VILORIA; SALCEDO, 2001; CHAUVIN et al., 2009). Em seguida, os parasitas transformam-se em trofozoítos, quando se multiplicam por divisão binária (merogonia) dando origem a dois merozoítos; estes rompem o eritrócito e penetram em outro íntegro para continuar a multiplicação (BOCK et al., 2004). Foi identificado também um tipo ovóide de merozoíto, chamado de precursor gamonte, os quais só se desenvolvem após serem ingeridos pelo carrapato (MACKENSTEDT et al., 1995).

O carrapato se infecta quando ingere eritrócitos com *Babesia* spp., sendo que os parasitas degenerados serão destruídos. No entanto, alguns estágios específicos (“pré-gametócitos”) sobrevivem e sofrem alterações morfofisiológicas adaptativas evoluindo para gametócitos, se preparando assim, para o início do ciclo sexuado (CHAUVIN et al., 2009). Estes gametócitos se desenvolvem no intestino do carrapato formando os micros (masculino) e macrogametas (femininos), que se fundem para formar os zigotos, (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Estes penetram nas células do epitélio intestinal do carrapato, e se multiplicam por esquizogonia (esporogonia), dando origem aos esporocinetos, maiores e em forma de arco, que são liberados na hemocele (MOSQUEDA et al., 2004).

Os esporocinetos invadem a hemolinfa do vetor, onde se iniciam ciclos de fissão múltipla nos diversos órgãos da fêmea ingurgitada, principalmente nas fibras musculares e células do ovário, resultando na infecção dos oócitos, caracterizando uma transmissão por via transovariana do *R. (B.) microplus* (MAHONEY; MIRRE, 1979; DA COSTA et al., 1997). Uma vez os ovos infectados, vários ciclos de esquizogonia ocorrem nos embriões e larvas, culminando com a presença de estágios multinucleados nas glândulas salivares dos carrapatos jovens, que irão se dividir para formar os esporozoítos, sendo que esse desenvolvimento só inicia quando o carrapato infectado ataca o hospedeiro vertebrado. Na *B. bigemina* ocorre algum desenvolvimento de esporozoítos na alimentação das larvas, mas os esporozoítos infectantes levam cerca de nove dias para aparecer, sendo então transmitida por ninfas e adultos de *R. (B.) microplus*, que mantém a infecção por várias gerações (BOCK et al., 2004). No caso da *B. bovis* a formação de esporozoítos infectantes ocorre geralmente dentro de dois a três dias após fixação

do estágio larval, sendo transmitida somente nesse estágio, perdendo a infecção após a alimentação (RIEK, 1966). O período de incubação de *B. bovis* varia de 6 a 12 dias e de *B. bigemina* de 12 a 18 dias após a fixação dos carrapatos (BOCK et al., 2004).

A transmissão biológica de *A. marginale* é feita por mais de 20 espécies de carrapatos em todo o mundo (KOCAN et al., 2004). Os gêneros de maior importância na transmissão desse agente nas Américas é o *Dermacentor* e *Rhipicephalus*, e essa transmissão pode ser interestadial ou transestadial (que ocorre de estágio para estágio), e intraestadial (que ocorre dentro do mesmo estágio), sendo enfatizada a importância epidemiológica dos carrapatos machos, devido a sua grande mobilidade e longevidade (KESSLER, 2001).

Além da transmissão por carrapatos, a *A. marginale* também pode ocorrer mecanicamente por outros artrópodes, tais como mosquitos e moscas hematófagas; de forma iatrogênica por fômites contaminado com sangue, tais como agulhas, instrumentos de castração, descorna e tatuagem; via transfusão sanguínea e congenitamente (RIBEIRO et al., 1995; KESSLER, 2001; SOUZA et al., 2001; DREHER et al., 2005; KOCAN et al., 2010).

A transmissão mecânica por dípteros hematófagos, principalmente os dos gêneros *Tabanus*, *Stomoxys*, *Chrysops*, *Siphona* e os mosquitos do gênero *Culex* e *Aedes* (FOIL, 1989; SCOLES et al., 2005) é uma realidade, esses insetos ao se alimentarem nos animais têm o repasto sanguíneo interrompido por ser um processo doloroso ao hospedeiro, sendo forçados a completar sua alimentação em outros animais de rebanho, dessa forma, a rickettsia mantém sua viabilidade na peças bucais dos vetores por até duas horas, possibilitando essa transmissão mecânica (POTGIETER; SUTHERLAND; BIGGS, 1981; FOIL, 1989). Essa forma de transmissão mecânica é provavelmente o principal meio de disseminação da *A. marginale* em determinadas zonas dos EUA, América Central e do Sul e África, onde os vetores carrapatos estão ausentes (KOCAN et al., 2010).

No ciclo da *A. marginale* os corpúsculos iniciais, adquiridos biológica ou mecanicamente pelo hospedeiro susceptível, após atingirem a corrente sanguínea aderem-se aos eritrócitos por meio de moléculas adesivas de membrana (de la FUENTE et al., 2001), promovendo a invaginação da membrana eritrocítica até seu total englobamento, dando origem a um vacúolo, em seguida, esses corpúsculos sofrem sucessivas fissões binárias até atingirem um número de quatro a oito novos corpúsculos iniciais, que se deslocam em direção a periferia do eritrócito, até a fusão do mesmo com a membrana celular, esses corpúsculos deixam o eritrócito sem rompê-lo e invadem outras células vermelhas, dando continuidade ao ciclo (RISTIC; WATRACH, 1963; KOCAN et al., 2010).

O desenvolvimento de *A. marginale* em carrapatos é complexo e coordenado pelo ciclo de alimentação do artrópode (KOCAN et al., 2003). Os eritrócitos infectados ingeridos durante o repasto sangüíneo do carrapato são a fonte de infecção para suas células intestinais. De forma semelhante ao que acontece no hospedeiro vertebrado, *A. marginale* se desenvolve em vacúolos formados pela invaginação da membrana celular das células dos vetores, a primeira forma vista na colônia é a reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. Essa forma evolui para a forma denominada “corpos densos”, que é a forma infectante e é capaz de sobreviver por um curto período de tempo no meio extracelular (KOCAN et al., 2010). Após o desenvolvimento de *A. marginale* no intestino, muitos outros tecidos do carrapato são infectados, incluindo as glândulas salivares, a partir das quais a rickettsia é transmitida para os vertebrados durante a alimentação do carrapato (GE et al., 1996; KOCAN et al., 2010). O período de incubação da infecção varia de 7 a 60 dias, com média de 28 dias (GALE et al., 1996; KOCAN et al., 2010).

2.3 Epidemiologia

No Brasil, o principal transmissor da TPB ainda é o *R. (B.) microplus*, este encontra condições favoráveis ao seu desenvolvimento, incidindo em todo o território com intensidade de parasitismo variando em função das condições climáticas, do manejo de rebanhos e pastagens e da raça dos bovinos explorados (GOMES, 1998), podendo completar até cinco gerações por ano, dependendo das temperaturas médias anuais, que devem está em torno de 27° C com precipitações pluviométricas adequadas e umidade relativa de aproximadamente 70% (FURLONG; EVANS, 1991; BARROS et al., 2006). Nas regiões com períodos intensos de secas, existe limitação da sobrevivência do carrapato, ocorrendo geralmente paralisação na incubação, postura, e até mesmo fracasso desses estágios (BARROS et al., 2005).

No que se diz respeito à epidemiologia da babesiose, há evidências de que a raça dos bovinos também interfere na gravidade das infecções (GUGLIELMONE, 1992; JONSSON et al., 2000; BOCK et al., 2004), sendo as raças zebuínas mais resistentes do que as taurinas (MADRUGA et al., 1984; UILENBERG, 1995; BOCK et al., 2004). Os animais jovens têm alta resistência à babesiose clínica devido à presença de anticorpos colostrais, à maior atividade eritropoética da medula óssea, à função protetora da hemoglobina fetal e à rápida atividade da imunidade inata (BOCK et al., 2004).

A distribuição geográfica da babesiose é limitada pela presença do carrapato vetor, que necessita de fatores ambientais favoráveis para completar seu ciclo biológico. Condições climáticas tropicais e subtropicais favorecem o desenvolvimento do carrapato e conferem à babesiose características de estabilidade endêmica. Nos locais onde o clima limita o desenvolvimento do *R. (B.) microplus*, tornando, desse modo, a transmissão irregular, situações de instabilidade endêmica são criadas, ocorrendo surtos de babesiose (BARCI et al., 1994).

A anaplasmose bovina encontra-se distribuída por todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta. É considerada endêmica em vários países das Américas Central e do Sul além do Caribe, com exceção as áreas de deserto e de elevadas altitudes como os Andes (GUGLIELMONE, 1995). Nos Estados Unidos, *A. marginale* é enzoótica em vários estados do sudeste, ao longo da costa do Atlântico, e estados da região oeste (KOCAN et al., 2010). A bactéria já foi relatada também em países europeus (KOCAN; BLOUIN; BARBET, 2000).

A situação epidemiológica da TPB no Brasil está relacionada às condições climáticas, que afetam diretamente o ciclo de vida livre do carrapato vetor, sendo que ocorrem três diferentes situações segundo Mahoney (1974) e Kessler e Schenk (1998):

- 1) Áreas livres da doença, onde as condições climáticas são desfavoráveis ao desenvolvimento do carrapato, não ocorrendo TPB devido à ausência do vetor, mas os bovinos não desenvolvem imunidade natural. É o caso do extremo Sul do Rio Grande do Sul, onde todos os animais são susceptíveis e a doença só ocorre quando há entrada acidental de carrapatos infectados em períodos favoráveis, ou quando os bovinos portadores de *Babesia* spp. ou *Anaplasma* são introduzidos nessa região;
- 2) Áreas de instabilidade enzoótica, onde o ciclo do carrapato é interrompido por alguns meses devido às condições climáticas adversas, seja por baixas ou altas temperaturas, com conseqüente queda do nível de anticorpos contra os agentes da TPB. Nessa situação existe a possibilidade de ocorrência de um grande número de casos clínicos, geralmente de curso agudo e com alta taxa de mortalidade (UILEMBERG, 1995). Essas áreas podem ser observadas nas fronteiras entre Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, e em algumas áreas do nordeste, como o sertão da Bahia, Sergipe, Pernambuco e Ceará, devido à seca (OLIVEIRA; PEDREIRA; ALMEIDA, 1992). Uma região é considerada de instabilidade enzoótica, quando o percentual de animais sorologicamente positivos para essa enfermidade for de 10%-75% (MAHONEY, 1974);
- 3) Áreas de estabilidade enzoótica, onde o desenvolvimento do vetor ocorre durante todo o ano, devido às condições climáticas favoráveis, existindo equilíbrio entre imunidade e

doença, sendo 75% dos animais com idade acima de nove meses portadores de hemoparasitos (GONÇALVES, 2000). Isso significa que a maior parte desses animais está adquirindo a infecção ainda como bezerras, devido à queda de anticorpos contra *Babesia* e *Anaplasma* (GONÇALVES, 2000; BARROS et al., 2006). Nesses rebanhos, são raros os casos de doença clínica e a maior parte do território brasileiro possui estabilidade endêmica, como as regiões Sudeste, Centro-Oeste, semi-árido baiano e região do Cariri, estado da Paraíba (MAHONEY, 1974; KESSLER et al., 1983; BARROS et al., 2005).

O controle intensivo de carrapatos em algumas regiões é apontado como sendo um importante fator criador de áreas de instabilidade enzoótica (VIEIRA et al., 2002; SWAI et al., 2005). Tem-se observado condições de estabilidade enzoótica para anaplasmose em regiões onde o carrapato *R. (B.) microplus* não encontra condições adequadas para o seu desenvolvimento durante todo o ano, isso pode ser explicado pela influência dos dípteros hematófagos na manutenção dessa situação epidemiológica (BARROS et al., 2005).

No estado do Piauí, os estudos relacionados à babesiose e anaplasmose bovina são escassos. Acredita-se que a prevalência da doença no Estado seja elevada, visto que os fatores epidemiológicos são propícios à proliferação de carrapatos e dípteros hematófagos. No entanto, o diagnóstico desse complexo ainda é presuntivo, baseado somente nos sinais clínicos.

2.4 Imunidade

A resposta imunológica dos bovinos à infecção por *Babesia* spp. envolve tanto mecanismos inatos como adquiridos. A imunidade inata está relacionada a fatores como especificidade parasito-hospedeiro, características genéticas, idade e resposta imune celular do hospedeiro. Animais esplenectomizados parecem desenvolver uma maior parasitemia do que animais infectados primariamente. Estas observações implicam que o baço desempenha um importante papel na resposta contra *Babesia* spp. (BOCK et al., 2004).

Os mecanismos imunes no hospedeiro vertebrado são direcionados contra os eritrócitos infectados com *Babesia* spp. ou contra os merozoítos livres. A degeneração dos parasitas parece ser causada mais pela resposta imune celular do que pela imune humoral (ZINTL et al., 2005). Durante a infecção aguda, a resposta imune inata parece ser essencial e requer a produção de interleucinas IL-12 e IL-18. Essas estimulam as células “natural killer” (NK) a produzirem grandes quantidades de interferon gama (INF- γ) (SHODA et al., 2000; GARCIA et al., 2004; GOFF et al., 2006), que induz a produção de óxido nítrico (ON) pelos macrófagos (GOFF et al.,

2006). A evolução da infecção aguda depende do tempo e localização da produção de citocinas inflamatórias pela resposta do tipo Th1, bem como das quantidades produzidas. A comparação entre a resposta imune dos bezerros e bovinos adultos contra *B. bovis* mostrou que a resposta imune inata somente é protetora se o INF- γ e IL-12 forem produzidas antes da produção de IL-10. Quando IL-10, IL-12 e INF- γ são produzidos ao mesmo tempo, a resposta do tipo Th1 e a produção de ON no baço são atrasadas ou diminuídas, o que permite a expressão da doença (GOFF et al., 2001).

Durante a fase crônica (resposta adaptativa), a lise de eritrócitos infectados é também mediada pelo ON produzido por macrófagos esplênicos ativados por INF- γ e TNF α . Esse mecanismo, em seguida é regulado por citocinas tipo Th1 e é inibido por IL-4 e IL-10 (CHAUVIN et al., 2009). A resposta imune humoral não permite a remoção do parasita, mas vários mecanismos ajudam a controlar a parasitemia (BROWN, 2001) como: a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) mediada por IgG1, a opsonização mediada por IgG2, a neutralização de aderência dos merozoítos livres em eritrócitos e da citoaderência de eritrócitos infectados às células endoteliais (BROWN et al., 2006) e a ativação do complemento mediado por IgG1 e IgG2 (CHAUVIN et al., 2009). Ainda durante essa fase, a persistência dos baixos níveis de parasita requer ativação da resposta imune adaptativa com ativação dos linfócitos Th0 ou Th1 para produção de anticorpos IgG, especialmente o opsonizante IgG2 e mecanismos de lise de eritrócitos infectados mediado por macrófagos e ON (BROWN, 2001).

Diferentemente do que acontece com os agentes da anaplasnose bovina, não existe imunidade cruzada entre *B. bovis* e *B. bigemina*, ou seja, a infecção por uma dessas espécies não protege o animal contra a outra (SMITH et al., 1980).

A resposta imunológica dos bovinos infectados por *A. marginale* envolve tanto mecanismos de origem humoral quanto celular, tendo o baço importante função no desenvolvimento e manutenção dessa imunidade (VIDOTTO; MARANA, 2001). A remoção do baço deixa os bezerros totalmente susceptíveis à infecção, e a anaplasnose em bezerros esplenectomizados é geralmente mais grave do que a observada em bovinos adultos (KOCAN et al., 2004). O baço possui uma importante função tanto na defesa imune celular, quanto na formação de anticorpos IgM, que aparecem após a infecção, tendo atividade de fixação de complemento (TIZARD, 2009).

Na infecção por *A. marginale*, a resposta imune requer também uma eficiente indução de uma resposta do tipo Th1, mediada principalmente por linfócitos T CD4+, produzindo altos níveis de INF γ , ativando macrófagos e estimulando linfócitos B a produzirem altos níveis de

anticorpos da classe IgG2 (PALMER et al., 1999). De fato, a opsonização, fagocitose e morte dos microorganismos, mediada pelos anticorpos IgG2 e macrófagos ativados, parecem ser a peça fundamental para um eficiente controle de *A. marginale* em bovinos (KOCAN et al., 2010). Anticorpos dirigidos contra as proteínas principais de superfície de *A. marginale*, foram associados à proteção contra riquetsemia e anemia (TEBELE; McGUIRE; PALMER, 1991). No entanto, a transferência passiva de anticorpos apenas, mostrou-se insuficiente para proteger bovinos contra desafio experimental (GALE et al., 1992), o que reforça a necessidade de uma resposta conjunta mediada por células e anticorpos para o efetivo controle da infecção.

O INF γ , produzido por linfócitos T CD4+, é o principal responsável pelo aumento da produção de IgG2 pelos linfócitos B em bovinos (ESTES; BROWN, 2002) e ativação de macrófagos para produção de ON, que é tóxico para a rickettsia, além de aumentar nestas células a expressão dos receptores *Fc* que aumenta sua capacidade fagocítica (PALMER et al., 1999). A resposta imune contra *A. marginale*, tem como principais alvos as proteínas de membrana da riquetsia. Diversos epítomos para linfócitos T e B, tem sido identificados em suas proteínas principais de superfície (ABBOTT et al., 2004; BROWN et al., 2004).

Semelhantemente a outras riquetsias, como *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia chaffeensis*, é provável que além da variação antigênica, *A. marginale* possua outros mecanismos para evadir-se da resposta imune do hospedeiro. A ausência de genes necessários para a biossíntese de moléculas como lipopolissacarídeo (LPS) e peptidoglicano é um bom exemplo disso (BRAYTON et al., 2005; LIN; RIKIHISA, 2003), uma vez que o reconhecimento dessas moléculas por receptores de reconhecimento padrão como os *Toll-like* do hospedeiro, desencadeia uma forte resposta imune inata contra a riquetsia, a sua ausência então, facilita a adaptação da riquetsia as células dos hospedeiros vertebrados e invertebrados (RIKIHISA et al., 2006).

Os bovinos que sobrevivem à fase inicial da infecção tornam-se portadores, porém com baixos níveis de parasitemia, o que geralmente não é suficiente para desencadear os sinais típicos da doença (PALMER; BROWN; RURANGIRWA, 2000). Embora essa imunidade seja duradoura e impeça novas infecções, os bovinos persistentemente infectados se portam como fonte de infecção para os artrópodes vetores, favorecendo o trânsito da rickettsia no rebanho (GUGLIELMONE, 1995).

2.5 Sinais clínicos e patogenia

Os sinais clínicos da TPB caracterizam-se por apatia, febre, anorexia, emagrecimento, taquicardia, taquipnéia, redução dos movimentos de ruminção, diminuição ou suspensão da lactação, anemia e icterícia; observam-se também aborto, relatado somente na anaplasnose; hemoglobinemia e hemoglobinúria, vistos apenas nas babesioses, podendo evoluir para a morte do animal (BOCK et al., 2004; RADOSTITS et al., 2007; KOCAN et al., 2010).

Durante a infecção aguda com *B. bovis* o desequilíbrio na produção de citocinas pró-inflamatórias e de ON contribui para o progresso da doença causando vasodilatação, hipotensão arterial, aumento da permeabilidade capilar, edema, colapso vascular, distúrbios de coagulação, dano endotelial e estase circulatória (AHMED, 2002). Apesar de a estase ser induzida na microcirculação por agregação de eritrócitos infectados no leito capilar, provavelmente a lesão patofisiológica mais deletéria ocorra no cérebro e pulmão. Isso pode resultar em babesiose cerebral e síndrome da angústia respiratória associada com infiltração de neutrófilos, permeabilidade vascular e edema (BROWN; PALMER, 1999).

Dessa forma podem ocorrer manifestações nervosas, tais como incoordenação motora, andar cambaleante, movimentos de pedalagem, convulsão, opistótono, coma e morte (RODRIGUES et al., 2005; RADOSTITIS et al., 2007). Essa sintomatologia é consequência das modificações na membrana dos eritrócitos e expressão de proteínas de superfície que medeiam a adesão dos eritrócitos nas células endoteliais dos capilares, seguidos de sequestro de hemácias parasitadas e não parasitadas, causando obstrução vascular, anóxia tecidual e lesões graves com perda da função do órgão (VILORIA; SALCEDO, 2004). A anóxia tecidual resultante da obstrução vascular leva a necrose e à liberação local de fatores pró-inflamatórios que induzem a quimiotaxia e diapedese de leucócitos. Os neutrófilos infiltrados desgranulam enzimas proteolíticas, intensificando as lesões iniciadas pela anóxia. Macrófagos também são atraídos aos locais inflamados e secretam citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF α , IFN γ e IL-1, as quais estimulam as células endoteliais a expressar moléculas de adesão, aumentando o processo de infiltração dessas células (BROWN; PALMER 1999).

Na babesiose cerebral o curso clínico é, geralmente, mais rápido do que na babesiose por *B. bigemina* e anaplasnose (RODRIGUES et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006). A infecção por *Babesia* spp. é capaz de causar danos celulares e tissulares em decorrência da hemólise intravascular e da consequente hipóxia tecidual ocasionada pela diminuição de eritrócitos circulantes, que afeta principalmente o fígado e os rins (MENDONÇA et al., 2003).

Na anaplasmosose os sinais clínicos agudos são mais comumente encontrados em bovinos com idade superior a um ano de idade, sendo que os principais prejuízos estão ligados ao sistema reprodutivo, a animais de raça e a vacas com alta produção de leite. Segundo Kocan et al. (2010), vacas em estado avançado de gravidez e/ou lactação podem ter recaídas e desenvolver sinais de infecção aguda. Tais eventos estariam relacionados com a imunossupressão associada ao período peri-parto em vacas. As vacas em lactação sofrem queda na produção de leite e vacas prenhes podem abortar, além disso, os touros desenvolvem infertilidade temporária (KOCAN et al., 2010).

Dentre as principais alterações hematológicas na babesiose, a anemia, que no início é normocítica normocrômica, torna-se macrocítica normocrômica pela presença de reticulócitos. Isto é resultado direto da hemólise intravascular que é consequência da reprodução e evasão dos merozóitos, causando o rompimento dos eritrócitos parasitados. Ao mesmo tempo, ocorre a deposição de metabólitos do parasita sobre a membrana celular de vários eritrócitos, fazendo com o que eritrócitos normais que apresentam complexos estranhos em sua superfície, sejam fagocitados (MURASE et al., 1996). Já na anaplasmosose inicialmente, o número de eritrócitos parasitados aumenta exponencialmente, quando então são fagocitados por células do sistema mononuclear fagocítico (SMF), resultando em anemia e icterícia, sem que ocorra hemoglobinemia e hemoglobinúria (FUENTE et al., 2001), dessa forma, a medida que cai o volume globular (VG), coincidindo com o aumento da parasitemia os animais tornam-se fraco, anorético e apático (KOCAN et al., 2010).

2.6 Patologia

Os achados de necropsia na babesiose e anaplasmosose incluem carcaça, mucosas e serosas anêmicas ou ictericas, fígado amarelado e baço escuro, ambos aumentados e congestos, linfonodos e rins aumentados e escuros, vesícula biliar distendida, com bile escura, densa e grumosa, hemorragias peri e endocárdicas e hidropericárdio (COETZEE et al., 2005; BARROS et al., 2006). A coloração vermelho-cereja do córtex cerebral e cerebelar é uma lesão característica da babesiose por *B. bovis*, urina vermelho-escuro é observada na babesiose por *B. bigemina* ou levemente avermelhada (na babesiose por *B. bovis*). Em casos de hemoglobinúria prolongada os rins podem estar marrom escuro, às vezes com edema perirenal, devidos à nefrose hemoglobinúrica (BOCK et al., 2004; FARIAS, 2007).

As lesões histopatológicas mais frequentes da TPB encontradas no fígado são distensão dos sinusóides e degeneração de hepatócitos. O cérebro apresenta congestão capilar, edema perivascular e pequenas hemorragias, os rins nefrose e congestão vascular e ainda nefrose hemoglobinúrica em casos de *B. bigemina* (FARIAS, 2007).

2.7 Diagnóstico

No diagnóstico da TPB, devem ser levados em conta os dados epidemiológicos, sinais clínicos e lesões observadas em necropsia (KOCAN et al., 2010). Sendo que, os exames laboratoriais são fundamentais para a confirmação da enfermidade.

O exame direto, por meio de esfregaços sanguíneos colhidos de sangue periférico de animais na fase aguda com parasitemia elevada, corados com corantes do tipo Romanowsky e modificações deste (Giemsa, Leishman, Wrigth e Panótico), consiste em uma ferramenta importante para confirmação do diagnóstico clínico (BOCK et al., 2004; KOCAN et al., 2010), sendo um dos principais métodos de diagnóstico empregado na infecção clínica, pois além da praticidade é o método que apresenta menor custo (BÖSE et al., 1995). Entretanto, a baixa sensibilidade dessa técnica é um fator limitante para a aplicação em estudos epidemiológicos, em decorrência da incapacidade de se detectar animais cronicamente infectados convertidos ao estado de portador (BÖSE et al., 1995; COSTA JUNIOR et al., 2006).

As técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos específicos têm sido freqüentemente empregadas em estudos epidemiológicos da babesiose e anaplasnose, e com base no *status* imunológico dos animais é possível definir a situação epidemiológica das diferentes regiões de ocorrência dessas enfermidades (MAHONEY; WRIGHT; MIRRE, 1973; BARROS et al., 2005). Essas técnicas são ainda capazes de verificar a presença e intensidade de anticorpos específicos no soro de animais e serve indiretamente como indicador da presença do agente (MAHONEY; WRIGHT; MIRRE, 1973).

Muitos testes sorológicos foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos anti-*Babesia* spp. e anti-*A. marginale*, porém as técnicas mais rotineiramente empregadas são: Fixação do Complemento (FC), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireta (ELISA-I) (McGUIRE et al., 1991; BÖSE et al., 1995).

O teste de fixação de complemento é primariamente utilizado para detecção de anticorpos IgM, ou seja, de animais recentemente infectados (BÖSE et al., 1995). A

sensibilidade do teste diminui com o curso da infecção e sua utilização é limitada em áreas de endemia estável para *Babesia* spp e *A. marginale*. (REITER; WEILAND, 1989).

A RIFI é uma técnica sorológica amplamente empregada, tem baixo custo, porém, além de ser mais laboriosa, tem a desvantagem da subjetividade do diagnóstico, do número limitante de amostras, por ser extenuante ao leitor e nem sempre é muito específica (BÖSE et al., 1995). Em trabalhos com a utilização do teste sorológico RIFI, várias regiões do Brasil foram consideradas endêmicas, como a microrregião de Goiânia, cuja prevalência foi de 94,4% para *B. bigemina* e 100% para *B. bovis* (SANTOS; LINHARES; MADRUGA, 2001). No entanto, Madruga et al. (2000b) determinaram para *B. bigemina*, em quatro municípios do estado do Rio de Janeiro a prevalência de 94,03%, enquanto no estado de Pernambuco essa prevalência pelo foi de 87,9% (ALVES, 1987). No município de Pindamonhangaba, São Paulo, a babesiose apresentou uma frequência de 88,0% para *B. bovis* e 94,0% para *B. bigemina* (BARCI et al., 1994). Nos municípios de Feira de Santana, Jequié, Ilhéus, Itabuna e Vitória da Conquista, na Bahia, a prevalência média de *B. bovis* e *B. bigemina* foi de 97,2% e 99,0%, respectivamente (ARAÚJO et al., 1997). No estado de Minas Gerais, a anaplasmoze bovina foi detectada no Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba, Sul de Minas e Zona Metalúrgica, onde foram encontrados, respectivamente, 86,1%, 96,5%, 91,6% e 93,1% de bovinos soropositivos para essa enfermidade (RIBEIRO; REIS, 1981).

O ELISA-I, nas últimas décadas tem substituído as demais técnicas sorológicas para o diagnóstico de *Babesia* spp. e *A. marginale* (MADRUGA et al., 2000a, 2000b; SOARES et al., 2000; MADRUGA et al., 2001; D'ANDREA et al., 2006). No entanto, a sensibilidade e a especificidade dos exames são grandemente influenciadas pela qualidade do antígeno utilizado. A técnica de ELISA-I tem as vantagens de ser objetiva, possibilitar a avaliação de um grande número de amostras em curto intervalo de tempo, e de utilizar leitura mecanizada e rápida, (SOARES, 2001). Souza et al. (2000a, 2000b) ao analisarem 532 amostras de soro de bovinos do Norte Fluminense, RJ, demonstraram que 91,16% e 69,74% desses soros foram positivos ao ELISA-I para *A. marginale* e *B. bigemina*, respectivamente. No Nordeste, foi detectado prevalência de 27,9% em Garanhuns-PE (ALVES, 1987); 35,8% no Cariri-PB, 56,9% no Boqueirão-PB (MADRUGA et al., 1993); 56,4% em Juazeiro-BA e 63,7% em Uauá-BA (MENK et al., 1999) para *B. bovis*. Já no Rio Grande do Sul, a prevalência detectada com este diagnóstico para a *A. marginale* foi de 64,0% (ARTILES et al., 1995), enquanto, Santos; Linhares e Madruga (2001), demonstraram ainda, prevalência de 98,9% e 93,3% em Goiânia, para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente.

Apesar de apresentarem elevadas sensibilidade e especificidade, uma das principais limitações dos métodos sorológicos é que eles apenas indicam a exposição ao agente infeccioso, não informando sobre o curso da infecção (WAGNER et al., 1992).

Os avanços obtidos no campo da biologia molecular tornaram possível o desenvolvimento de novas metodologias para diagnóstico de parasitas baseadas na detecção de DNA, proporcionando o diagnóstico direto de diversos agentes etiológicos de enfermidades de importância sanitária e econômica para humanos e animais (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003; LEW; JORGENSEN, 2005). Atualmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem sido bastante utilizada na investigação desses parasitas, uma vez que apresenta sensibilidade cerca de 100 vezes maior que a técnica de esfregaço sanguíneo, detectando cerca de 10 pg de DNA do parasita nas amostras de sangue (BÖSE et al., 1995), e podendo ter essa sensibilidade aumentada ainda mais pela utilização da técnica de *nested* PCR (nPCR) (COSTA JUNIOR et al., 2006).

A técnica de PCR é um processo enzimático *in vitro* para a síntese de sequências de DNA, que permite amplificar milhões de cópias de uma região específica do genoma de qualquer organismo, possibilitando o diagnóstico específico com elevada sensibilidade. (BÖSE et al., 1995; FIGUEROA et al., 1996). Já a nPCR é uma alternativa de execução da PCR que visa proporcionar uma maior sensibilidade e especificidade. Nessa forma de PCR, o produto amplificado (amplicon) é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando oligonucleotídeos iniciadores homólogos às sequências internas do segmento já amplificado. Geralmente na primeira PCR é utilizado um oligonucleotídeo iniciador gênero-específico e na segunda PCR um oligonucleotídeo iniciador espécie-específico do agente em estudo (RAMPERSAD et al., 2003, QUEIROZ; VALADARES-INGLIS; INGLIS, 2004).

A aplicação das técnicas baseadas na PCR no diagnóstico da TPB tem como principal vantagem a possibilidade de discriminar animais soronegativos infectados, como por exemplo, animais em fases iniciais da infecção (COSSÍO-BAYÚGAR et al., 1997) e distinguir animais soropositivos infectados de animais vacinados (GALE et al., 1996). Essas técnicas permitem ainda a confirmação da presença e a discriminação dos parasitos quando em níveis muito baixos no sangue de animais portadores sadios, sendo fundamental para a elaboração de programas de controle da doença (ALMERIA et al., 2001).

A alta especificidade e sensibilidade analítica da PCR, que já foram verificadas por vários autores (SMEENK et al., 2000; ALMERIA et al., 2001; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005; PEREIRA, 2006), o que tornaram esta técnica uma ferramenta valiosa para realizar

estudos epidemiológicos em uma determinada região, permitindo traçar medidas de controle eficazes, principalmente em casos de infecções latentes nos bovinos (FIGUEROA et al., 1992). Essa sensibilidade estimada por PCR e nPCR em bovinos de São Carlos, estado de São Paulo para *B. bigemina* correspondeu a parasitemia de 0,00003 e 0,0000003%, respectivamente. Para *B. bovis* a parasitemia correspondente para PCR foi de 0,000017% e 0,00000017% para nPCR (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005). No caso da *A. marginale* os parasitas em amostras de sangue com parasitemia de 0,01% a 0,00015% foram facilmente detectados (GALE et al., 1996).

2.8 Controle

A elaboração de estratégias adequadas de controle depende, principalmente, de informações sobre a epidemiologia da babesiose e anaplasiose, especialmente na dinâmica da transmissão pelo carrapato (MORZARIA et al., 1992). O grande paradoxo no controle dessas enfermidades são os animais persistentemente infectados. Esses apesar de possuírem uma ótima imunidade contra o desenvolvimento da doença clínica representam o principal reservatório de infecção para animais susceptíveis (KOCAN et al., 2000).

Embora os métodos de controle não tenham avançado muito ao longo das últimas décadas, os mesmos variam entre diferentes regiões geográficas, e incluem o controle de vetores, através da aplicação de acaricidas, administração profilática de quimioterápicos e vacinação (BOCK et al., 2004; KOCAN et al., 2010).

O controle de vetores, principalmente de carrapatos, por meio da utilização de acaricidas requer altos investimentos, e seu uso prolongado pode tornar a população bovina susceptível, podendo ocorrer infecção quando a utilização desses acaricidas são interrompidas ou quando ocorre resistência dos carrapatos aos princípios ativos utilizados (GOMES, 1998). Dessa forma, esse controle pode ser implementado em dois níveis: erradicação e controle estratégico dos carrapatos, sendo que a estratégia escolhida será de acordo com a epidemiologia da região (GONÇALVES, 2000).

No Brasil, é utilizado o controle estratégico em determinadas áreas, como nos municípios de Lavras e Entre Rios, em Minas Gerais (OLIVEIRA, 1993) e na microrregião Fluminense do Grande Rio, estado do Rio de Janeiro (SANTOS JÚNIOR; FURLONG; DAEMON, 2000), mas frequentemente, observa-se o uso indiscriminado de produtos carrapaticidas. O carrapato não deve ser erradicado da propriedade, e sim controlado, de forma

que os animais sejam parasitados durante todo o ano com infestações baixas, permitindo assim doses infectantes adequadas de *Babesia* spp. e *A. marginale* (GONÇALVES, 2000).

Nas áreas endêmicas, deve-se evitar a superinfestação por carrapatos, através de um manejo eficaz, como por exemplo, a aplicação de banhos estratégicos (BOCK et al., 2004). Em regiões estáveis, é importante que os bezerros sejam expostos à infestação pelo carrapato para que se tornem adultos imunes, constituindo uma medida profilática natural (MAHONEY; ROSS, 1972). Em áreas de instabilidade enzoótica o controle é mais difícil, nessas regiões, o conhecimento do estado imunológico do rebanho é importante para poder decidir pela utilização, ou não, de métodos de controle e imunização (GONÇALVES, 2000). Nas áreas livres deve-se evitar a entrada de agentes e vetores, os quais podem provocar surtos, bem como os animais destas áreas, devem ser protegidos antes de serem transportados para regiões endêmicas (VANZINI; RAMIREZ, 1995).

Para a anaplasmose, o controle de carrapatos só protege parcialmente contra a sua transmissão, visto que, essa ocorre muitas vezes por transmissão mecânica por fômites com sangue infectado e por moscas hematófagas (KOCAN et al., 2010). Por esse motivo, deve-se manter o controle de moscas na propriedade, principalmente nas estações chuvosas, quando a população de dípteros hematófagos é maior, controlando assim as taxas de infecção por *A. marginale* (GONÇALVES, 2000).

A quimioprofilaxia baseia-se no uso de drogas específicas em doses subterapêuticas, sendo uma maneira de imunizar os animais com a utilização de químicos como, por exemplo, o dipropionato de imidocarb para babesiose e anaplasmose e as tetraciclina para anaplasmose (KOCAN et al., 2010). Na babesiose, tem-se empregado imidocarb com resultados satisfatórios nos bezerros ao serem colocados a pasto. Esse procedimento evita a presença do agente no organismo ou mantém sua população em níveis subclínicos, estabelecendo o estado de portador ao animal (GONÇALVES, 2000). A quimioterapia mediada por antibióticos, principalmente os do grupo das tetraciclina, foi testada no controle da anaplasmose em 1950 e até hoje é utilizada extensivamente em algumas partes do mundo, principalmente nos Estados Unidos (KOCAN et al., 2000) de forma curativa ou até mesmo profilática. Adicionalmente, ao contrário do que se pensava, a quimio-esterilização promovida pela antibioticoterapia, não é alcançada mesmo com a utilização de doses elevadas de tetraciclina (COETZEE et al., 2005). Logo, embora a utilização de tetraciclina seja justificável curativamente, os animais continuam como reservatórios da riquetsia (KOCAN et al., 2000). Além disso, o uso intensivo de antibióticos leva ao risco da emergência de resistência dos microrganismos (KOCAN et al., 2010).

Vários métodos de vacinação têm sido desenvolvidos e estudados em condições de laboratório e de campo, como medidas imunoproláticas contra a babesiose e anaplasiose bovina, sendo esse método uma maneira econômica e eficaz no controle dessas enfermidades (CALLOW; MELLORS, 1966).

No caso da babesiose bovina, na grande maioria, utilizam-se como vacinas sangue infectado de animais geralmente esplenectomizados, contendo formas vivas atenuadas ou inativadas e com o advento da tecnologia do DNA recombinante surgiram também as vacinas recombinantes (GUGLIELMONE, 1995). Segundo Sacco; Kessler e Madruga (2001) a imunização de bovinos com amostras atenuadas desses parasitas, demonstrou ser inócua, imunogênica e eficiente. Já com a vacina recombinante, apesar dos trabalhos já realizados apresentarem sucesso limitado, muitos pesquisadores acreditam que a vacina ideal contra babesiose bovina só será produzida através da biotecnologia, seja através da clonagem de genes e expressão de proteínas recombinantes ou pela síntese bioquímica de polipeptídeos (GONÇALVES, 2000).

Para anaplasiose, existem atualmente, três tipos de vacinas desenvolvidas. A vacina atenuada, que utiliza amostra de *A. marginale*, a qual é submetida à indução de mutação, pela exposição à radiação e seleção após duas passagens seriadas em cervídeos e ovelhas. Após aplicação, os animais desenvolvem resposta imunológica humoral e celular, sendo a proteção fornecida por essa vacina pouco confiável (KOCAN et al., 2003). Outro tipo é a vacina viva que envolve a infecção de bovinos via inoculação com eritrócitos parasitados com um isolado menos patogênico de *A. marginale* ou *Anaplasma centrale*. A utilização de cepas virulentas de *A. marginale* como imunógeno em bovinos requer monitoramento constante dos animais vacinados e tratamento com tetraciclina aos primeiros sinais de doença clínica. Os bovinos tornam-se persistentemente infectados sem passar pela fase aguda da doença. Essa estratégia de vacinação tem custos elevados e muitas vezes mostra-se impraticável, principalmente quando um grande número de animais deve ser vacinado (KOCAN et al. 2000; KOCAN et al. 2003). E, por último, a imunização através da espécie *A. centrale*, que causa infecção branda ao animal, podendo amenizar a severidade da infecção pelo *A. marginale*. O *A. centrale* induz uma imunidade parcial contra *A. marginale* e vem sendo usada como vacina heteróloga, em função de sua menor patogenicidade. Essa vacina tem sido usada em vários países e, no Brasil, está sendo difundida pela EMBRAPA e Estado do Rio Grande do Sul (KESSLER et al., 1991).

Diante do exposto, é clara a importância que essa enfermidade representa para os produtores e clínicos de bovinos, uma vez que leva a perdas diretas, principalmente na redução

da produção de leite e carne; o que propicia estudos epidemiológicos em regiões onde se encontra grande número de bovinos destinados a algum tipo de produção, que apresentaram ou vem apresentando a clínica da doença. Assim, esse estudo objetivou conhecer a situação epidemiológica da TPB associada às práticas de manejo na bacia leiteira de Parnaíba-PI e avaliar os métodos de diagnóstico dessa enfermidade para posterior implantação no Estado.

Esta dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: uma introdução geral, revisão de literatura e objetivos, capítulo I contendo o artigo, intitulado “**Babesiose e anaplasmoses em rebanhos bovinos leiteiros do Estado do Piauí, Meio Norte do Brasil**” a ser encaminhado para publicação na *Animal Tropical Health and Production* estruturados de acordo com as normas técnicas da revista.

1 3 CAPÍTULO I

2 Babesiose e anaplasmosse em rebanhos bovinos leiteiros do Estado do Piauí, Meio Norte do Brasil

3

4 Francisco de A. L. Souza^{1*}, Juliana F. V. Braga¹, Eduardo E. A. Beserra¹, Lidiany V. Pires¹, Ciro J. S. de Carvalho¹,

5 Érica A. Costa³, Francisco A. Lima Costa¹, Múcio F. B. Ribeiro², Renato de L. Santos³, Silvana M. M. S. Silva¹

6

7 ¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí,

8 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil

9 ²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 30270-

10 901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

11 ³Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais,

12 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

13

14 *Autor para correspondência:

15 Tel.: +55 86 3215-5760

16 Fax.: +55 86 3215-5753

17 E-mail: chicoleite@hotmail.com (Francisco A. L. Souza)

18

19 **Resumo:** O objetivo do trabalho foi determinar a prevalência da babesiose e anaplasmosse em bovinos do meio norte
20 do Brasil, por meio de diagnósticos parasitológico, sorológico e molecular, e assim, caracterizar a situação
21 epidemiológica e fatores envolvidos nas enfermidades. O estudo foi conduzido com 202 bovinos, e desses foram
22 colhidas amostras de sangue para pesquisa parasitológica, sorológica, molecular e determinação do VG. Foram
23 aplicados nas propriedades questionários envolvendo aspectos epidemiológicos. A soroprevalência de *B. bigemina* e
24 *B. bovis* foram 52,5% e 68,8%, respectivamente; e para *A. marginale* foi 89,1%. Das amostras analisadas, 73,3%
25 foram reativas para *Babesia* spp. e *A. marginale*, demonstrando co-infecção. A visualização de merozoítos e
26 corpúsculos intraeritrocitários foram demonstrados em 33,2% para *B. bigemina*, 23,3% para *B. bovis* e 77,7% para
27 *A. marginale*. Na PCR, *B. bigemina* e *B. bovis* foram positivos em 52,0% e 33,2%, respectivamente. No caso da *A.*
28 *marginale* essa positividade foi observada em 76,2%. Dessas, 51,5% amplificaram DNA de *Babesia* spp. e *A.*
29 *marginale*. A criação semi-intensiva predominou em 68,0% das propriedades estudadas. O histórico clínico de
30 babesiose e ou anaplasmosse foram relatados em 73% das propriedades. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$)
31 entre os grupos etários e nem para o volume globular (VG) de animais positivos comparado aos negativos. O estudo

32 indica que nessa região a babesiose apresenta instabilidade e a anaplasrose estabilidade enzoótica, reforçando o fato
33 de que no Brasil existem áreas de instabilidade enzoótica, mesmo na região tropical do País, sendo a PCR uma
34 ferramenta valiosa para a realização do diagnóstico dessas enfermidades, podendo ser utilizada para caracterizar
35 uma região geográfica.

36 *Palavras-chave: Babesia bigemina. Babesia bovis. Anaplasma marginale. epidemiologia. diagnóstico.*

37

38 **Introdução**

39 A babesiose bovina é causada pelos hemoprotozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a anaplasrose
40 pela rickettsia intra-eritrocitária *Anaplasma marginale*. Essas enfermidades apresentam sinais clínicos e
41 epidemiologias parecidas (Bock et al., 2004; Kocan et al., 2010) e são responsáveis por grandes perdas econômicas
42 na pecuária mundial e brasileira.

43 O principal vetor biológico para os três agentes na Ásia, África, Austrália, América do Sul e Central, é o
44 carrapato monoxeno *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, o qual se distribui em regiões tropicais e subtropicais
45 (Guglielmone, 1995; OIE, 2007). Além da transmissão biológica por carrapatos, a *A. marginale* também pode ser
46 transmitida mecanicamente, por dípteros hematófagos do gênero *Tabanus*, *Stomoxys*, e por várias espécies de
47 mosquitos ou de forma iatrogênica por fômites com sangue contaminado (Dreher et al., 2005; Kocan et al., 2010). A
48 dinâmica da infecção é dependente de fatores como população de carrapatos infestantes; capacidade de transmissão
49 do carrapato; susceptibilidade dos bovinos, que pode variar com a raça, idade, estado fisiológico e imunitário
50 (Kocan et al., 2010).

51 Os sinais clínicos caracterizam-se por anemia progressiva, icterícia, febre, apatia, inapetência, taquipnéia e
52 redução ou suspensão da lactação; observam-se também aborto, relatado somente na anaplasrose; hemoglobinemia
53 e hemoglobinúria, vistos somente na babesiose, podendo evoluir para a morte do animal (Bock et al., 2004; Kocan et
54 al., 2010).

55 O diagnóstico destas enfermidades baseiam-se na pesquisa direta do agente em esfregaços sanguíneos (Böse
56 et al., 1995; Bock et al., 2004), além de métodos sorológicos, como o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
57 (ELISA) (Madruga et al., 2001) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Santos et al., 2001). Outra técnica
58 bastante utilizada, com alta sensibilidade e especificidade é a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e a *nested*
59 PCR (nPCR) (Figueroa et al., 1993; Böse et al., 1995; Costa Júnior et al., 2006).

60 O estudo epidemiológico da babesiose e anaplasrose bovina em uma determinada área pode revelar a
61 possibilidade da ocorrência ou não de surtos. Tal possibilidade é avaliada segundo a situação epidemiológica da
62 região estudada que pode ser, principalmente, de três tipos: estabilidade enzoótica, instabilidade enzoótica e áreas

63 livres da doença (Mahoney, 1974). Grande parte do Brasil é caracterizada como área de estabilidade enzoótica para
64 *Babesia* spp. e *A. marginale* (Barci et al., 1994; Araújo et al., 1997; Madruga et al., 2000; Santos et al., 2001),
65 entretanto, regiões do Sul e Norte do Brasil são caracterizadas como área de instabilidade enzoótica para essas
66 enfermidades (Artiles et al., 1995; Lima et al., 1999).

67 Os estudos sobre a situação epidemiológica da babesiose e anaplasiose em regiões semi-áridas do Nordeste
68 são escassos e a bovinocultura de leite nessa região tem um importante impacto social. Dessa forma, torna-se
69 necessário estudar cada região, uma vez que, não se pode aplicar dados epidemiológicos de uma determinada área a
70 outra, principalmente devido à diversidade climática.

71 A situação epidemiológica da babesiose e anaplasiose bovina no Piauí não é conhecida. Vem ocorrendo
72 mortes de animais com sinais clínicos dessas enfermidades, porém sem diagnóstico definitivo. Portanto, o objetivo
73 deste estudo foi determinar a prevalência da babesiose e anaplasiose em bovinos da bacia leiteira de Parnaíba,
74 Estado do Piauí, Meio Norte do Brasil, através dos métodos parasitológico, RIFI e PCR, para caracterização da
75 situação epidemiológica e fatores envolvidos nas enfermidades.

76

77 **Material e métodos**

78 *Região estudada*

79 A pesquisa foi desenvolvida na bacia leiteira de Parnaíba, situada na microrregião Litoral Piauiense, norte do
80 estado do Piauí (Fig. 1), que ocupa uma área de 7.742 Km², e está situada numa região de transição de bioma da
81 Caatinga ao Cerrado, possuindo um rebanho efetivo de 99.815 cabeças (IBGE, 2010). O clima da região é
82 classificado como tropical com duas estações meteorológicas bem definidas, período chuvoso com chuvas de
83 dezembro-abril e período seco de maio-novembro. A temperatura varia de 23–33,6°C, a umidade relativa do ar de
84 40-80% e o índice pluviométrico com média de 1200 mm (Medeiros, 2004).

85 *Amostras*

86 Foram utilizados 202 bovinos com idade acima de um ano, número determinado a partir do modelo
87 matemático desenvolvido pelo Centro Panamericano de Zoonoses (1979). Para o cálculo, o valor utilizado como
88 prevalência esperada foi de 67%, obtido a partir de um pré-experimento com 78 animais da região e o grau de
89 confiança adotado foi de 95% com margem de erro admitida de 10%.

90 A amostra foi estratificada entre os municípios constituintes da bacia leiteira, proporcionalmente à sua
91 população bovina efetiva. No total foram visitadas 22 propriedades, onde foram aplicados questionários envolvendo
92 aspectos epidemiológicos, como tipo de criação, manejo sanitário, presença de sinais clínicos e medidas de controle
93 da doença. Foram colhidas amostras de sangue através de venopunção jugular, usando tubos à vácuo com ácido

94 etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para determinação do volume globular (VG) através da técnica de
95 microhematócrito e para extração de DNA, e sem anticoagulante para obtenção de soro.

96 *Análise parasitológica*

97 Foram realizadas através de exame direto por meio de esfregaços de sangue periférico da borda da orelha dos
98 animais e coradas pelo *Diff-Quick* (Panótico Rápido). A pesquisa de merozoítos/trofozoítos de *Babesia* spp. e de
99 corpúsculos intra-eritrocitários de *A. marginale*, foi feita através da visualização em microscópio de luz branca,
100 utilizando ampliação de 1000X.

101 *Sorologia*

102 A presença de anticorpos IgG anti-*B. bigemina*, anti-*B. bovis* e anti-*A. marginale* foram detectados no soro,
103 por meio da RIFI, usando conjugado fluoresceína-anti-IgG bovino (Sigma) e antígenos fixados em lâminas. O teste
104 sorológico foi realizado de acordo com a técnica descrita pelo Instituto Interamericano de Cooperación para La
105 Agricultura (IICA, 1987). Somente amostras reativas na diluição de 1:40 foram consideradas positivas.

106 *Extração de DNA e procedimentos de PCR e nPCR*

107 O DNA foi extraído a partir de 200 µl de sangue utilizando-se o kit Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin
108 (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras de DNA foram quantificadas em
109 espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

110 A técnica de PCR foi usada para amplificação do DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* utilizando os *primers*
111 descritos por Linhares et al. (2002), GAU9 5'-CTGTCGTACCGTTGGTTGAC-3' e GAU10 5'-
112 CGCACGGACGGAGACCGA-3'; e GAU7 5'-GTTGGGTCTTTTCGCTGGC-3' e GAU6 5'-
113 CCACGCTTGAAGCACAGGA-3', respectivamente. No caso de *A. marginale* dois pares de *primers* foram
114 utilizados para amplificação do DNA por meio do nPCR, cujas seqüências externas são Am9 5'-
115 TTGAAGGTTGAAGTGCAGGT-3' e Am10 5'-CCATATCGAATGCACCAAAC-3' e internas Am11 5'-
116 CACATTTCTTGGAGCTGG-3' e Am12 5'-TCTCTGGCACTTTGAACC-3' (Figuroa et al., 1993).

117 A PCR e nPCR foram realizadas em uma mistura de 25 µl contendo água ultra pura; 1x Taq buffer (pH 8,5;
118 contendo blue dye e yellow dye); 0,2 mM de cada dNTP (Promega); 1,0 mM MgCl₂; 0,4 µM de cada *primer*; 1,5 U
119 de Taq DNA polimerase (Promega) e 200 ng de amostra de DNA. Para a nPCR foi utilizado 1 µl de produto
120 amplificado previamente pela PCR. As reações foram realizadas sob as seguintes condições: 94°C por 2 min (*B.*
121 *bovis* e *B. bigemina*) e 95°C por 7 min (*A. marginale*); 35 ciclos de desnaturação por 30 s a 94°C (*B. bovis* e *B.*
122 *bigemina*) e 95°C (*A. marginale*); anelamento por 30 s a 58°C (*B. bovis*) e 60°C (*B. bigemina* e *A. marginale*);
123 extensão por 1 min a 72°C e extensão final por 5 min a 72°C em um termociclador Gene Pro (Bioer).

124 Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Foram consideradas
125 positivas as amostras de aproximadamente 541pb para *B. bovis*, 690pb para *B. bigemina*, e 170pb for *A. marginale*.

126 *Análise estatística*

127 A análise dos dados foi realizada utilizando os testes de Fisher e Qui-Quadrado (χ^2), com nível de
128 significância de 0,05. Para os valores do VG foram estimados a média e o desvio padrão. A comparação de média
129 dos valores do VG dos animais infectados (PCR) e soropositivos com as dos animais não-infectados e soronegativos
130 foi realizada pelo teste t de Student. As análises foram feitas através do Software GraphPad Prism, versão 5.0. A
131 prevalência foi estimada com base no total de soropositivos pela RIFI e total de infectados pela PCR. O teste Kappa
132 foi realizado para avaliar a concordância entre o diagnóstico parasitológico em esfregaços sanguíneos e a PCR e
133 nPCR.

134 *Ética e experimentação animal*

135 O trabalho foi conduzido sob os termos e condições do Comitê de Ética em Experimentação com Animais da
136 Universidade Federal do Piauí aprovado sob o número 030/2010.

137

138 **Resultados**

139 A prevalência de *B. bigemina* e *B. bovis* determinada pela detecção de anticorpos em bovinos leiteiro da
140 microrregião Litoral Piauiense, Meio Norte do Brasil foram 52,5% (106/202) e 68,8% (139/202), respectivamente; e
141 para *A. marginale* foi 89,1% (180/202). Das amostras de soro analisadas 148 (73,3%) foram reativos para *Babesia*
142 spp. e *A. marginale*, demonstrando co-infecção (Tabela 1).

143 Merozoítos e trofozoítos de *B. bigemina* e *B. bovis* e corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* foram
144 visualizados nos esfregaços sanguíneos periférico respectivamente, em 33,2% (67/202), 23,3% (47/202) e 77,7%
145 (157/202) dos bovinos. Em 44,5% (90/202) dos esfregaços analisados, observou-se simultaneamente merozoítos e
146 corpúsculos.

147 *A. B. bigemina* e *B. bovis* tiveram seu DNA amplificado pela PCR em 52% (105/202) e 33,2% (67/202) das
148 amostras, respectivamente (Figura 2A e 2B). No caso da *A. marginale* essa amplificação do DNA realizada pela
149 nPCR foi observada em 76,2% (154/202) das amostras (Figura 2C). Do total das amostras 104 (51,5%)
150 amplificaram DNA dos dois gêneros, denotando co-infecção entre *Babesia* spp e *A. marginale* (Tabela 1). O teste
151 Kappa demonstrou baixa concordância entre a pesquisa de merozoítos de *B. bigemina* e o resultado da PCR (k=
152 0,039) e entre a pesquisa de corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* e nPCR (k= 0,176). Já para pesquisa de
153 *B. bovis* em esfregaços sanguíneos comparado com o resultado da PCR o teste Kappa demonstrou uma concordância
154 razoável (k= 0,217).

155 O inquérito epidemiológico aplicado nas 22 fazendas visitadas demonstrou que a criação semi-intensiva
156 predominou em 68% dos produtores. Os animais explorados eram, proveniente do cruzamento da raça Gir (*Bos*
157 *taurus indicus*) com Holandês (*Bos taurus taurus*). Grande parte dos produtores (95%) cultivam pasto, dentre eles:
158 *Hymenachne amplexicaulis*, *Brachiaria*, *Cynodon*, *Panicum*, *Pennisetum purpureum*, *Stylosanthes capitata*,
159 *Andropogon gayanus*, *Panicum maximum* e *Brachiaria dactylosteura*, no entanto, apenas 59% fazem rotação de
160 pastagem com seus animais, sendo que essa rotação varia de 15 a 40 dias, dependendo do tipo de pasto. Das
161 propriedades visitadas, 100% possuíam animais parasitados por carrapatos e 64% relataram presença de dípteros
162 hematófagos. Todos os produtores faziam controle da população de carrapatos, mais somente 59% realizavam
163 mudança de princípio ativo, sendo os mais utilizados, amitraz, cipermetrina, doramectina, ivermectina, flumetrina e
164 fipronil. Esse controle era realizado quando ocorria infestação de carrapatos nos animais, não existindo um
165 acompanhamento veterinário e nem um controle estratégico. O histórico clínico de babesiose e ou anaplasmoses
166 caracterizado por anorexia, apatia, palidez de mucosas, hemoglobinúria, febre, mucosas ictéricas e aborto foram
167 relatados em 73% das propriedades e somente 68% tratavam os animais para essa enfermidade utilizando
168 dipropionato de imidocarb, diaceturato de dibenzamidina e tetraciclina. Nesses casos, quando tratados na fase inicial
169 da doença os animais eram curados. Em 50% das fazendas foi informado que já houve óbito de animais com
170 histórico clínico da doença. Na maioria das propriedades (95%) os bezerros até seis meses de idade ficam em
171 bezerreiras coletivas com alimentação e água, entrando em contato com as vacas somente no momento da ordenha
172 para realizar o pico de ocitocina, sendo que nesse período já ocorre infestação de carrapatos e só após os nove meses
173 de idade os bezerros vão para o pasto.

174 A análise da soroprevalência de acordo com a faixa etária revelou para *B. bigemina* que 47,1%, 52,9% e
175 56,1% dos animais foram positivos para os grupos de 1 a 3 anos, 3 a 6 anos e maior que 6 anos, respectivamente. No
176 entanto, para *B. bovis* essa positividade foi de 62,7% (1 – 3 anos), 72,9% (3 – 6 anos) e 68,2% (> 6 anos). Na
177 anaplasmoses a sorologia relevou 84,3% (1 – 3 anos), 88,2% (3 – 6 anos) e 93,9% (> 6 anos) de animais positivos.
178 Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos etários, segundo o teste χ^2 nas espécies estudadas.

179 O VG variou de 14% a 42% ($29,11 \pm 4,97\%$), sendo que a média do VG de bovinos positivos para *B.*
180 *bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e animais co-infectados detectado por PCR foram próximas a do VG dos animais
181 negativos, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 1). Situação similar foi observada ao comparar as
182 médias do VG de bovinos soronegativos com soropositivos, onde não houve diferença significativa ($p > 0,05$)
183 (Tabela 1).

184

185

186 Discussão

187 As baixas taxas de soroprevalência para *B. bigemina* e *B. bovis* verificadas neste estudo permitem considerar
188 essa região como uma área de instabilidade enzoótica. No caso da *A. marginale*, devido à alta prevalência
189 sorológica, essa mesma região caracteriza-se por uma área de estabilidade enzoótica. Entretanto, levando-se em
190 consideração a sorologia de animais reativos simultaneamente para *Babesia* spp. e *A. marginale*, o que demonstra
191 uma co-infecção, e a existência do complexo Tristeza Parasitária Bovina, pode-se considerar a região estudada como
192 uma área de instabilidade enzoótica para babesiose e anaplasmose bovina. Essa classificação baseia-se nos conceitos
193 epidemiológicos propostos por Mahoney (1874), em que descreve a sua aplicação para possível controle da
194 ocorrência ou não de surtos.

195 Os resultados obtidos nesse trabalho para *B. bigemina* e *B. bovis* são diferentes da maioria dos Estados
196 brasileiros, incluindo alguns Estados da região Nordeste, onde predominam áreas de estabilidade enzoótica para
197 essas duas espécies. Em um estudo realizado no semi-árido da Bahia a prevalência de anticorpos anti *B. bigemina* e
198 anti *B. bovis* foi de 77,7% e 75,5%, respectivamente (Barros et al., 2005). Nas microrregiões de Feira de Santana,
199 Jequié, Ilhéus e Vitória da Conquista, Estado da Bahia, a média dos percentuais de bovinos sorologicamente
200 positivos para *B. bovis* foi de 97,2% e de 95,0% para *B. bigemina* (Araújo et al., 1997), em Araguaína, Estado do
201 Tocantins a soroprevalência determinada para *B. bovis* foi de 90,5% (Trindade et al., 2010), enquanto no Estado de
202 São Paulo foi de 88,0% (Barci et al., 1994). Para *A. marginale* o resultado encontrado se assemelha com o registrado
203 para outras regiões do Brasil (Araújo et al., 1998; Souza et al., 2000; Souza et al., 2001), porém difere de alguns
204 Estados do Nordeste, como Sergipe, onde foi observado prevalência de 16,30% (Oliveira et al., 1992). No caso da
205 co-infecção os resultados foram semelhantes aos encontrados no Rio Grande do Sul (Almeida et al., 2006) e em
206 algumas áreas do nordeste, como o sertão da Bahia, Sergipe, Pernambuco e Ceará, devido à seca (Oliveira et al.,
207 1992). Essa situação de instabilidade pode causar grandes problemas aos produtores da região, pois existe a
208 possibilidade da ocorrência de um grande número de casos clínicos com alta taxa de mortalidade, portanto, causando
209 prejuízos aos criadores.

210 A baixa detecção de merozoítos de *B. bigemina* e *B. bovis* em eritrócitos dos animais utilizados no estudo é
211 explicada pelos baixos níveis de parasitemia apresentados por bovinos portadores da infecção, sendo sua
212 visualização facilitada apenas em bovinos com sintomatologia clínica (Jackson et al., 2001).

213 A visualização de corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale*, foi realizada na maioria dos animais, sendo
214 que a eficiência desse método em detectar a presença de rickettsia pode ser atribuída tanto à infecção inicial, onde de
215 10 a 90% dos eritrócitos podem estar parasitados, mais também a portadores crônicos, nos quais o parasita persiste
216 em níveis baixos (Kieser et al., 1990).

217 A frequência da infecção por *Babesia* spp. e *A. marginale* em bovinos detectada pela PCR e nPCR foi
218 superior ao obtido no exame microscópico de esfregaços sanguíneos e similar aos resultados obtidos no exame
219 sorológico de RIFI, possibilitando, dessa forma, realizar a classificação epidemiológica da região estudada também
220 por essa técnica. A detecção da babesiose e anaplasiose na fase inicial da infecção e em animais portadores pela
221 amplificação de DNA é uma poderosa ferramenta para investigações epidemiológicas, uma vez que estes animais
222 representam uma importante fonte de infecção de fêmeas *R. (B.) microplus* (Oliveira-Sequeira et al., 2005).

223 A técnica de PCR e nPCR empregada neste trabalho para detectar as infecções por *Babesia* spp. e *A.*
224 *marginale*, têm sido utilizadas na investigação dessas enfermidades em vários Estados brasileiros, auxiliando no
225 estudo de medidas de controle a partir do conhecimento epidemiológico de rebanhos (Figuroa et al., 1993;
226 Madruga et al., 2002; Oliveira-Sequeira et al., 2005; Costa Júnior et al., 2006). Por meio desse método de
227 diagnóstico podemos classificar a bacia leiteira como uma área de estabilidade enzoótica para *A. marginale* e como
228 uma área de instabilidade para *B. bigemina*, *B. bovis* e para co-infecção.

229 O sistema de criação semi-intensivo, predominante nessa região, juntamente com as altas temperaturas e a
230 baixa precipitação de chuvas, provavelmente interferem no grau de infestação dos animais, o que está em
231 concordância com Furlong et al. (2002) onde afirmam que o sucesso do parasitismo é dependente de variações no
232 manejo de rebanhos, nas variações climáticas e topográficas.

233 Como observado nesse estudo, carrapatos e dípteros hematófagos estavam presentes em grande parte das
234 propriedades, as quais faziam controle desses artrópodes, sendo sua presença constante por todo o ano. A melhoria
235 nas medidas de manejo sanitário, como o uso intensivo de produtos carrapaticidas e inseticidas, tem reduzido a
236 exposição dos animais aos vetores da babesiose e anaplasiose, trazendo como consequência, a baixa infecção dos
237 bezerros. Além disso, a adoção de novas práticas de manejo e o controle intensivo de carrapatos reduzem o contato
238 dos animais com os vetores, favorecendo o aparecimento de áreas de instabilidade endêmica para os agentes dessa
239 enfermidade (Guglielmone, 1995; Bock et al., 2004).

240 Durante as visitas às propriedades evidenciou-se ausência de sinais clínicos característicos, mais se deve
241 destacar que nas propriedades estudadas há registros de ocorrência dessas enfermidades, inclusive com óbitos,
242 diagnosticadas por meio de exame clínico. O tratamento dos animais acometidos é realizado por grande parte dos
243 criadores dessa região, sendo feito por meio do uso de quimioterápicos indicado na literatura (Kuttler e Johnson,
244 1996; Kocan et al., 2010).

245 A não observação de diferença estatística nas prevalências, segundo os grupos etários, faz inferir que esse
246 parâmetro não interfere na condição de estabilidade ou instabilidade dessa região, e todos os grupos analisados estão

247 sujeitos à casos clínicos de babesiose e anaplasiose, embora a literatura cite que existam fatores de resistência
248 natural à babesiose, como raça, idade e condição imunológica (Bock et al., 2004; Kocan et al., 2010).

249 Os resultados mostraram que tanto os bovinos soropositivos, quanto os positivos (por PCR) para babesiose e
250 anaplasiose apresentaram valores de VG similares aos de bovinos negativos e soronegativos, sendo que a anemia
251 estava presente em alguns animais isolados, e esses valores não influenciaram na comparação das médias desses
252 dados, não existindo diferença estatística entre os grupos. Considerando que a anemia é proporcional à parasitemia e
253 ocorre em função de alterações hemodinâmicas resultantes da hemólise intravascular disseminada e também de
254 mecanismos como seqüestro e lise de eritrócitos normais e parasitados (Alfonso et al., 1996), é possível que os
255 níveis de parasitemia apresentados pelos animais avaliados estivessem abaixo do limiar necessário para produzir
256 doença clínica, caracterizando como animais portadores crônicos.

257 O estudo epidemiológico com *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, aliados às observações de ocorrência de
258 casos clínicos de babesiose e anaplasiose informadas pelos produtores são indicativos de que essas enfermidades
259 ocorrem de forma instável na região da bacia leiteira de Parnaíba, no estado do Piauí, Meio Norte do Brasil, com
260 situações de instabilidade (babesiose) ou estabilidade (anaplasiose) enzoótica dependendo do agente estudado,
261 sendo a PCR uma técnica de grande aplicabilidade no diagnóstico de portadores sadios e uma ferramenta valiosa
262 para a realização de estudos epidemiológicos, possibilitando caracterizar uma região geográfica e utilizar medidas
263 adequadas de controle.

264

265 **Agradecimentos**

266 Francisco Leite agradece à agência Brasileira FAPEPI (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do
267 Piauí) pela bolsa de Mestrado.

268

269 **Referências**

270 Alfonso, J., Medina, R., Fazzino, F., Caballero, H. Câmbios clínicos y hematológicos em becerros infectados com
271 *Anaplasma marginale*. Acta Científica Venezolana, 47, 50-57.

272

273 Almeida, M.B., Tortelli, F.P., Riet-Correa, B., Ferreira, J.L.M., Soares, M.P., Farias, N.A.R., Riet-Correa, F., Schild,
274 A.L. 2006. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005.
275 Pesquisa Veterinária Brasileira, 26, 237-242.

- 276 Araújo, F.R., Madruga, C.R., Almeida, M.A.O., Leal, C.R.B., Miguita, M. 1997. Levantamento sorológico de
277 *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de congutinação
278 rápida. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 6, 111-115.
279
- 280 Araújo, F.R., Madruga, C.R., Leal, C.R.B., Schenk, M.A.M., Kessler, R.H., Marques A.P.C. 1998. Comparison
281 between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid congutination tests in
282 detecting antibodies against *Babesia bovis*. Veterinary Parasitology, 74, 101-108.
283
- 284 Artiles, J., Alves Branco, F.P., Martins, J.R., Correa, L.B., Sapper, M.F.M. 1995. Prevalência de *Babesia bovis*,
285 *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. Revista Brasileira de Parasitologia
286 Veterinária, 4, 187.
287
- 288 Barci, L.A.G., Oliveira, M.R., Machado, R.Z., Oliveira, D.A., Araújo Filho, R.S. 1994. Epidemiologia da babesiose
289 bovina no Estado de São Paulo: I. Estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do município de Pindamonhagaba,
290 Vale do Paraíba. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 3, 79-82.
291
- 292 Barros, S.L., Madruga, C.R., Araújo, F.R., Menk, C.F., Almeida, M.A.O., Melo, E.P.S., Kessler, R.H. 2005.
293 Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the
294 semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. Memórias do Instituto
295 Oswaldo Cruz, 100, 613-617.
296
- 297 Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen, W. 2004. Babesiosis of cattle. Parasitology, 129, 247-269.
298
- 299 Böse, R., Jorgensen, W.K., Dalgliesh, R.J., Friedhoff, K.T., De Vos, A.J. 1995. Current state and future trends in
300 the diagnosis of babesiosis. Veterinary Parasitology, 57, 61-74.
301
- 302 Centro Pan Americano de Zoonosis. 1979. Procedimientos para estudios de prevalência por muestreo. Ramos Mejia,
303 Buenos Aires. Nota Técnica 18, 35 pp.
304

- 305 Costa Junior, L.M., Rabelo, E.M.L., Martins Filho, O.A., Ribeiro, M.F.B. 2006. Comparison of different direct
306 diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated
307 parasites. *Veterinary Parasitology*, 139, 231-236.
- 308
- 309 Dreher, U.M., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Regula, G., Cagienard, A.Y., Stark, K.D.C., Doherr, M.G., Filli,
310 F., Hassig, M., Braun, U., Kocan, K.M., Lutz, H. 2005. Seroprevalence of anaplasmoses among cattle in Switzerland
311 in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. *Veterinary Microbiology*, 107, 71-79.
- 312
- 313 Figueroa, J.V., Chievas, L.P., Jhonson, G.S., Buenning, G.M. 1993. Multiplex polymerase chain reaction based
314 assay for the detection of *Babesia bigemina*, *B. bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary*
315 *Parasitology*, 50, 69-81.
- 316
- 317 Furlong, J., Chagas, A.C.S., Nascimento, C.B. 2002. Comportamento e ecologia de larvas do carrapato *Boophilus*
318 *microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, 39,
319 213-217.
- 320
- 321 Guglielmone, A.A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary*
322 *Parasitology*, 57, 109-119.
- 323
- 324 IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2010. Produção da pecuária municipal 2009.
325 (<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=73&z=p&o=21>).
- 326
- 327 Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 1987. Técnicas para el diagnóstico de
328 babesiosis y anaplasmosis bovina, San José, 79 pp.
- 329
- 330 Jackson, L.A., Waldorn, S.J., Weier, H.M., Nicol, C.L., Cooke, B.M. 2001. *Babesia bovis*: Culture of laboratory
331 adapted parasite lines and clinical isolates in a chemically defined medium. *Experimental Parasitology*, 99, 168-174.
- 332
- 333 Kieser, S.T., Eriks, I.E., Palmer, G.H., 1990. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection in
334 cattle. *Infection and Immunity*, 58, 1117-1119.
- 335

- 336 Kocan, K.M, De La Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A. 2010. The natural history of *Anaplasma*
337 *marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167, 95-107.
- 338
- 339 Kuttler, K.L., Johnson, L.W. 1996. Chemoprophylactic activity of imidocarb, diaminazene and oxytetracycline against
340 *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Veterinary Parasitology*, 21, 107-118.
- 341
- 342 Lima, F.V.A., Molnar, E., Molnar, L., Silva, C.M.S., Lima, F.V.A. 1999. Seroepidemiological study of bovine
343 babesiosis (*Babesia bovis*) by indirect ELISA test in the State of Para, Brazil. *Revista de Ciências Agrárias*, 32, 55-
344 64.
- 345
- 346 Linhares, G.F.C., Santana, A.P., Laueman, L.H., Madruga, C.R. 2002. Assessment of primers designed from the
347 small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR.
348 *Ciência Animal Brasileira*, 3, 27-32.
- 349
- 350 Madruga, C.R., Leal, C.R.B., Ferreira, A.M.T., Araújo, F.R., Bonato, L.V., Kesler, R.H., Schenk, M.A.M., Soares,
351 C.O. 2002 Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil.
352 *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 22, 153-160.
- 353
- 354 Madruga, C. R., Marques, A.P.C., Araújo, F.R, Umaki, A.C.S., Crocci, A.J., Queiroz, R. A. 2001. Avaliação de um
355 ELISA para detecção de anticorpos contra *Babesia bigemina* em bovinos e sua aplicação em um inquérito sorológico
356 no Brasil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 21, 72-76.
- 357
- 358 Madruga, C.R., Marques, A.P.C., Carvalho, C.M.E., Cusinato, F.Q., Crocci, A.J., Kessler, R.H., Míguita, M. 2000.
359 Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*.
360 *Pesquisa Veterinaria Brasileiro*, 20, 167-170.
- 361
- 362 Mahoney, D.F. 1974. The application of epizootiological principles in the control of babesiosis in cattle. *Bulletin*
363 *Official International of Epizooties*, 81, 123-138.
- 364
- 365 Medeiros R.M. 2004. Estudo Agrometeorológico para o Estado do Piauí, (Secretaria do Meio Ambiente e Recursos
366 Hídricos do Estado do Piauí, Teresina) 113p.

- 367 OIE. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/boophilus_microplus.pdf).
368
- 369 Oliveira, A.A., Pedreira, P.A.S., Almeida, M.F.R.S. 1992. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasrose no
370 estado de Sergipe. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 44, 377-386.
371
- 372 Oliveira-Sequeira, T.C.G., Oliveira, M.C.S., Araújo Júnior, J.P., Amarante, A.F.T. 2005. PCR-based detection of
373 *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their host *Boophilus microplus* and cattle. International Journal for
374 Parasitology, 35, 105-111.
375
- 376 Santos, H.Q., Linhares, G.F.C., Madruga, C. R. 2001. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-
377 *Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência
378 indireta e Elisa. Ciência Animal Brasileira, 2, 133-137.
379
- 380 Souza, J.C.P., Soares, C.O., Madruga, C.R., Massard, C.L. 2001. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma*
381 *marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do Médio Paraíba. Ciência Veterinária
382 Brasileira, 31, 309-314, 2001.
383
- 384 Souza, J.C.P., Soares, C.O., Massard, C.L., Scofield, A., Fonseca, A.H. 2000. Soroprevalência de *Anaplasma*
385 *marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. Pesquisa Veterinária Brasileiro, 20, 97-101.
386
- 387 Trindade, H.I., Silva, G.R.A., Teixeira, M.C.A., Sousa, M.G., Machado, R.Z., Freitas, F.L.C., Almeida, K.S. 2010.
388 Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguaína, State of
389 Tocantins, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 19, 169-173.
390

391

392

393

Tabela 1. Soroprevalência, prevalência da infecção por PCR e VG (%) de bovinos da bacia leiteira de Parnaíba, Piauí, Brasil

	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>	<i>A. marginale</i>	Co-infecção (<i>Babesia</i> spp. e <i>A. marginale</i>)
Soroprevalência	52,5% (106/202)	68,8% (139/202)	89,1% (180/202)	73,3% (148/202)
Prevalência da infecção	52,0% (105/202)	33,2% (67/202)	76,2% (154/202)	51,5% (104/202)
Média do VG (%) de:				
Soropositivos	29,38 ± 5,03 ^a	29,27 ± 5,19 ^a	29,07 ± 4,96 ^a	29,17 ± 4,91 ^a
Soronegativos	28,84 ± 4,90 ^a	28,76 ± 4,41 ^a	29,48 ± 5,07 ^a	27,20 ± 7,25 ^a
Média do VG (%) de:				
Animais infectados	29,56 ± 5,12 ^a	29,61 ± 5,19 ^a	29,25 ± 5,28 ^a	29,23 ± 5,11 ^a
Animais não-infectados	28,68 ± 4,79 ^a	28,86 ± 4,85 ^a	28,67 ± 3,78 ^a	28,36 ± 3,83 ^a

^a Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais não diferem entre si (p>0,05) pelo teste t de Student.

394

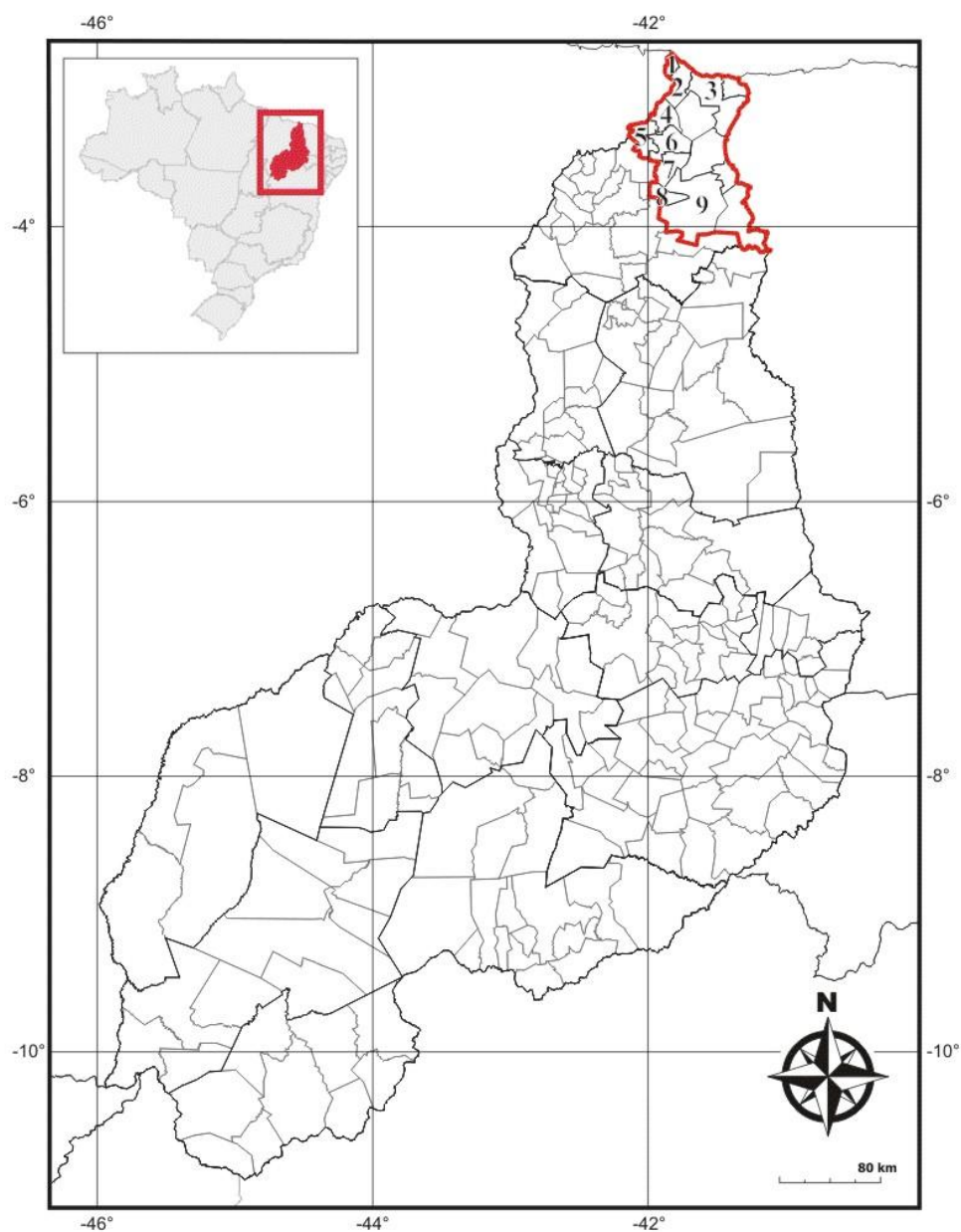
395

396

397

398

399



400

401

402

403

404

405

406

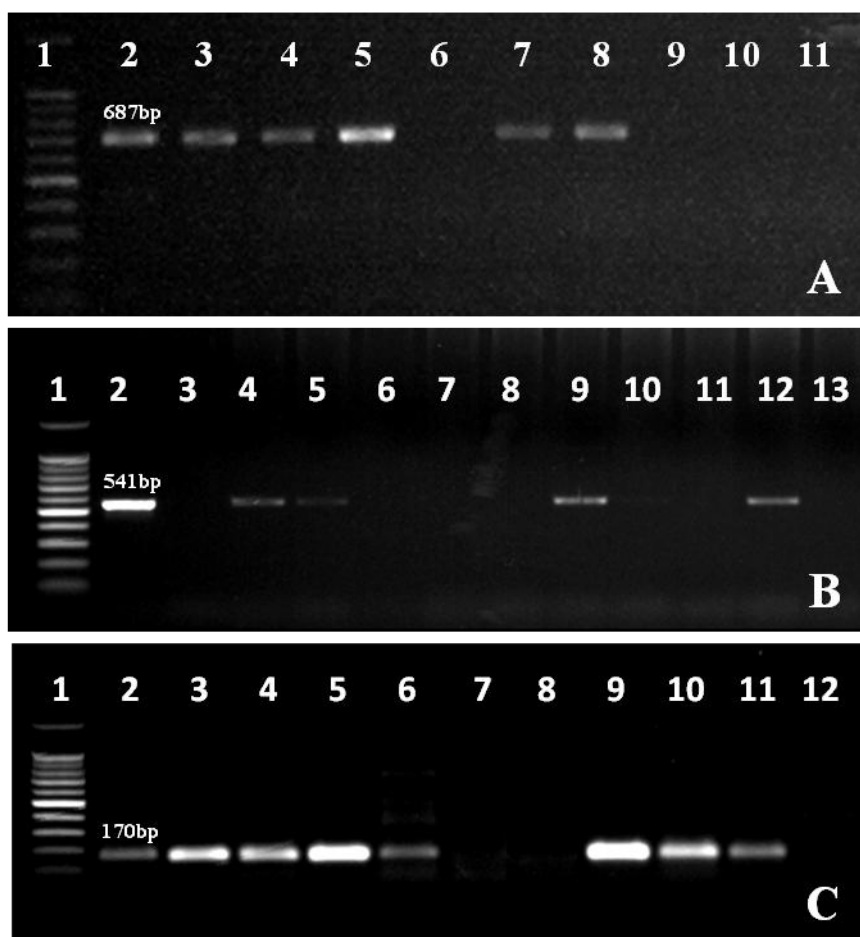
407

Fig. 1. Mapa do Piauí mostrando a localização da microrregião Litoral Piauiense e os municípios que compõem a bacia leiteira de Parnaíba, onde foi realizado o estudo de babesiose e anaplasmosse bovina: (1) Ilha Grande, (2) Parnaíba, (3) Luis Correia, (4) Buriti dos Lopes, (5) Murici dos Portelas, (6) Caxingó, (7) Caraúbas do Piauí, (8) São José do Divino e (9) Piracuruca.

408

409

410



411

Fig. 2. Análise do produto de PCR e nPCR pela eletroforese em gel de agarose a 1,5%. **A.** PCR *B. bigemina* coluna 1, 100pb DNA ladder; coluna 2, controle positivo; colunas 3, 4, 5, 7 e 8, amostras positivas para *B. bigemina*; coluna 11, controle negativo. **B.** PCR *B. bovis*: coluna 1, 100pb DNA ladder; coluna 2, controle positivo; colunas 4, 5, 9 e 12, amostras positivas para *B. bovis*; coluna 13, controle negativo. **C.** nPCR *A. marginale* coluna 1, 100pb DNA ladder; coluna 2, controle positivo; colunas 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 11, amostras positivas para *A. marginale*; coluna 12, controle negativo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, a investigação clínico-epidemiológica das infecções por *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* na região da bacia leiteira de Parnaíba, estado do Piauí, possibilitou as seguintes considerações:

- A babesiose ocorre sob a forma de instabilidade endêmica, enquanto a anaplasnose se apresenta sob a forma de endemia estável, o que nos proporciona aprofundarmos o estudo na infecção natural dessas enfermidades, visto que elas podem trazer grandes perdas para o produtor rural e conseqüentemente para o Estado;
- A técnica de PCR e nPCR tem um grande potencial de utilização no diagnóstico das condições epidemiológicas de rebanhos, podendo ser empregada na otimização de programas de controle da babesiose e anaplasnose, assim como no diagnóstico de animais portadores dessa enfermidade;
- A aplicação de inquéritos epidemiológicos nas regiões é de fundamental importância, uma vez que, a partir desses se pode conhecer a epidemiologia e assim aplicar medidas eficazes de controle;
- Há necessidade de se expandir o estudo à outras regiões do Piauí, uma vez que o Estado é muito grande e possui diferentes climas, temperaturas e manejo;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

ABBOTT, J. R. et al. *Anaplasma marginale* major surface protein 2 CD4+ T-cell epitopes are evenly distributed in conserved and hypervariable regions (HVR), whereas linear B-cell epitopes are predominantly located in the HVR. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 7360-7366, 2004.

ADHAM, F. K. et al. Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I – *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Parasitology Research**, v. 105, p. 721-730, 2009.

AHMED, J. S. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. **Parasitology Research**, v. 88, p. 48–50, 2002. Supplement.

ALLSOPP, M. T. E. P. et al. Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, v. 108, p. 147-152, 1994.

ALMEIDA, M. B. et al. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 237-242, 2006.

ALMERIA, S. et al. Bovine piroplasms in minorca (Balearic Islands Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. **Veterinary Parasitology**, v. 99, p. 249–259, 2001.

ALVES, L.C. **Prevalência de babesiose em gado leiteiro no município de Garanhuns, estado de Pernambuco**. 124 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1987.

ANGUS, B. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **International Journal of Parasitology**, v. 26, p. 1341–1355, 1996.

ARAÚJO F. R. et al. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 101-108, 1998.

ARAÚJO, F. R. et al. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de aglutinação rápida. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p. 111-115, 1997.

ARTILES, J. et al. Prevalência de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, p. 187, 1995. Suplemento 1.

BABÉS, V. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. **Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des Sciences**, v. 107, p. 692–694, 1888.

BARCI, L. A. G. et al. Epidemiologia da babesiose bovina no Estado de São Paulo: I. Estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do município de Pindamonhagaba, Vale do Paraíba. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, p. 79-82, 1994.

BARROS, C. S. L. et al. **Coleção Vallée: Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. Montes Claros, MG: Vallée, 2006, p. 87-95

BARROS, S. L. et al. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 613-617, 2005.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4172-4177, 2003.

BOCK, R. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, p. 247-269, 2004. Supplement.

BÖSE, R. et al. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 61-74, 1995.

BRAYTON, K. A. et al. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 102, p. 844-849, 2005.

BROWN, W. C. et al. CD4+ T lymphocytes from *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) vaccines recognize naturally processed epitopes conserved in MSP3. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3688-3692, 2004.

BROWN, W. C. et al. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 75–87, 2006.

BROWN, W. C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis* a protozoan parasite that causes persistent infection. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 233–248, 2001.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Parasitology Today**, v. 15, p. 275–281, 1999.

BUSHELL, G. R. et al. *Babesia bovis* host cell recognition proteins. **International Journal Parasitology**, v. 21, p. 609-611, 1991.

CALLOW, L. L.; MELLORS, L. J. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized calves. **Australian Veterinary Journal**, v. 42, p. 464-465, 1966.

CANTU, A. et al. Immunologic and molecular identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Free-Ranging White-Tailed Deer in Northern Mexico. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, p. 504-507, 2007.

CHAUVIN, A. et al. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, p. 1-18, 2009.

COETZEE, J. F. et al. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 61–73, 2005.

COOKE, B. M. et al. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. **Veterinary Parasitology**, v. 132, p. 273-295, 2005.

COSSÍO-BAYÚGAR, R. et al. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 32, p. 165-70, 1997.

COSTA JUNIOR, L. M. et al. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 231-236, 2006.

D'ANDREA, L. A. Z. et al. Condição imunológica de bovinos das raças Holandesa e Nelore frente a *Babesia bovis* e *B. bigemina* em duas regiões do estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 74-78, 2006.

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

DE LA FUENTE, J. et al. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal of Parasitology**, v. 31, p. 145-153, 2001.

DREHER, U. M. et al. Seroprevalence of anaplasmoses among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 71-79, 2005.

DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the family's Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

ESTES, D. M.; BROWN, W. C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.90, p.1-10, 2002.

FARIAS, N. A. Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doença de ruminantes e eqüinos**. 3. ed. Santa Maria: Palotti, 2007, 722p.

FIGUEROA, J. V. et al. Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 23, p. 117-27, 1996.

FIGUEROA, J. V. et al. Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2576-2582, 1992.

FOIL, L. D. et al. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-born diseases. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 163-181, 2004.

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

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

FUENTE, J. et al. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal Parasitology**, v. 31, p. 145-153, 2001.

FURLONG, J.; EVANS, D. Epidemiologia do carrapato *Boophilus microplus* no Brasil: necessidade de uma abordagem compreensível para seu estudo realístico. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 7, SIMPÓSIO SOBRE A MOSCA-DOS-CHIFRES *Haematobia irritans*, 2, 1991, São Paulo, Brasil. **Anais...** São Paulo : Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1991. p.48-50.

GALE, K. R. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. **Parasitology Research**, v. 78, p. 410-415, 1992.

GALE, K. R. et al. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. **International Journal of Parasitology**, v. 26, p. 1103-9, 1996.

GARCIA, T. D. et al. Immune response to *Babesia bigemina* infection in pregnant cows. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 144–148, 2004.

GE, N. L. et al. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adult using nonradioactive *in situ* hybridization. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, p. 911-920, 1996.

GOFF, W. L. et al. Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis* exposed monocyte cultures. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 221–228, 2006.

GOFF, W. L. et al. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 463–471, 2001.

GOMES, A. O *Boophilus microplus*. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte. p. 10-46, 1998.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região Sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, p. 187-194, 2000.

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

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

GUGLIELMONE, A. A. The level of infestation with the vector of cattle babesiosis in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 133-7, 1992.

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

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Produção da pecuária municipal 2009**. Rio de Janeiro, RJ, 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=73&z=p&o=21>>. Acessado em: 22 set. 2010.

JONSSON, N. N. et al. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Veterinary Parasitology**, v. 17, p. 297-305, 2000.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KESSLER, R. H. et al. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* em bezerros no Estado do Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18, p. 931-935. 1983.

KESSLER, R. H. et al. Experiencias con vacunas vivas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma centrale* conservadas por congelación en Brasil. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 22, p. 189-196, 1991.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1998. p.157.

KOCAN, K. M. et al. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, p. 285–300, 2004. Supplement.

KOCAN, K. M. et al. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 698-712, 2003.

KOCAN, K. M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 95-107, 2010.

KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Anaplasmosis control: past, present and future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p.501–509, 2000.

LEVINE, N. D. Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 35, p. 518-520, 1988.

LEW, A.; JORGENSEN, W. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 292-302, 2005.

LIN, M.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5324-5331, 2003.

MACKENSTEDT, U. et al. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. **Parasitology Research**, v. 81, p. 595–604, 1995.

MADRUGA, C. R. et al. Avaliação de um ELISA para detecção de anticorpos contra *Babesia bigemina* em bovinos e sua aplicação em um inquérito sorológico no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.72-76, 2001.

MADRUGA, C. R. et al. Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesquisa Veterinária Brasileiro**, v. 20, p.167-170, 2000a.

MADRUGA, C. R. et al. Evaluation of a enzyme linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 109-112, 2000b.

MADRUGA, C. R. et al. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, p.1163-1168, 1984.

MADRUGA, C. R. et al. Simulação e sorologia no mapeamento da instabilidade endêmica das babesioses: um estudo nas regiões do Boqueirão e Cariri, estado da Paraíba. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 8, 1993, Londrina, Paraná. **Resumo...** Londrina, 1993.

MAHONEY, D. F. The application of epizootiological principles in the control of babesiosis in cattle. **Bulletin Official International of Epizooties**, n. 81, p. 123-138, 1974.

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G. B. A note on the transformation of *Babesia bovis* (Syn. *B. argentina*) by the one host tick *Boophilus microplus*. **Research Veterinary Science**, v. 26, p. 253-254, 1979.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 292-298, 1972.

MAHONEY, D.F; WRIGHT, I. G; MIRRE, G. B. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infections. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 67, p. 197-203, 1973.

McCOSKER, P. J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M.; KRIER, J. P. (Eds). **Babesiosis**. New York: Academic Press, p.1-19, 1981.

McGUIRE, T. C. et al. Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p.788-93, 1991.

McLEOD, R., KRISTJANSON, P. Final report of joint esys/ILRI/ACIAR TickCost project- Economic impact of ticks and tick-borne disease to livestock in Africa, Asia and Australia. **International Livestock Research Institute**, Nairobi, Kenya, 1999.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, p. 37-103, 1984.

MELO, V. S. P. et al. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy herds of the Metalúrgica Region, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p. 146-150, 2001.

MENDONÇA, C. L. et al. Avaliação clínica e hematológica em bezerros Nelore infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, p. 52-60, 2003.

MENK, J. C. et al. Levantamento sorológico da *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, no semi-árido baiano, pela técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11, 1999, Salvador, Bahia. **Resumo...** Salvador, 1999. p. 205.

MORZARIA, S. et al. New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 201-205, 1992. Suplemento 3.

MOSQUEDA, J. et al. *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. **International Journal Parasitology**, v. 34, p. 1229-36, 2004.

MOURA, A. B. et al. Studies on the *Anaplasma marginale* THEILER, 1910 infection in *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) using 'nested' PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, p. 27-32, 2003.

MURASE, T. et al. Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected by *Babesia gibsoni*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, p. 259-61, 1996.

OLIVEIRA, A. A.; PEDREIRA, P. A. S.; ALMEIDA, M. F. R. S. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmose no estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 377-386, 1992.

OLIVEIRA, P.R. **Controle estratégico do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em bovinos de propriedades rurais dos municípios de Lavras e Entre Rios de Minas-MG**. Belo Horizonte – MG, 1993. 97p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.

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

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A .F. T. **Parasitologia Animal: Animais de Produção**. 1. ed. Rio de Janeiro: Publicações Biomédicas Ltda., 2002, 158 p.

PALMER, G. H. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitology Today**, v. 15, p. 253–300, 1999.

PALMER, G. H.; BROWN, W. C.; RURANGIRWA, F. R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 167-76, 2000.

PEREIRA, D. A. A. **Avaliação e otimização de Reações da Polimerase em Cadeia para diagnóstico molecular e estudo epidemiológico de *Babesia bovis***. 2006. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2006.

POTGIETER, F. T.; SUTHERLAND, B.; BIGGS, C. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 119-122, 1981.

QUEIROZ, P. R.; VALADARES-INGLIS, M. C.; INGLIS, P. W. Survival in soil and detection of co-transformed *Trichoderma harzianum* by nested PCR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 403-405, 2004.

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10. ed. Iowa: Saunders, 2007, 2065p.

RAMPERSAD, J. N. et al. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 81-87, 2003.

REITER, R.; WEILAND, E. Recently developed methods for the detection of babesial infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 21-23, 1989.

RIBEIRO, M. F. B. et al. Transmissão congênita da anaplasmose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 297-304, 1995.

RIBEIRO, M. F. B.; REIS, R. Prevalência da anaplasmose em quatro regiões do Estado de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 33, p. 57-62, 1981.

RIEK, R. F. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (*Sporozoa: Piroplasmidea*) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 17, p. 247-254, 1966.

RIEK, R. F. The life cycle of *Babesia bigemina* (SMITH & KILBORNE, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (CANESTRINI). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 15, p. 802-821, 1964.

RIKIHISA, Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 95-101, 2006.

RISTIC, M.; WATRACH, A. M. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. **American Journal of Veterinary Research**, v. 24, p. 267-277, 1963.

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

SACCO, A. M. S.; KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R. Cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da tristeza parasitária bovina. **Ciência Rural**, v. 31, p. 849-855, 2001.

SANTOS JÚNIOR, J. C. B.; FURLONG, J.; DAEMON, E. Controle do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em sistemas de produção de leite da microrregião fisiográfica fluminense do grande Rio - Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, v. 30, p. 305-311, 2000.

SANTOS, H. Q.; LINHARES, G. F. C.; MADRUGA, C. R. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e Elisa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, p. 133-137, 2001.

SCOLES, G. A. et al. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 668-675, 2005.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICROS E PEQUENAS EMPRESAS DO PIAUÍ (SEBRAE-PI). **Diagnóstico sócio-econômico das bacias leiteiras de Parnaíba e Teresina**. Teresina, PI: SEBRAE, 2004. 32p.

SHODA, L. K. et al. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 5139-5145, 2000.

- SMEENK, I. et al. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 71, p. 21–24, 2000.
- SMITH, R. D. et al. Bovine babesiosis: pathogenicity and heterologous species immunity of tick-borne *Babesia bovis* and *B bigemina* infections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 1957-65, 1980.
- SOARES, C. O. Princípios, padronização e validações de provas sorológicas. IN: MADRUGA, C. R; ARAÚJO, F. R; SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: EMBRAPA GADO DE CORTE, p.145-76, 2001.
- SOARES, C. O. et al. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 26-30, 2000.
- SOUZA, J. C. P. et al. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do Médio Paraíba. **Ciência Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 309-314, 2001.
- SOUZA, J. C. P. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileiro**, v. 20, p. 97-101, 2000a.
- SOUZA, J. C. P. et al. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 26-30, 2000b.
- SWAI, E. S. et al. A longitudinal study of sero-conversion to tick-borne pathogens in smallholder dairy young stock in Tanzania. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 129-137, 2005.
- TEBELE, N.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 199-3204, 1991.
- THEILER, A. Gall sickness of South Africa (anaplasmosis of cattle). **The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 23, p. 98–115, 1910.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. 8. ed. São Paulo: Roca, 2009. 520p.
- UILENBERG, G. Babesia - A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 3-10, 2006.

UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p.19-41, 1995.

VANZINI, V. R.; RAMIREZ, L. M. Babesiosis y anaplasmosis bovina – diagnostico, epidemiologia y control. **Veterinária Argentina**, v.3, p.137-190, 1995.

VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M. Diagnóstico em anaplasnose bovina. **Ciência Rural**, v. 31, p. 361-8, 2001.

VIEIRA, M. I. B. et al. Resposta imune humoral contra *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em bovinos submetidos a distintas estratégias de controle do carrapato vetor *Boophilus microplus* (Canestrine, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, p. 71-76, 2002.

VILORIA, M. I. V.; SALCEDO, J. H. P. Patofisiologia da infecção por *Babesia bovis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, 2004. Suplemento 1.

WAGNER, G. et al. Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 193-9, 1992. Suplemento 3.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ames, Iowa, 2007. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/boophilus_microplus.pdf>. Acessado em: 21 set. 2010.

ZAUGG, J. L.; GOFF, W. L.; FOREYT, W.; HUNTER, D.L. Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, p. 63–66, 1996.

ZINTL, A. et al. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. **Parasite Immunology**, v. 27, p. 115–120, 2005.

ANEXO

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação com Animais – CEEA.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 32155734 – e-mail: ceeapi@ufpi.br

Teresina, 05 de Outubro de 2010

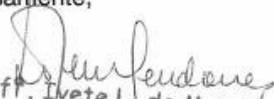
Ao (A)

Prof (a): Dra. Silvana Maria Medeiros de Sousa
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-CCA/UFPI

Sr. (a) Pesquisador (a)

Declaro para os devidos fins que o projeto de pesquisa intitulado: "**Aspectos epidemiológicos, patológicos e moleculares da tristeza parasitária bovina (TPB) na bacia leiteira de Parnaíba, Piauí.**" foi avaliado pelo Comitê de ética em Experimentação com Animais – CEEA/UFPI teve parecer **APROVADO** sob o nº. **038/2010**, Esclarecemos que o mesmo se encontra de acordo com os requisitos exigidos para apreciação de projetos de pesquisa.

Atenciosamente,


Prof. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

APÊNDICE

Apêndice A – Modelo da ficha de inquérito epidemiológico e exame clínico aplicado durante a visita às propriedades da bacia leiteira de Parnaíba.

Propriedade: _____
Proprietário: _____
Localização: _____ Município: _____
UF: _____ Telefone: () _____ Celular: () _____
E-mail: _____
Dia da Visita: ____/____/____

Período chuvoso: _____

Temperatura: Mín – [] Máx – [] UR: _____

Presença de carrapatos: [] Sim [] Não Em que época? _____

Presença de Moscas (mutuca, chifre, etc): [] Sim [] Não Em que época? _____

Usa carrapaticida? [] Não [] Sim Qual? _____

Faz rodízio de principio ativo? [] Não [] Sim

Tipo de Manejo: [] Intensivo [] Extensivo [] Semi-intensivo

Quantidade de bovinos: [] M [] F

Cultiva Pasto? [] Não [] Sim Qual (is)? _____

Faz rotação de pastagem? [] Não [] Sim Quanto tempo/pasto? _____

Faz suplementação mineral? [] Não [] Sim Qual? _____

Área alagada? [] Sim [] Não / Alguma lagoa/riacho? [] Sim [] Não

Rebanho é vacinado? [] Não [] Sim Quais? [] Raiva [] Clostridioses [] Botulismo [] Leptospirose [] Aftosa [] Brucelose [] Outras _____ Periodicidade? _____

Algum óbito no último ano (12 meses)? [] Não [] Sim Motivo? _____

Histórico de sinais clínicos da TPB? [] Não [] Sim

Quais os sinais? _____

Produção de Leite: [] Normal [] Diminuída / Histórico de Aborto? [] Sim [] Não

Animal tratado? [] Não [] Sim Tratamento? _____

Óbito por TPB? [] Não [] Sim

EXAME CLÍNICO E FÍSICO POR ANIMAL

	Nome ou N°	Sexo	Raça	Idade	TR (°C)	Mucosa	Carrapatos	Urina	VG
1.									
2.									
3.									
4.									
5.									
6.									
7.									
8.									
9.									
10.									

Outras observações: _____

¹Normal (N) / Ictérica (I) / Pálida (P)

²S = Sim / N = Não

Apêndice B – Prancha de figuras



Figura 1. Propriedade leiteira com sistema de criação extensiva. Bovinos da raça Girolando voltando do pasto.



Figura 2. Sistema de criação semi-intensiva, demonstrando vacas da raça Girolando se alimentando no cocho.



Figura 3. Bovino da raça Girolando apresentando orelha infestada por carrapatos (*R. microplus*).



Figura 4. Bovino da raça Girolando apresentando infestação por mosca do chifre (*Haematobia irritans*).



Figura 5. Vaca com mucosa vaginal hipocorada.

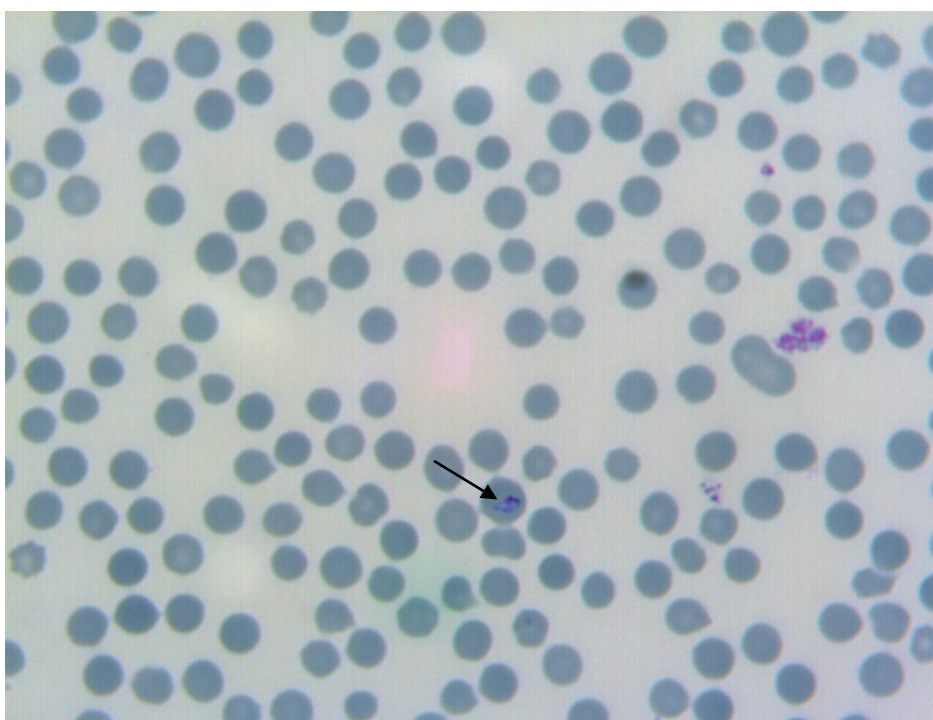


Figura 6. Trofozoíto de *B. bigemina* (→) em eritrócito observado em esfregaço de sangue periférico de bovino naturalmente infectado. (Panótico. 100X).

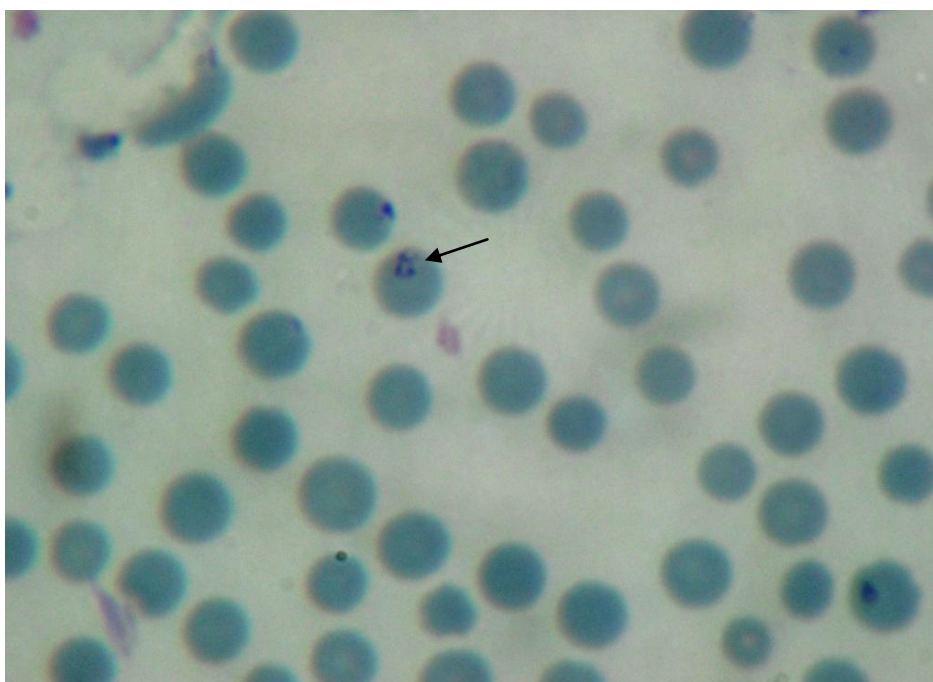


Figura 7. Merozoíto de *B. bovis* (→) em eritrócito observado em esfregaço de sangue periférico de bovino naturalmente infectado. (Panótico. 1000X).

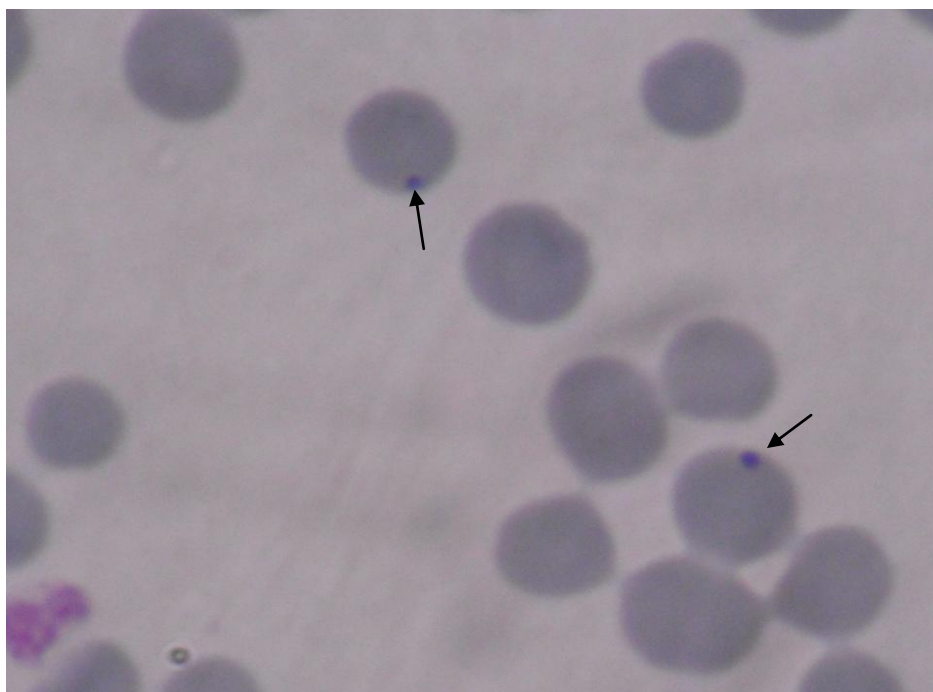


Figura 8. Corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* (→) observados em esfregaço de sangue periférico de bovino naturalmente infectado. (Panótico. 1000X).

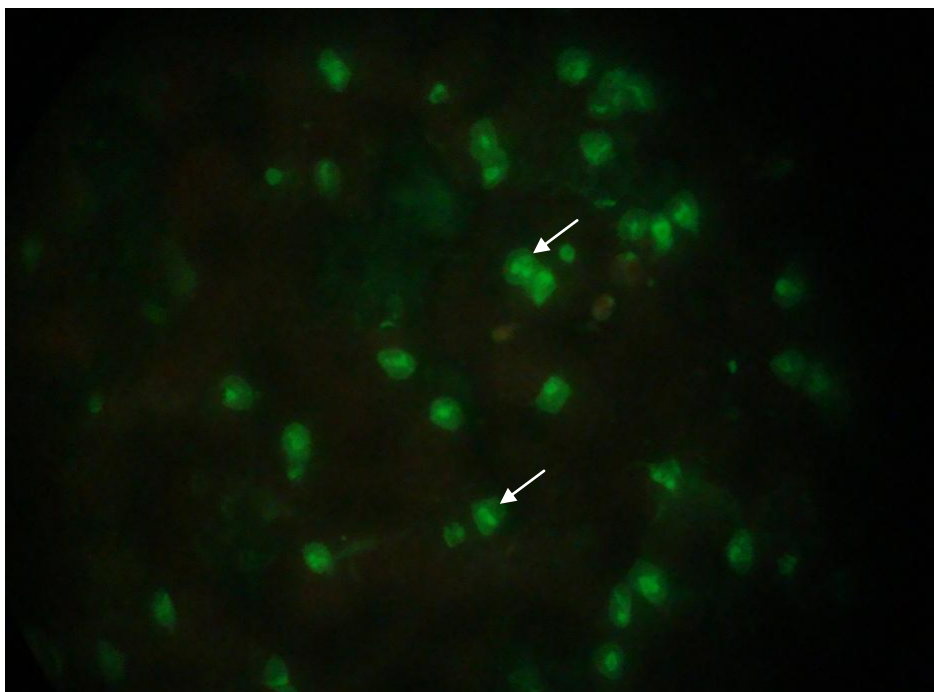


Figura 9. Reação de imunofluorescência indireta. Formas de *B. bigemina* marcadas por isoticianato de fluoresceína (→), demonstrando reatividade 1:40. Aumento: 100X.

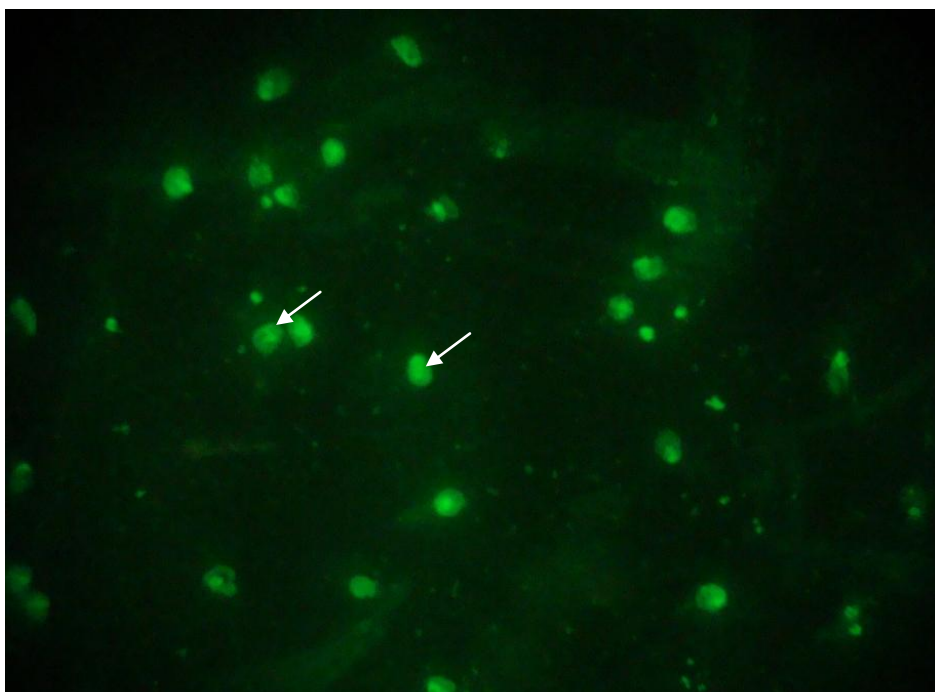


Figura 10. Reação de imunofluorescência indireta. Formas de *B. bovis* marcadas por isoticianato de fluoresceína (→), demonstrando reatividade 1:40. Aumento: 100X.

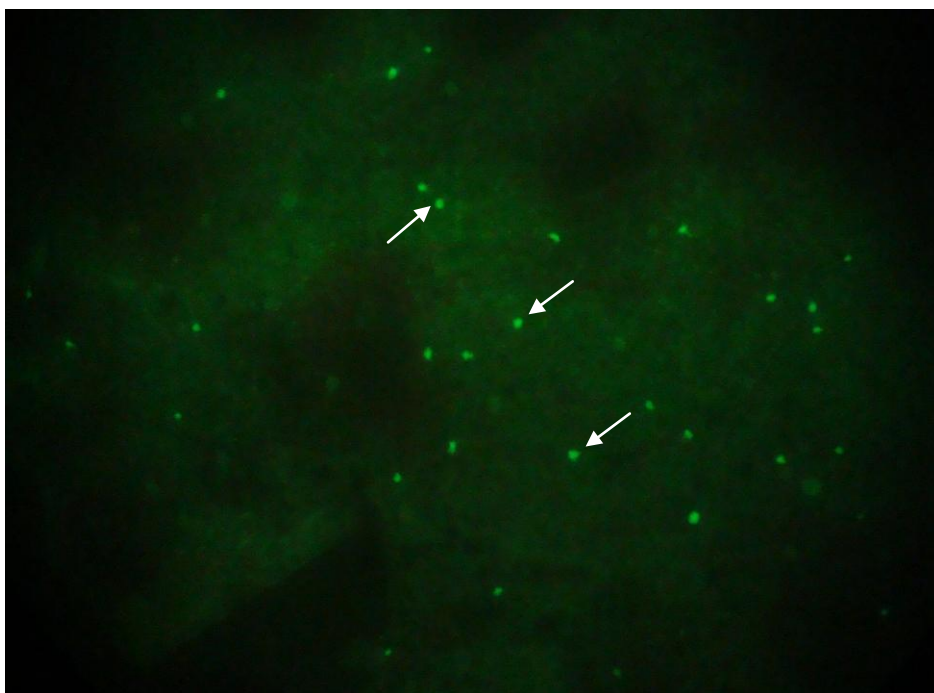


Figura 11. Reação de imunofluorescência indireta. Formas de *A. marginale* marcadas por isoticianato de fluoresceína (→), demonstrando reatividade 1:40. Aumento: 100X.