

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**EPIDEMIOLOGIA DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA EM DIFERENTES  
CATEGORIAS DE BOVINOS DE CORTE EM CONFINAMENTO E AVALIAÇÃO  
DA TRANSMISSÃO VERTICAL**

**MATHEUS FIGUEIREDO COELHO**

**Belo Horizonte**

**2022**

Matheus Figueiredo Coelho

**EPIDEMIOLOGIA DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA EM DIFERENTES  
CATEGORIAS DE BOVINOS DE CORTE EM CONFINAMENTO E AVALIAÇÃO  
DA TRANSMISSÃO VERTICAL**

Dissertação apresentada ao colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Tiago Facury Moreira

Coorientadores: Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

Antônio Último de Carvalho

**Belo Horizonte**

**2022**

C672e Coelho, Matheus Figueiredo, 1988 -  
Epidemiologia da tristeza parasitária bovina em diferentes categorias de bovinos de corte em confinamento e avaliação da transmissão vertical / Matheus Figueiredo Coelho. -2022.  
73f. il.

Orientador: Tiago Facury Moreira  
Coorientadores: Júlia Angélica Gonçalves da Silveira  
Antônio Último de Carvalho

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Medicina e cirurgia veterinárias

Bibliografia: f. 59 – 71.

1. Bovino – Doenças - Teses - 2. Anaplasmoses - Teses – 3. Babesiose em bovino - Teses -  
I. Moreira, Tiago Facury – II. Silveira, Júlia Angélica Gonçalves da – III. Carvalho, Antônio  
Último de – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

**CDD – 636.089 69**

Bibliotecário responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

MATHEUS FIGUEIREDO COELHO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovado(a) em 29 de agosto de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Tiago Facury Moreira - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Camila de Valgas e Bastos

Dr.(a). Rodrigo Melo Meneses

Dr.(a). Gustavo Henrique Ferreira Abreu Moreira



Documento assinado eletronicamente por Tiago Facury Moreira, Professor do Magistério Superior, em 29/08/2022, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Camila de Valgas e Bastos Castro, Professora do Magistério Superior, em 29/08/2022, às 14:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Rodrigo Melo Meneses, Professor do Magistério Superior, em 29/08/2022, às 20:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Gustavo Henrique Ferreira Abreu Moreira, Usuário Externo, em 30/08/2022, às 23:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1684369 e o código CRC 528A820D.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir a realização dos trabalhos, por ser a força motriz do dia a dia e pela existência de seres admiráveis que são os animais.

À minha esposa Gabriela pelo amor, companhia e incentivo. Sua compreensão e seus conselhos me ajudaram a chegar aqui.

Ao meu filho Marcelo que é a alegria do dia a dia e a motivação para progressão pessoal e profissional.

Aos meus Pais, Romel e Maria Goretti, pelos ensinamentos e valores e aos irmãos Erika e Helder pelo carinho e incentivo.

Agradeço à família Siano, meu sogros Michele e Simone, pela compreensão e paciência.

Ao professor Tiago Facury Moreira que me orientava de modo sereno e assertivo e teve paciência e compreensão em muitos momentos difíceis e pelos ensinamentos.

À professora Júlia Angélica Gonçalves da Silveira que disponibilizou o laboratório para análises e pela sua disponibilidade e ensinamentos.

Aos Professores Antônio Último de Carvalho, Elias Jorge Facury Filho e Rodrigo Melo Meneses pelos ensinamentos e compreensão.

Ao colega Henrique Peçanha pela sua ajuda e companhia durante a estadia na fazenda.

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia Veterinária Gustavo Palacios, Mayara Lombardi, Anysleide Pérez pela disponibilidade em ajudar nas atividades laboratoriais.

À Fazenda de Santa Mônica que disponibilizou os animais e a estrutura para a execução do estudo, além de contribuir no fornecimento de materiais de laboratório. Agradeço também, aos colaboradores da fazenda que atuam na lida com os animais que se dispuseram a ajudar durante a coleta de material.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e as agências de fomento CNPq e FAPEMIG que possibilitaram a realização do estudo.

## RESUMO

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é uma doença endêmica no Brasil que causa prejuízos econômicos e redução do bem-estar em bovinos de corte. Conhecer a dinâmica da TPB, bem como abordar sua transmissão vertical é fundamental para entender a epidemiologia da doença. Objetivou-se com este trabalho avaliar a frequência da TPB em diferentes categorias de bovinos de corte em um sistema de confinamento em Minas Gerais, bem como avaliar a transmissão vertical da doença em bezerros recém-nascidos. Para determinar a frequência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina* foram avaliados 665 animais divididos em cinco categorias: animais de Chegada (CH), novilhas do Diagnóstico de Gestação (DG), bezerros Recém-Nascidos (RN), bezerros Demamados (BD) e animais da Terminação (TR). A avaliação em todas as categorias foram realizadas através de esfregaço sanguíneo, hematócrito e Imunofluorescência Indireta (RIFI). Ademais, em amostras do grupo RN foram realizados *n*PCR e análise da transferência de imunidade passiva. Foram encontrados, ao esfregaço sanguíneo, *A. marginale* em todas as categorias e *Babesia sp.* em nenhuma das amostras. Apenas a categoria RN apresentou significativo valor de hematócrito abaixo do normal (20,1%). A RIFI indicou área de estabilidade enzootica para os três agentes na categoria animais de chegada e nas novilhas durante o diagnóstico de gestação. O grupo terminação só não possui estabilidade para *B. bigemina*, e os animais da desmama foram instáveis para todos os agentes. Em mais de 90% dos bezerros recém-nascidos a transmissão de imunidade passiva foi boa a excelente (PT >5,8 g/dL). Na avaliação molecular desse mesmo grupo, observou-se a taxa de transmissão vertical de *A. marginale* de 41,3%, *B. bigemina* 0,8% e nenhuma transmissão vertical para *B. bovis*.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*. *Babesia bovis*. *Babesia bigemina*. *n*PCR, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

## ABSTRACT

Tick Fever is an endemic disease in Brazil that causes economic losses and reduced welfare in beef cattle. Knowing the dynamics of tick fever as well as addressing its vertical transmission is essential to understand the epidemiology of the disease. The objective of this study was to evaluate the frequency of tick fever in different categories of beef cattle in a confinement system in Minas Gerais, as well as to evaluate the vertical transmission of the disease in newborn calves. For the detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *B. bigemina*, 665 animals were used, divided into five categories: Arrival (CH), Pregnancy Diagnosis (DG), Newborn (NB), Weaned (BD) and Termination (TR). The evaluation in all categories was done through blood smear, hematocrit and Immunofluorescence Assay (IFA). Furthermore, in samples from newborn animals, *n*PCR and analysis of passive immunity transfer were performed. *A. marginale* in all categories and *Babesia* sp. in any of the samples. Only the NB category presented a significant hematocrit value below normal (20.1%). The IFA indicated an area of enzootic stability for the three agents in the category of arrival animals and in the heifers of the pregnancy diagnosis. The termination group was not stable for *B. bigemina*, and the weaning animals were unstable for all agents. In more than 90% of newborn calves, transmission of passive immunity at an excellent to good level (PT >5.8 g/dL) was found. In the molecular evaluation of this same group, it was observed a vertical transmission rate of *A. marginale* of 41.3%, *B. bigemina* 0.8% and no vertical transmission for *B. bovis*.

Keywords: *Anaplasma marginale*. *Babesia bovis*. *Babesia bigemina*. Prevalence. *n*PCR. IFA.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos de experimentação, categoria, número e idade média dos animais. ....	31
Tabela 2: Reagentes para PCR de <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i> e <i>A. marginale</i> (msp4). ....	35
Tabela 3: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de <i>A. marginale</i> . ....	36
Tabela 4: Programa utilizado para realização do nPCR para amplificação de <i>A. marginale</i> . ....	36
Tabela 5: Sequência de iniciadores e produto obtido para diagnóstico de <i>B. bigemina</i> . ....	37
Tabela 6: Programa utilizado para realização do nPCR para amplificação de <i>B. bigemina</i> ....	37
Tabela 7: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de <i>B. bovis</i> . ....	37
Tabela 8: Programa utilizado para realização do nPCR para amplificação de <i>B. bovis</i> . ....	38
Tabela 9: Percentagem (%) de animais positivos no esfregaço sanguíneo para os agentes da TPB em diferentes categorias de bovinos de corte em um sistema de confinamento. ....	39
Tabela 10: Mediana do hematócrito e percentual de animais com hematócrito menor que 24% em diferentes categorias de bovinos de corte em confinamento. ....	40
Tabela 11: Frequência (%) de animais positivos ao esfregaço sanguíneo para os agentes da TPB e a sorologia para anticorpos IgG anti- <i>A. marginale</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i> e valores de mediana e o hematócrito menor que 24% em diversas categorias de bovinos de corte em confinamento. ....	41
Tabela 12: Porcentagem de bezerros de corte (3/4 Angus x1/4 Nelore) recém-nascidos positivos para TPB na nPCR em sistema de confinamento. ....	42
Tabela 13: Frequência de bezerros de corte recém-nascidos (RN) positivos no esfregaço sanguíneo e na nPCR para <i>A. marginale</i> , <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> em um sistema de confinamento. ....	43
Tabela 14: Percentual de bezerros de corte recém-nascidos de acordo com a categoria de transferência imunidade passiva em um sistema de confinamento. ....	49

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Prevalência da TPB no Brasil segundo diversos estudos publicados entre 2006 e 2020. ....	25
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do <i>Anaplasma marginale</i> nos hospedeiros intermediário (bovino) e definitivo (carrapato) e vias de transmissão mecânica e biológica. ....	17
Figura 2: Ciclo biológico de <i>Babesia sp</i> em bovinos. ....	19
Figura 3: Categoria Chegada (A), Novilhas gestantes (B), Recém-nascidos (C), Desmama (D), Terminação (E).....	32

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Frequência (%) de animais, de diferentes categorias com sorologia positiva para anticorpos IgG anti- <i>A. marginale</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i> .....	42
--	----

## ANEXOS

Anexo 1- Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG).....	72
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C = Graus Celsius

AGNE = Ácido graxo não estereificado

BD = Categoria Bezerros Desmama

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

CH = Categoria Animais de Chegada

DG= Categoria Novilhas Diagnóstico de Gestação

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA = Ensaio imunossorvente ligado a enzimas

IFN- $\gamma$  = Inteferon gamma

IgG = Imunoglobulina da classe G

IgM = Imunoglobulina da classe M

IL-12 = Interleucina 12

iNOS = óxido nítrico sintase redutível

Km = Quilômetro

mL = mililitro

mM = milimolar

MSP = *Major Surface Protein* (Proteína principal de superfície)

NO = óxido nítrico

nPCR = Reação em cadeia da polimerase tipo "nested"

NRC = *National Research Council*

pb = Pares de base

PBS = *Phosphate Buffered Saline* (Solução de tampão fosfato)

PCR = *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

qPCR = Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real

RIFI = Reação de imunofluorescência indireta

RN = Categoria Recém-Nascidos

TAE = Tampão Tris-Acetato-EDTA

TPB = Tristeza Parasitária Bovina

TR = Categoria Animais de Terminação

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

$\mu$ L = Microlitro

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 Gerais .....	13
2.2 Específicos .....	14
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
3.1 Histórico .....	14
3.2 Tristeza Parasitária Bovina (TPB).....	15
3.2.1 <i>Anaplasma marginale</i> .....	16
3.2.2. <i>Babesia bovis</i> e <i>B. bigemina</i> .....	18
3.3 Epidemiologia da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) .....	20
3.3.1 Importância do estudo epidemiológico da TPB .....	23
3.4 Transmissão vertical dos agentes da TPB .....	26
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1. Considerações éticas .....	28
4.2. Local e período de atividades.....	28
4.3. Grupo de animais .....	29
4.4 Coleta de sangue.....	33
4.5 Análises laboratoriais .....	33
4.5.1 Esfregaço sanguíneo.....	34
4.5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....	34
4.5.3 Análise molecular.....	35
4.6 Análises estatísticas.....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	39
5.1 Esfregaço sanguíneo – Diagnóstico etiológico .....	39
5.2. Hematócrito.....	40

5.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....	40
5.4 Análise Molecular - Bezerros Recém-nascidos (RN) .....	42
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
6.1 Esfregaço sanguíneo – Diagnóstico etiológico .....	43
6.2. Hematócrito .....	45
6.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....	46
6.3.1 Análise por categoria animal .....	46
6.3.2 Análise comparativa entre as categorias .....	53
6.4 Análise Molecular - Bezerros Recém-nascidos (RN) .....	54
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>57</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	<b>58</b>
REFERÊNCIAS .....	59
ANEXOS .....	72

# 1. INTRODUÇÃO

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de doenças infecciosas causada, principalmente, pela rickettsia *Anaplasma marginale* e/ou pelos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina*, que acometem os eritrócitos dos bovinos causando assim manifestações clínicas como anorexia, febre, anemia, icterícia, hemoglobinúria, queda de produtividade e mortalidade nos animais mais sensíveis (Kessler e Schenk, 1998; Gonçalves, 2000).

A doença é considerada endêmica em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a perda econômica anual é cerca de 3,5 milhões de dólares na produção bovina, principalmente em áreas de instabilidade enzoótica (Trindade *et al.*, 2010 e Grisi *et al.*, 2014). No Rio Grande do Sul, dos animais que vieram a óbito por doença parasitárias, 50% foram por TPB (Almeida *et al.*, 2006). Na América Latina, as perdas econômicas anuais causadas pela anaplasmoze variam de US\$ 800 a 875 milhões (Kocan *et al.*, 2003).

A transmissão dos três agentes se dá pelo vetor biológico *Rhipicephalus microplus*, ixodídeo que possui distribuição intimamente relacionado a presença do carrapato *Rhipicephalus microplus* que se encontra entre os paralelos 32°N e 32°S em regiões tropicais e subtropicais (Guglielmone, 1995). Os agentes também podem ser transmitidos de forma iatrogênica, mediante transfusão sanguínea, fômites contaminados com sangue, incluindo agulhas e instrumentos cirúrgicos e, no caso de *A. marginale*, a transmissão pode ocorrer mecanicamente por dípteros hematófagos do gênero *Tabanus* e *Stomoxys* (Kocan *et al.*, 2010 e Aubry e Geale, 2011). A transmissão vertical da TPB não é comum, mas há casos tanto da infecção vertical da babesiose (Bacarense *et al.*, 2001) quanto da anaplasmoze, sendo esse mais frequente e apresentando importância epidemiológica na transmissão do agente em algumas regiões (Kocan *et al.*, 2003; Aubry e Geale, 2011 e Meneses, 2013).

O diagnóstico da TPB pode ocorrer por muitas técnicas. Tradicionalmente, suspeita-se da TPB pelos sinais clínicos e/ou alterações de hematócrito e depois a doença é confirmada por esfregaços sanguíneos, porém a sensibilidade adequada do esfregaço somente ocorre quando a parasitemia é alta e os sinais clínicos podem ser inespecíficos (Brito *et al.*, 2010 e 2013). Métodos sorológicos podem também ser empregados para diagnóstico e ainda são os mais utilizados em estudos epidemiológicos. Dentre eles, o ELISA (Ensaio

imunoabsorventes ligados a enzimas) e a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) são os mais usuais apresentando alta sensibilidade e especificidade (Bose *et al.*, 1995). Técnicas moleculares como o PCR também podem ser empregadas para este fim e vem sendo utilizada cada vez mais na rotina em animais de produção devido a elevada precisão em identificar fragmentos de DNA do agente (Costa-Júnior *et al.*, 2006).

Devido à importância da TPB, conhecer a epidemiologia da doença se mostra necessário, uma vez que esse tipo de estudo permite entender a dinâmica da infecção e da doença, identificar quais são os agentes predominantes, prever a situação epidemiológica e assim essas informações podem servir de base para proposição de medidas de controle, estratégias de monitoramento e prevenção de surtos. Salienta-se também que, no gado de corte, estudos epidemiológicos da TPB são escassos no Brasil e tanto essa atividade quanto a atividade leiteira, nas últimas décadas, vêm vivenciando mudanças no sistema de produção que podem contribuir para alterações nos padrões de ocorrência da TPB (Madruga *et al.*, 1987 e Vespasiano, 2016). Portanto, deve ser prioritário o desenvolvimento de pesquisas que possam elucidar a dinâmica da TPB nos diversos sistemas produtivos do Brasil, o que contribui no desenvolvimento de programas de controle e prevenção dessa enfermidade.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Gerais**

Avaliar a prevalência dos principais agentes da Tristeza Parasitária Bovina (TPB), *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina*, em diferentes faixas etárias de bovinos e a transmissão vertical dos agentes em bezerros recém-nascidos em um rebanho confinado de gado de corte criado de modo intensivo em uma fazenda no município de São João da Ponte, Minas Gerais, Brasil.

## 2.2 Específicos

- Avaliar a frequência de riquetsemia e parasitemia pelo esfregaço sanguíneo nas diversas faixas etárias e sua relação com a TPB.
- Avaliar as alterações de hematócrito ocorridas nas diversas faixas etárias e sua relação com a TPB.
- Avaliar, através da sorologia, a dinâmica dos anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em animais de diversas categorias.
- Avaliar a transferência de imunidade passiva em bezerros recém-nascidos
- Avaliar a frequência de transmissão vertical dos agentes da TPB em bezerros recém-nascidos

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Histórico

Babes em 1888 investigou surtos de doenças que causavam hemoglobinúria em bovinos na Romênia e acreditando que o agente causador era uma bactéria, denominou o agente de *Haematococcus bovis*. Ele então foi o primeiro pesquisador a descrever piroplasma no sangue desses animais (Angus, 1996). Posteriormente, nos EUA, investigações por Smith e Kilborne (1893) demonstraram o organismo causador da "febre do Texas" (babesiose) denominado *Pyrosoma bigminum* (*Babesia bigemina*). Esses mesmos autores, demonstraram a transmissão da Babesia de um artrópode (*Boophilus annulatus*) para os bovinos. Após isto, foram relatados casos de babesiose em diversas partes do mundo. Na Argentina, Lignières (1903) descreveu duas formas de 'Tristeza' (babesiose) "forma A" e "forma C". Estes foram mais tarde conhecidos como *Babesia bigemina* e *B. argentina* (*B. bovis*), respectivamente.

Quanto à anaplasnose bovina, em 1893 o agente foi descoberto em esfregaço sanguíneo de bovinos doentes pelos pesquisadores, Smith e Kilbourne, em seus estudos com *Babesia bigemina*. Porém na ocasião, mesmo visualizando corpúsculos semelhantes a coccus na margem dos eritrócitos, os pesquisadores acreditavam que isso se tratava de um estágio do ciclo da *B. bigemina* ao invés da riquetsia em uma infecção mista. Posteriormente, Theiler (1910) foi o primeiro a descrever o *A. marginale* na África do Sul ao reconhecer que havia infecção mista e depois isolando os agentes em infecções puras de *B. bigemina* e *A. marginale*.

### 3.2 Tristeza Parasitária Bovina (TPB)

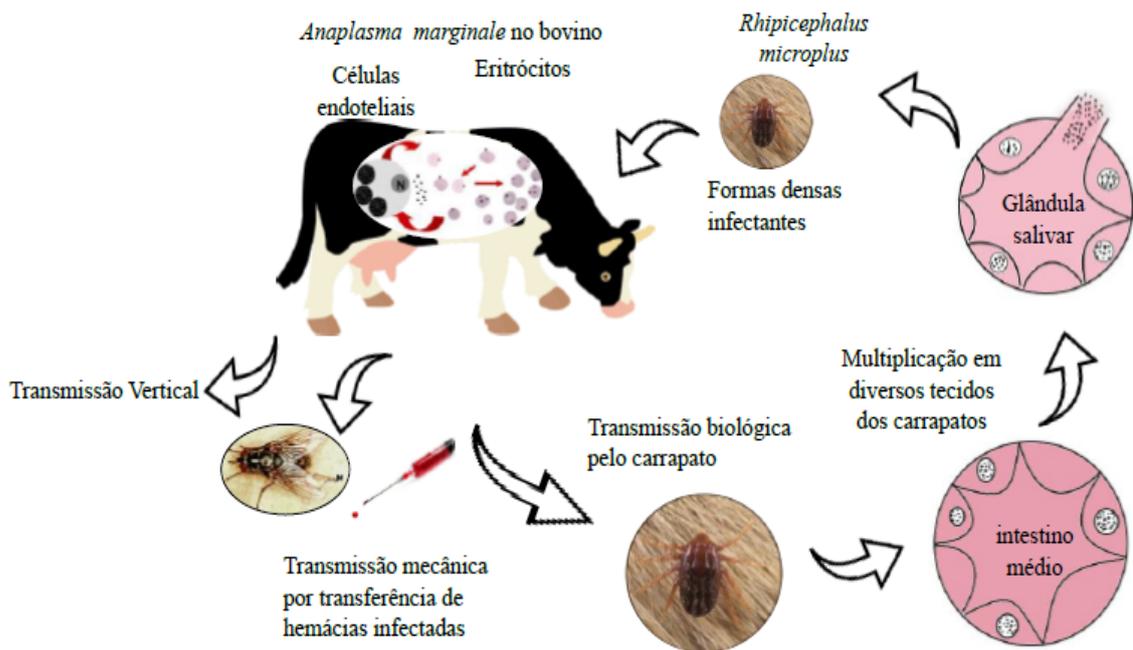
A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de doenças infecciosas causada principalmente pela rickettsia do gênero *Anaplasma* e pelos protozoários do gênero *Babesia*. As espécies desse complexo que acometem os bovinos no Brasil e que se denominam anaplasnose e babesiose são respectivamente *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina* (Kessler e Schenk, 1998).

Apesar de apresentarem algumas diferenças, tanto a anaplasnose quanto a babesiose são tratadas dentro do mesmo complexo de doenças por terem em comum diversas características como: agentes etiológicos intraeritrocitários obrigatório, resultando em sinais clínicos semelhantes devido a destruição de hemácias. Também, todos os agentes são transmitidos principalmente por carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus* e, de forma comum, pode ocorrer a infecção concomitante por dois ou três agentes. O tratamento é outro ponto em comum, pois os agentes podem ser tratados com mesma droga, o dipropionato de imidocarb, o que altera é a dosagem que para anaplasnose requer dose duas vezes e meia maior do que para babesiose. No caso da infecção for somente *A. marginale*, esta pode ser tratada de modo específico com antimicrobianos da classe das tetraciclina e com enrofloxacino, enquanto a babesiose com diaceturato de diminazeno. (Facury-Filho 2012 e Santos *et al.*, 2019).

### 3.2.1 *Anaplasma marginale*

*Anaplasma marginale* pertence ao reino das bactérias, filo protobactéria, classe Alphabacteria, ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae. São parasitos obrigatórios de eritrócitos e no esfregaço sanguíneo após coloração por Giemsa, apresentam-se como pequenos "corpúsculos de inclusão" arredondados vermelho-escuros com aproximadamente 0,3 a 1 µm de diâmetro no eritrócito, tipicamente na sua margem externa (Taylor *et al.*, 2017).

O ciclo biológico de desenvolvimento do *A. marginale* se inicia quando o carrapato ingere eritrócitos infectados durante o seu repasto sanguíneo. A rickettsia então, replica-se inicialmente nas células intestinais do artrópode com posterior infecção de demais tecidos, incluindo a glândula salivar que irá servir como carreadora do agente para os bovinos. Dentro do carrapato o parasita se apresenta em duas formas: reticulada ou densa. Observa-se, primeiramente, a forma reticulada, a qual se divide por fissão binária e parece ser a forma vegetativa. Em seguida muda para a forma densa, forma esta infecciosa e que consegue sobreviver extracelularmente (Figura 1). Nos bovinos, os corpúsculos iniciais de *A. marginale* se aderem à superfície dos eritrócitos por um processo chamado rofecitose, que consiste na invaginação da membrana plasmática das hemácias formando um vacúolo parasitóforo. Nesse vacúolo, o agente se multiplica por fissão binária e saindo das hemácias sem rompê-las e prosseguindo-se a infecção de outras hemácias. O período de incubação da doença é variável, mas se encontra por volta de 7 a 60 dias, com média de 28 dias após infecção (Ribeiro e Passos, 2002 e Kocan *et al.*, 2003).



Fonte: Adaptação de Kocan et al. (2003) e Rodríguez et al. (2009). Ilustração: Isabela Melo, 2019.

Figura 1: Ciclo biológico do *Anaplasma marginale* nos hospedeiros intermediário (bovino) e definitivo (carrapato) e vias de transmissão mecânica e biológica.

Quanto a transmissão de *A. marginale* para o hospedeiro, esta pode ocorrer de três formas: biológica, mecânica e vertical. A biológica ocorre através de carrapatos, dos quais mais de 20 espécies transmitem a rickettsia no mundo. No Brasil a espécie responsável pela transmissão é o *Rhipicephalus microplus*, que se contamina ao ingerir eritrócitos infectados com as rickettsias e depois as transmitem ao bovino por meio do repasto sanguíneo (Guglielmone, 1995 e Ribeiro e Lima 1996). Já a transmissão mecânica ocorre através da picada de dípteros hematófagos do gênero *Tabanus* e *Stomoxys* e também por meio de transfusão sanguínea, de fômites contaminados com sangue como instrumentos cirúrgicos e agulhas (Kocan *et al.*, 2010 e Aubry e Geale, 2011). Outra forma de contaminação pelo agente é através da transmissão vertical. Pontua-se que os bovinos persistentemente infectados e os carrapatos machos se comportam como um reservatório para a transmissão mecânica e/ou biológica do patógeno (Kocan *et al.*, 2010).

Quanto a sintomatologia clínica da anaplasmosse, esta se manifesta na forma de superaguda, aguda, crônica e subclínica. A forma superaguda é rara, em poucas horas ocorre

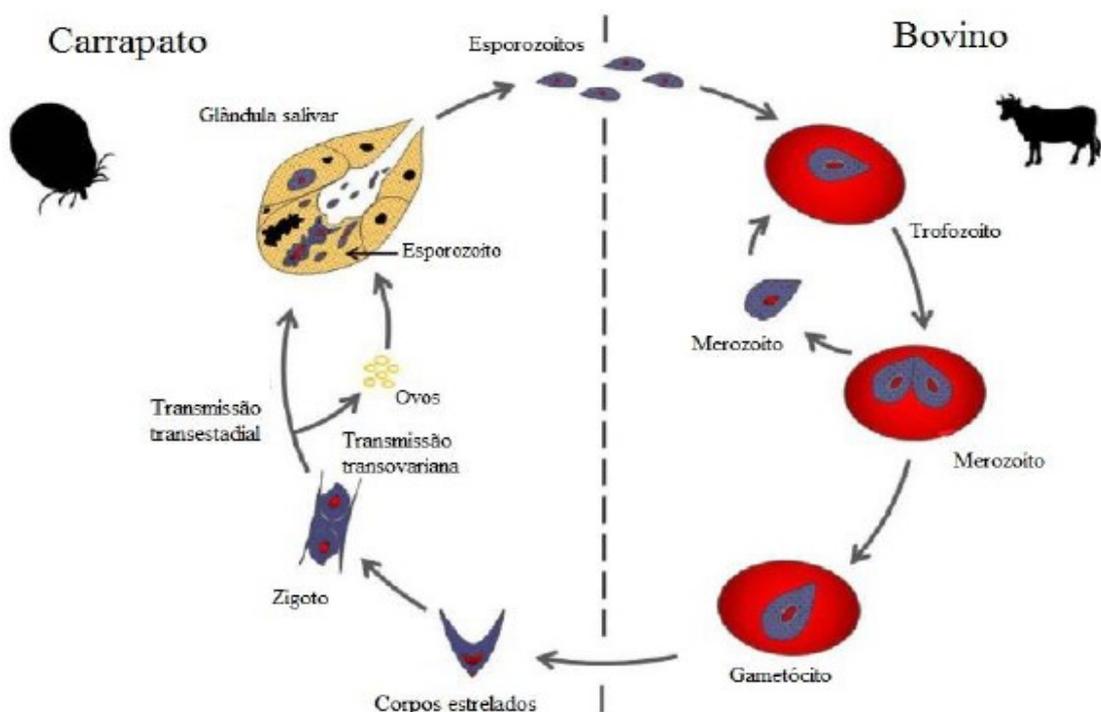
morte do animal e ocorre em bovinos acima de três anos de vida sem contato prévio com o agente. Na forma aguda observa-se anemia grave, icterícia, depressão, fraqueza, emagrecimento progressivo, frequência cardíaca e respiratória aumentadas, aborto, inapetência, desidratação e febre (39,4 a 41,7°C) que persiste por três a sete dias e provável morte. A doença crônica segue os casos agudos e pode persistir por vários meses, se caracterizando por anorexia, perda de peso, anemia e icterícia. Animais jovens são mais resistentes e geralmente apresentam a forma branda da doença, que então ocorre em animais de até um ano de idade e com o passar do tempo pode tornar-se severa (Ristic, et al 1972, Waner et al., 2010 e Taylor et al., 2017).

### **3.2.2. *Babesia bovis* e *B. bigemina***

*Babesia bovis* e *B. bigemina* são protozoários de filo Apicomplexa da ordem Piroplasmorida que parasitam hemácias de ruminantes. *Babesia bovis* é um microrganismo pleomórfico pequeno, tipicamente identificado como um único corpúsculo, como pequenos corpúsculos arredondados ou como corpúsculos pareados em formato de pera, em um ângulo obtuso, no centro do eritrócito maduro. A forma arredondada mede 1 a 1,5 µm e o corpúsculo piriforme mede 1,5 × 2,4 µm de tamanho. As formas de “anel de sinete” vacuolizadas são especialmente comuns. Já a *B. bigemina* é uma grande Babesia pleomórfica tipicamente vista e identificada pelos corpúsculos em formato de pera unidos em um ângulo agudo, no interior do eritrócito maduro. As formas arredondadas medem 2 µm e as formas piriformes alongadas medem 4 a 5 µm. Os estágios eritrocíticos carecem de conoide, microporos e mitocôndria típica, mas apresentam anéis polares anterior e posterior e, tipicamente, duas roptrias (Taylor et al., 2017).

Muitas espécies de carrapatos veiculam os agentes ao redor do mundo, mas o carrapato responsável pela transmissão da doença aos bovinos no Brasil é o *Rhipicephalus microplus*. Transmissão mecânica também pode ocorrer por meio de transfusão sanguínea e fômites contaminados. Por último, ainda há a possibilidade de transmissão vertical, em que no caso de *B. bigemina* há registros em bezerros que datam de 1936 feitos por Zolotareff e Roux (1939). *B. bovis* foi relatada em fetos por Yakimoff (1936) e em bezerros por Waintraub (1938).

Quanto ao ciclo biológico, o carrapato contaminado ao fazer o repasto sanguíneo no bovino inocula esporozoítos na corrente sanguínea que irá penetrar na membrana celular de um eritrócito com a ajuda de complexo apical especializado. Dentro da hemácia, o esporozoítos se transforma em um trofozoítos que dará origem a dois merozoítos pelo processo de merogonia. Alguns merozoítos se transformam em gametócitos (formas sexuadas) que infecta o carrapato ao se alimentar de eritrócitos contaminados. No intestino do carrapato as formas sexuadas formam os corpos estrelados que são os gametas masculinos e femininos, que se fundirão para dar origem ao zigoto que penetram as células e sofrem divisão por esquizogonia, originando os esporocinetos, que serão depois liberados na hemolinfa e atingirão outros órgãos inclusive o ovário. Com isso, irão penetrar e multiplicar-se nos óvulos ocorrendo então a transmissão transovariana (Figura 2). Nas larvas do carrapato, o parasito se multiplica no sistema digestivo, migra e multiplica na glândula salivar dando origem a forma infectante, os esporozoítos, que serão transmitidos aos bovinos no caso da *B. bovis* no estágio de larvas e na *B. bigemina* as formas infectantes só serão formadas em ninfas e carrapatos adultos (Kessler e Schenk, 1998 e Bock *et al.*, 2004).



Fonte: Adaptado de (Schnittger *et al.*, 2012)

Figura 2: Ciclo biológico de *Babesia sp* em bovinos.

O período de incubação da *Babesia* sp. pode variar entre sete a 14 dias e quanto aos sinais clínicos, a doença aguda por *B. bovis* geralmente ocorre por três a sete dias, com febre (40°C) inicialmente seguido por depressão, inapetência, taquicardia e fraqueza. Frequentemente, há hemoglobinúria e em casos prolongados ocorre anemia e icterícia. Babesiose cerebral é causada pela *B. bovis* e caracteriza-se como uma síndrome cortical manifestando sinais neurológicos, em que o prognóstico é na maioria das vezes fatal. Esta forma clínica está associada à agregação de eritrócitos infectados na microcirculação nos leitos capilares do cérebro.

Na babesiose causada por *B. bigemina*, os sinais clínicos estão diretamente relacionados à destruição de eritrócitos, em que hemoglobinúria está presente mais cedo e de forma mais consistente que na *B. bovis* podendo a febre ser menos intensa. Não há envolvimento cerebral e o gado agudamente atingido não é tão afetado de forma severa como na *B. bovis*. Porém em alguns casos a doença pode progredir rápido com anemia súbita grave, icterícia e morte. (Callow et al., 1993, De Vos e Potgieter, 1994 e Bock et al., 2004)

### **3.3 Epidemiologia da Tristeza Parasitária Bovina (TPB)**

O conhecimento da situação epidemiológica da TPB está relacionado com a presença dos vetores de seus agentes. A ocorrência de babesiose está intimamente relacionada à presença do carrapato *Rhipicephalus microplus* que se encontra entre os paralelos 32°N e 32°S em regiões como África, Austrália, Ásia, América Central e do Sul, ficando de fora parte do município de Santa Vitória do Palmar e Chuí no extremo sul do Rio Grande do Sul, Uruguai e o Sul da Argentina. Na América do Norte não é citada a presença de *B. bovis*, no entanto, *B. bigemina* está presente neste continente (Bock et al., 2004 e Vidotto, 2002 e Taylor et al., 2017). Como observação, essas babesias podem ser transmitidas por outros carrapatos como o *R. annulatus* e *R. geigy* e no caso de *B. bigemina* também pelo *R. evertsi* (McCosker, 1981). Já anaplasmose pode ocorrer em áreas livres do carrapato, pois sua transmissão também ocorre por moscas hematófagas, fômites contaminados e via vertical.

Outro ponto na epidemiologia da TPB diz respeito à aquisição de imunidade aos agentes da doença pelos bovinos. Animais jovens são mais resistentes do que adultos. Além dos anticorpos maternos fornecerem aos bezerros proteção frente aos desafios por

aproximadamente dois meses; segundo Farias (1995), essa proteção por anticorpos colostrais, que contra *B. bovis* permaneceria em titulações apreciáveis até no máximo 90 dias e, contra *B. bigemina* por volta 60 dias de vida, depois desse tempo adquire-se imunidade inata forte entre três e nove meses de idade. A reação imunológica nos animais jovens é diferente dos adultos. Nos primeiros, o pico de produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  ocorre três dias mais cedo, e o pico sérico de IFN- $\gamma$  nos bezerros ocorre cinco dias antes do que nos adultos. Além disso, iNOS (óxido nítrico sintase indutível) foi detectado só nos bezerros e a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos esplênicos dos bezerros foram maior do que dos adultos quando infectados com *B. bovis*. (Goff *et al.*, 2010 e Santos *et al.*, 2019). Ainda animais jovens possuem hemoglobina fetal que é mais resistente à infecção do que a hemoglobina de adultos; possuem eritropoiese intensa e timo funcional.

A partir disso, foi formulado por Mahoney e Ross (1972) e Mahoney (1974 apud Jonsson *et al.*, 2012) três situações epidemiológicas para *B. bovis*, que atualmente ainda são referência para estudos na área, tanto que o conceito foi abrangido para demais agentes da TPB. A primeira situação se configura como **áreas livres** em que não há a presença do carrapato como em regiões acima do paralelo 32°N e abaixo do 32°S, bem como em regiões de elevada altitude onde o frio limita o desenvolvimento do artrópode.

A segunda situação é a área de **instabilidade enzoótica** que se situa próximo aos paralelos 32°N e 32°S e são conhecidas como áreas marginais. Nessas áreas, tem-se a interrupção do ciclo do carrapato durante o inverno, o que pode provocar a condição de baixo "desafio imunológico" com os agentes da TPB nos bezerros antes dos nove meses idade e assim ocorrer a situação em que menos de 75% dos animais nessa faixa etária sejam infectados e, por consequência, deixariam de ser naturalmente protegidos imunologicamente. Com isso, pelo baixo número de animais protegidos nessa área há o alto risco de ocorrência de surtos da doença. (Mahoney e Ross, 1972 e Santos *et al.*, 2019). Já Riet-correa *et al.*, (2001 apud FAO, 1984) cita que uma região é considerada de instabilidade enzoótica, quando o percentual de animais sorologicamente positivos para *Babesia* spp. for de 15%-80%. Áreas como a região seca de Sergipe, região seca da Paraíba, no centro-sul do Paraná e extremo sul do Rio Grande do Sul, são regiões de instabilidade enzoótica (Bahia *et al.*, 2020).

Quanto a última situação, trata-se da **estabilidade enzoótica**, que são áreas situadas dentro dos paralelos 32°N e 32°S, mas fora das zonas marginais. Nesta condição, espera-se que normalmente mais de 75% dos bezerros até a idade de nove meses sejam expostos aos agentes da TPB e adquirido boa proteção imune. O risco de surtos nessas áreas é mínimo e se encontra nela a maior parte do território brasileiro (Santos *et al.*, 2019).

Portanto, essa classificação basea-se no princípio de que para o animal se tornar imune sem adoecer clinicamente, é necessário que ele tenha contato com o carrapato numa taxa de infestação de 10 a 40 teleóginas por animal/dia antes dos nove meses de idade (Mahoney e Ross, 1972). Nesses animais, após curto período de parasitemia, eles se recuperam naturalmente, mas ao que parece, a infecção persiste por longo tempo de modo brando sem causar a doença clínica e ao mesmo tempo sendo suficiente para estimular o sistema imune evitando assim o surgimento da doença clínica. A questão dos vetores nas áreas epidemiológicas está relacionado à quantidade de carrapatos ao longo do tempo, em que nas áreas de estabilidade enzoótica, a quantidade de carrapatos é mais ou menos constante o suficiente para imunizar boa parte dos animais, enquanto nas áreas de instabilidade, o número de carrapatos é irregular e muitos animais se infectam tardiamente podendo a infecção ser letal (Mahoney, 1969 e Moreira, 2013).

Deve-se ressaltar que essas situações epidemiológicas não são absolutas, sendo que há inúmeras circunstâncias que podem alterar o cenário epidemiológico de uma área. Por exemplo, o controle excessivo do carrapato por diversas formas como pelo uso intenso de carrapaticidas, manejo de pastagens, densidade animal e dos vetores, estabulamento de animais e entre outros manejos, podem gerar baixo desafio dos animais contra os agentes da TPB e assim gerar a instabilidade enzoótica. De modo semelhante, podem ocorrer situações de instabilidade no sertão nordestino devido a seca prolongada que interrompe o ciclo do carrapato e a transmissão dos agentes da TPB, o que deixa os animais susceptíveis a doença. O descontrole do carrapato permitindo o excesso de infestação nos animais bem como o alto desafio dos agentes da TPB, pode provocar surtos da doença em área considerada estável (Santos *et al.*, 2019). Pontua-se também que, de modo geral, mesmo que os bezerros sejam considerados mais resistentes às infecções, porém onde a endemia é estável, casos clínicos são observados primordialmente nestes animais (Oliveira *et al.*, 2014). A ocorrência de casos clínicos nos bezerros pode ser explicada, em parte, pela queda na imunidade passiva a partir

do 28º dia após o nascimento, quando os anticorpos colostrais começam a ser substituídos por aqueles produzidos pelo próprio animal (Madruga *et al.*, 1984).

Além das condições epidemiológicas não serem absolutas, atualmente, há o questionamento dessa classificação proposta por Mahoney. Jonsson *et al.* (2012) afirmaram que não é adequado predizer sobre a probabilidade de estabilidade endêmica em estudos sorológicos com única avaliação transversal. A classificação ainda não se aplicaria em situações em que há sistemas sem dados específicos de doença clínica, genótipo dos hospedeiros, espécies de patógenos e carrapatos, tendo em vista a grande variação na patogenicidade. Os dados do estudo de Mahoney eram específicos para *R. microplus* infectados por *B. bovis* e *B. bigemina*, infestando bovinos *Bos taurus* e mestiços, no estado de Queensland, Austrália. Ou seja, o conceito pode não ser válido para raças não contempladas no trabalho e para outras localidades. Também, o estudo base pode não ser aplicado em infecções por diversos patógenos, como *A. marginale* cujas contribuições relativas da imunidade inata, imunidade passiva e dinâmica da infecção para ocorrência da doença não são tão claras, ou para doenças cuja a imunidade inata domina a imunidade adquirida. Ainda, Jonsson *et al.* (2012) acrescentaram que havia baixa sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos à época do trabalho de Mahoney, o que impactaria nos resultados. Essa desconfiança quanto às classificações é ainda corroborada por resultados como de Vespasiano (2016), que, no seu estudo, encontrou mais de 75% dos animais aos nove meses de idade soropositivo para os três agentes da TPB, o que classifica a propriedade como estável e mesmo assim havia alta frequência de animais susceptíveis com grande incidência de quadros clínicos da doença em bezerros jovens. Portanto, essa classificação vigente de área instável e estável deve ser usada com ponderações, pois em muitos casos somente a frequência de animais soropositivos não é o suficiente para determinar o *status* epidemiológico da propriedade.

### **3.3.1 Importância do estudo epidemiológico da TPB**

Estudos epidemiológicos da TPB podem auxiliar no planejamento de medidas de controle e nas estratégias de monitoramento da doença (Vespasiano, 2016). Por exemplo, segundo Silvina Wilkowsky do Centro de Investigação em Ciências Veterinárias e Agrária

(INTA) - Argentina, onde tem-se delimitadas as zonas chamadas "de lucha" cujos produtores devem controlar de modo obrigatório os carrapatos em suas propriedades para mantê-los em quantidades baixas e assim atingir o objetivo de impedir o desenvolvimento do vetor em direção a áreas livres (Farber, 2016). Também esse tipo de estudo é ferramenta essencial para indicar a possibilidade de ocorrência de surtos da doença ou não em uma determinada região. Identificando uma área instável, por exemplo, considera-se adotar medidas de controle como a adoção de manejo adequado, controle de vetores, vacinação, critério no transporte de animais e entre outros. Isso porque, considera-se que nessas áreas, a TPB pode causar muitos prejuízos devido aos surtos da doença que promove alta taxa de casos clínicos e mortalidade (Santos *et al.*, 2017). A identificação de animais portadores dos parasitos da babesiose está associado ao risco de introdução da doença através da importação de animais assintomáticos, o que tem impacto negativo no comércio internacional de gado (Alvarez., et al 2019).

Além disso, devido ao fator diversidade climática que muito impacta a situação epidemiológica da doença em uma região, em países como o Brasil que possui esse aspecto, se faz necessário ampliar o conhecimento nas variadas áreas geográficas do país. Em regiões semiáridas do Nordeste, por exemplo, há escassez de estudos epidemiológicos sobre a TPB (Santos *et al.*, 2017). Além disso, no estudo da anaplasnose, por exemplo, cada propriedade representa uma unidade epidemiológica na qual o ambiente e os fatores imunológicos interagem e podem influenciar o estado endêmico do patógeno (Silva e Fonseca 2013). Na mesma linha, o estudo epidemiológico da doença aumenta sua importância no atual momento da pecuária brasileira, em que a intensificação acentuada dos sistemas produtivos seja ele, de carne ou de leite, que vêm ocorrendo nas duas últimas décadas, podem contribuir para alterações nos padrões da TPB, necessitando de pesquisas para esclarecer a dinâmica da doença (Vespasiano, 2016).

Portanto, estudos epidemiológicos da TPB em que se utiliza, por exemplo, dados de prevalência ou incidência são importantes para entender a dinâmica da infecção e da doença, identificar quais são os agentes predominantes, os fatores de risco e seu peso em cada unidade epidemiológica e assim essas informações podem servir de base para proposição de medidas de controle, estratégias de monitoramento, gestão de risco e prevenção de surtos.

Há inúmeros trabalhos no Brasil que através de técnicas sorológicas ou moleculares abordaram a prevalência da TPB em determinadas regiões do país e o Quadro 1 exemplifica isso. Junior, (2006) e Silva *et al.* (2014), por meio da sorologia, verificaram instabilidade enzootica para *A. marginale* no Pará. Já no estado do Pernambuco e da Paraíba foi encontrado instabilidade para os três agentes da TPB (Santos *et al.*, 2017 Costa, *et al.*, 2018). Em Santa Catarina, por meio do PCR, confirma-se a instabilidade para TPB, exceto um dos trabalhos que apontou ligeiro aumento de *A. marginale* (Vieira, 2014, Canever *et al.*, 2014 e Casa, 2017). Em Minas Gerais, pela técnica sorológica, Vespasiano (2016) encontrou estabilidade para TPB, apesar de relatar ocorrência de casos clínicos da doença em animais jovens. Pela técnica molecular foi encontrado instabilidade para os patógenos (Vespasiano, 2016 e Bahia *et al.*, 2020). Em São Paulo, por meio da técnica de PCR, foi verificado estabilidade para *Babesia sp.* em gado de corte Angus (Oliveira *et al.*, 2014 e Gigliote, 2016)

Quadro 1: Prevalência da TPB no Brasil segundo diversos estudos publicados entre 2006 e 2020.

Fonte	Técnica diagnóstica	Localidade	Grupo animal	<i>A. marginale</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>
Junior, (2006)	Elisa	Pará-Brasil	246 amostras de fêmeas adultas nelore e mestiças p/ leite	66,2%	98,5%	95,4%
Souza <i>et al.</i> , (2013)	RIFI nPCR	Piauí-Brasil	202 amostras de bovinos girolando >1 ano	89,1% 76,2%	52,5% 52%	68,8% 33,2%
Oliveira <i>et al.</i> , (2014)	qPCR	São Paulo - Brasil	150 amostras - entre bezerros e vacas - Nelore x angus	-	100%	98%
Silva <i>et al.</i> , (2014)	iElisa	Pará- Brasil	679 bovinos Nelore a pasto	74,2%	97,3	97,3
Canever <i>et al.</i> , (2014)	PCR Multiplex	Santa Catarina - Brasil	33 amostras - 8 meses a 4 anos - Limousin e Charolês	60,6%	63,6%	18%
Vieira (2014)	multiplex PCR	Santa Catarina - Brasil	257 amostras de bovinos entre 3 meses e 11 anos	27,24%	16,3%	29,57%

Giglioti <i>et al.</i> , (2016)	qPCR	São Paulo - Brasil	51 amostras de Angus machos de 2 anos aprox.	-	98%	100%
Vespasiano (2016)	RIFI (1:40) nPCR	Minas Gerais - Brasil	244 fêmeas Holandesas - Bezerros a adultos	83,33%, 48%	83,33% 32%	93,33% 32%
Santos <i>et al.</i> , (2017)	RIFI (1:40)	Pernambuco - Brasil	861 amostras de nelore, girolando e outros mestiços >6m	40,25%	37,25%	43,6%
Casa, (2017)	PCR	Santa Catarina - Brasil	311 amostras - raça de corte Criola Lageana	79,91%	59,81%	72,02%
Costa, <i>et al.</i> , (2018)	PCR	Paraíba - Brasil	41 bezerros de 30 dias a 1 ano	61%	17,1%	7,3%
Bahia <i>et al.</i> , (2020)	PCR	Minas Gerais - Brasil	300 bezerros entre 10 a 300 dias de idade	55,66%	15,33%	4,0%

### 3.4 Transmissão vertical dos agentes da TPB

A transmissão vertical dos patógenos ocorre da mãe contaminada para o feto, que se infecta ainda no útero. Tanto a importância epidemiológica, quanto o mecanismo da transmissão vertical da *A. marginale* são controversos. Kuttler (1984) afirmou não haver transmissão vertical de anaplasma. Porém, posteriormente, com o avançar dos métodos de diagnóstico, há inúmeros trabalhos que relatam essa transmissão. E isso pode ocorrer em vacas sob condições de inoculação constante em áreas endêmicas ou quando a vaca gestante apresenta a doença aguda (Potgieter e Van Rensburg 1987 e Ribeiro *et al.*, 1995). A exemplo, Potgieter e Van Rensburg Van (1987) encontraram 15,6% de transmissão vertical. Em gado de corte em área endêmica Grau *et al.*, (2013) encontrou uma taxa de transmissão vertical de 10,5%. Meneses (2013), em gado de leite em MG, encontrou a taxa de 10% dessa transmissão. Brito *et al.*( 2019) encontrou a taxa de 68,75% dessa transmissão no norte do Brasil em gado mestiço. Com isso, conclui-se que a transmissão vertical pode ter um papel importante na transmissão e na epidemiologia da doença (Maldonado *et al.*, 2012).

No caso da transmissão vertical de *Babesia* spp., segundo Neitz (1956), a transmissão intrauterina de *B. bigemina* foi registrada em bezerros em 1936 por Zolotareff e Roux e por *B. bovis* foi relatada em fetos por Yakimoff (1936) e em bezerros por Waintraub (1938). No caso desses dois patógenos, muitas vezes, essa via de transmissão é ainda considerada sem relevância para propagação e manutenção da doença em um rebanho, porém ela pode estar sendo subestimada e ter sim importância epidemiológica (Ribeiro *et al.*, 1995, Kessler e Schenk, 1998 e Costa *et al.*, 2016). A exemplo, Costa *et al.* (2016) encontraram taxa de infecção congênita de 6,6% para *B. bovis* e 3,3% para *B. bigemina* em área de estabilidade enzoótica no nordeste brasileiro. Brito *et al.* (2019), em Rondônia-RO, encontraram a taxa de 81% de transmissão vertical de *B. bovis* baseado na positividade ao PCR de bezerros de um dia de vida.

Com relação ao momento que a vaca gestante transmite os parasitos, a maioria dos trabalhos com *A. marginale* mostraram que bezerros positivos a técnicas moleculares ou sorológica pré-colostral vieram de vacas naturalmente infectadas (Potgieter e Van Rensburg, 1987; Maldonado *et al.*, 2012; Meneses, 2013; Silva *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2016). Grau, (2013) afirmou que vacas cronicamente, infectadas sem histórico de anaplasmoze aguda, infectam seus descendentes via transplacentária. Na fase aguda da doença, em trabalho experimental, essa via de transmissão ocorreu e o contágio fetal se deu no segundo e terceiro trimestre de gestação. Porém, um estudo recente mostrou que a transmissão de *A. marginale* pode ocorrer em qualquer fase de gestação com tendência a acontecer nos três últimos meses de gestação e *B. bigemina* no terço final a médio (Andrade, 2021).

Fatores que aumentam o desafio dos fetos frente aos patógenos bem como a reinfeção constante de vacas gestantes são importantes no processo de infecção fetal (Costa *et al.* 2016). A imunossupressão transitória que ocorre em vacas no periparto é a razão de infecções subclínicas e possivelmente a causa do aumento da transmissão vertical (Silva *et al.*, 2014). Sabe-se que a imunossupressão materna pode ocorrer, principalmente, nas últimas semanas de gestação e no parto por questões hormonais e metabólicas desse período que faz o animal apresentar um balanço energético negativo e consequente mobilização de reservas corporais. Isso por consequência, aumenta os níveis sanguíneos dos ácidos graxo não esterificados (AGNE) e de corpos cetônicos no organismo do animal que são prejudiciais ao sistema imune com redução da atividade leucocitária e da explosão oxidativa de neutrófilos (Sartorelli *et al.*,

1999, LeBlanc, 2010 e Ster et al., 2012). Além da imunossupressão da vaca gestante, outros fatores podem estar relacionados a transmissão vertical como o aumento da permeabilidade vascular do útero e feto. Nos últimos meses de gestação, há mudanças na conformação anatômica da placenta, aumento exponencial do tamanho fetal que como consequência, eleva o nível de exigência de nutrientes e aumento da eritrofagocitose fetal (Bell, 1995, Pereira *et al.*, 2010 e Andrade 2021).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **I - ATIVIDADE DE CAMPO**

#### **4.1. Considerações éticas**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFMG sob número de protocolo 255/2021 (Anexo 1) e com validade até 23/01/2027.

#### **4.2. Local e período de atividades**

A coleta de material foi realizada no mês de Janeiro em uma fazenda especializada em atividade de gado de corte intensiva, localizado no município de São João da Ponte, no estado de Minas Gerais. O município se situa há 535 km da capital do estado e encontra-se na latitude 15° 55' 44" sul e a uma longitude 44° 0' 28" oeste. O bioma da região é de predomínio caatinga e cerrado e o clima da região é caracterizado como tropical com estação seca. A estação com precipitação é quente, abafada e de céu encoberto; a estação seca é morna e de céu quase sem nuvens. Ao longo do ano, em geral a temperatura varia de 14 °C a 31 °C e raramente é inferior a 12 °C ou superior a 36 °C.

A propriedade possui histórico de casos de anaplasmosose em animais adultos na terminação e casos de babesiose em novilhas jovens recém chegadas a fazenda.

### **4.3. Grupo de animais**

O rebanho era composto por mais de 30 mil animais de predominância racial 3/4 Aberdeen Angus 1/4 Nelore e outros 1/2 Aberdeen Angus 1/2 Nelore. Independente da categoria, todos os animais ficavam em regime de confinamento recebendo dieta total no cocho, conforme National Research Council (NRC), sem acesso a pastagens. Na propriedade, era utilizado o ciclo produtivo completo. Para isso, a fazenda adquiria novilhas F1 (1/2 Angus 1/2 nelore) de aproximadamente 7 a 9 meses de idade, oriundas de vários produtores e estados do país como Pará, Mato Grosso, entre outros.

No presente trabalho esses animais adquiridos por compra oriundos de várias localidades do país foram categorizadas como "Animais de Chegada" (CH) e ao desembarcarem na fazenda passaram pelo brete de contenção e foram inspecionados quanto ao seu estado geral, pesados, identificados por meio de brincos e foi administrado um protocolo sanitário que inclui vermífugação injetável a base de ivermectina com agulhas não descartáveis e carrapaticida pour-on a base de Fipronil. Após isso, eles foram separados em lotes por volta 50 animais e colocados em sequência de piquetes de aproximadamente 75x50 metros de terra batida com sombreamento por sombrites, água e dieta total no cocho.

Quando aptas, as novilhas eram submetidas ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e após 40 dias era realizado o primeiro diagnóstico de gestação por meio da ultrassonografia. Por volta de 200 dias de gestação, havia um manejo de confirmação de prenhez por ultrassonografia e aplicação de vacinas contra salmonelose e diarreia por rotavírus e coronavírus. Pelo critério desse manejo com essas fêmeas, aquelas que permaneceram positivas foram categorizadas no trabalho de "Animais diagnóstico de Gestação" (DG). Então, a partir da chegada e prenhez das novilhas de compra e posterior cria, recria e engorda do produto, a fazenda fazia todo o ciclo de produção. Também havia a aquisição de machos na faixa etária de 07 - 09 meses que iam para a engorda e terminação.

Faltando 30 dias para parir, as novilhas gestantes eram direcionadas para os piquetes maternidade que possuem sombreamento natural feito por fileiras de eucaliptos. Os piquetes eram seguidos uns dos outros e diariamente equipes de monitoramento a cavalo passavam neles para inspecionar os animais, acompanhar o parto e intervir se necessário, além de comunicar aos veterinários intercorrências que requeriam intervenção desses profissionais. Após o parto, o recém-nascido, no primeiro dia de vida, era pesado, tinha o umbigo curado com tintura de iodo 10% e recebia vacina intra-nasal para prevenir pneumonia e ivermectina (1ml/50kg) via subcutânea. No presente estudo esses bezerros foram categorizados como "Recém-nascidos" (RN). A cria permanecia nesse confinamento-maternidade junto a mãe por 30 dias recebendo aleitamento natural *ad libitum*, água e sombra a disposição. Depois desse período, mãe e cria eram transferidos para outro confinamento com as mesmas características de alimentação e permaneciam neles por mais 60 dias, ou seja, até a desmama do bezerro aos 90 dias. Para desmama, faziam-se lotes de animais e os passava no brete de contenção para pesagem, colocação de novo brinco e aplicação de protocolo sanitário que incluía vermifugação a base de ivermectina e vacinações contra raiva, clostridioses e doenças respiratórias. Os bezerros desmamados foram incluídos no trabalho na categoria "Bezerros Desmamados" (BD) e independente do sexo iam para recria e engorda. As mães após a desmama passavam por um período de dois a três meses na terminação antes de irem para o abate. Além dessas, haviam outros animais que no trabalho formam a categoria "Terminação" (TR) e eram aqueles bovinos machos provenientes de compra de idade entre aos sete e nove meses e as novilhas que não se conseguia emprenhar. Esses de animais são considerados vindos de modo externo a fazenda, pois além desses, no grupo TR também havia em sua composição os machos e fêmeas nascidos na própria fazenda (internos). Esses animais que compunham a categoria TR possuíam a idade de aproximadamente 22 a 26 meses.

De modo geral, os animais eram separados em piquetes de terra batida aproximadamente 75x50 metros. Como a fazenda era extensa, muitas vezes, as categorias ficavam separadas umas das outras, geograficamente, por volta de três a dez quilômetros, por plantações de milho com pivôs centrais ou pastagens.

Para o experimento, foram utilizados entre 93 e 132 animais de cada categoria totalizando 597 amostras e divididos em grupos conforme Tabela 1 e mostrado na Figura 3. O cálculo amostral foi estipulado baseando-se na prevalência esperada de animais positivos a

sorologia para TPB ser de mais 90% no caso das novilhas de compra e gestantes e de menos de 10% nas categorias que não possuem contato direto com os vetores da doença, como o grupo recém-nascidos, bezerros da desmama e terminação. Além disso, para análise molecular dos recém-nascidos, considerou-se a prevalência de 10% para bezerros nascidos positivos ao PCR para *A. marginale*. A partir desses dados e considerando a margem de erro de 5%, o nível de confiança de 95% em uma população de 3.000 animais em cada grupo, o tamanho da amostra foi calculada através da ferramenta de calculo amostral para determinar a proporção de uma população (Epidemiological studies > To estimate a single proportion) do site da Epitools (<https://epitools.ausvet.com.au/oneproportion>).

Tabela 1: Grupos de experimentação, categoria, número e idade média dos animais.

<b>Grupo</b>	<b>Categoria/Sigla</b>	<b>Nºanimais</b>	<b>Idade</b>
<b>1</b>	Novilhas de compra (CH)	124	07-09 meses
<b>2</b>	Novilhas gestantes de 200 dias (DG)	123	18-20 meses
<b>3</b>	Bezerros recém-nascidos (RN)	125	01 dia
<b>4</b>	Bezerros desmamados (BD)	132	03 meses
<b>5</b>	Bovinos de terminação (TR)	93	24-26 meses



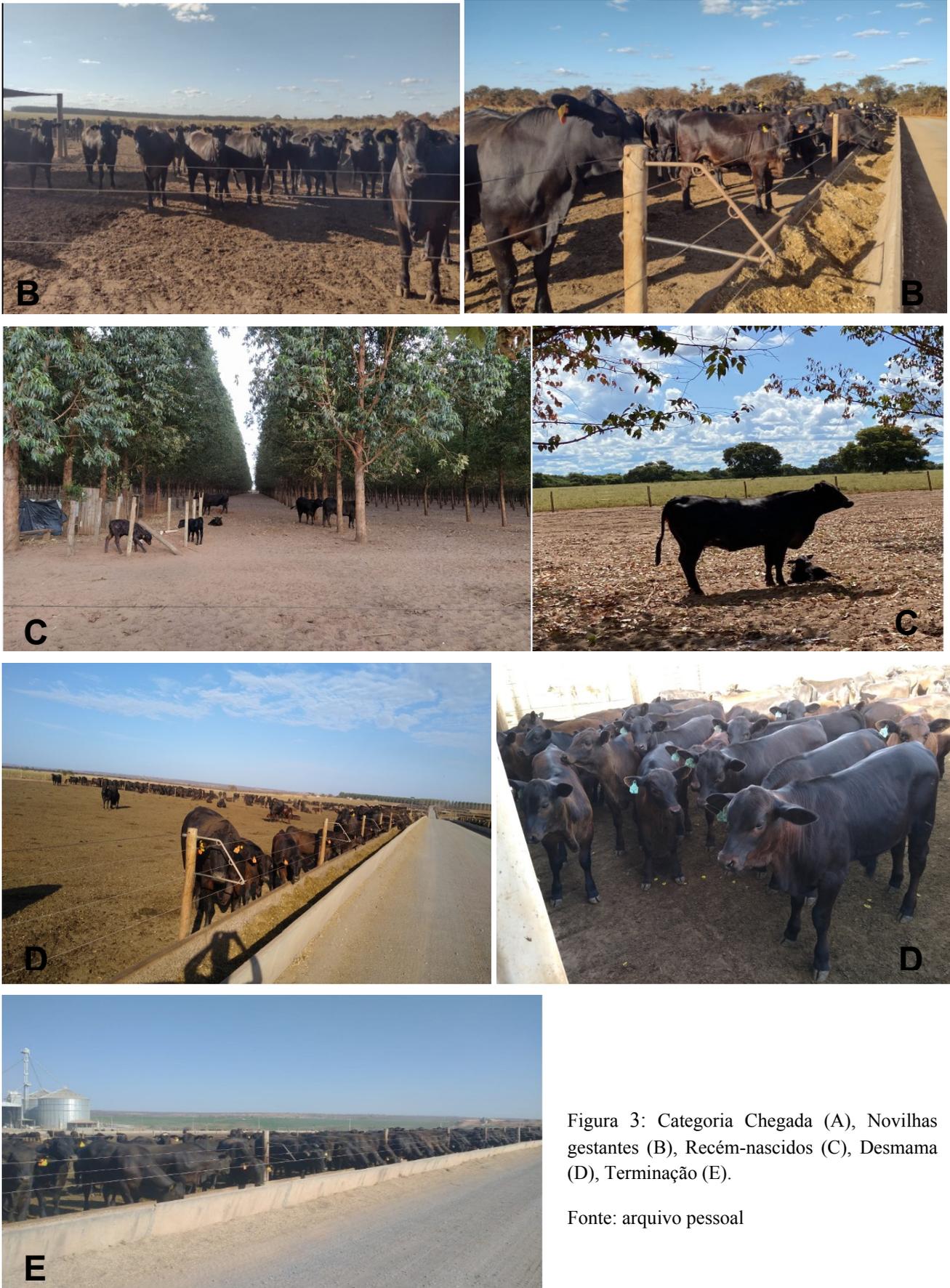


Figura 3: Categoria Chegada (A), Novilhas gestantes (B), Recém-nascidos (C), Desmama (D), Terminação (E).

Fonte: arquivo pessoal

#### 4.4 Coleta de sangue

De todos os animais, coletou-se, aproximadamente, 07 mL de sangue venoso da veia coccígea ou da jugular que foram colocados em dois tubos, sendo um com anticoagulante (EDTA) e outro com ativador de coágulo. A partir da lancetagem da ponta da cauda, confeccionaram-se esfregaços sanguíneos em lâminas histológicas de vidro.

O hematócrito foi determinado no laboratório da fazenda através da técnica do microhematócrito (Schalm, 1975).

A análise da proteína sérica total foi realizada na própria fazenda somente nos bezerros recém-nascidos e foi determinada colocando-se duas gotas de soro no refratômetro clínico Modelo RHC-200 (GeneralMed®) e avaliado o valor da escala de proteína total.

#### 4.5 Análises laboratoriais

As análises laboratoriais foram realizadas no próprio laboratório da fazenda (hematócrito), na Clínica de Ruminantes (leitura de esfregaços sanguíneos) e no Laboratório de Protozoologia Veterinária (RIFI e *n*PCR), ambos pertencentes à Escola de Veterinária da UFMG. Aliquotas de sangue total foram utilizadas para determinar o hematócrito e cerca de 02 ml foram separados em quatro alíquotas e armazenadas em microtubos e congeladas a -20°C para posterior extração do DNA e realização de PCR para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*. As amostras sem anticoagulantes foram centrifugadas a 1500g por 10 minutos para a obtenção do plasma, o qual também foi aliquotado e armazenado em quatro microtubos tipo eppendorfs para posterior detecção de anticorpos IgG específicos para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

### 4.5.1 Esfregaço sanguíneo

Os esfregaços sanguíneos foram corados com kit Panótico Rápido ® Laborclin seguindo as recomendações do fabricante. Após a secagem, as lâminas foram levadas ao microscópico óptico (Nikon® E200MV) em imersão e aumento de 100x. No caso de *A. marginale*, a quantificação da riquetsemia foi feita através da contagem de eritrócitos infectados na observação de 40 campos com celularidade homogênea. Também se estimou a quantidade de eritrócitos infectados ou não por campo representativo da lâmina e multiplicado por 40 para obter o número total de hemácias observadas. Com isso, o resultado da contagem de células infectadas dividido pelo valor estimado de eritrócitos presentes nos campos obteve-se a riquetsemia de *A. marginale*. No caso da babesiose, a identificação de uma hemácia infectada já considerou-se o animal positivo para a doença.

### 4.5.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A pesquisa por IgG Anti-*A. marginale*, Anti-*B. bigemina* e Anti-*B. bovis* foi realizada em todos os grupos utilizando o plasma e seguindo o protocolo laboratorial conforme Silveira (2012). Os antígenos utilizados foram produzidos no Laboratório de Protozoologia Veterinária através da técnica descrita por IICA (1987) em que se usa lâminas de esfregaço sanguíneo bovino espesso infectados por *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*. Foram utilizados como controle positivos amostras sabidamente reativas para os agentes e como controle negativo PBS 1X.

Os plasmas foram diluídos em PBS 1X na proporção 1:40. Após isso, colocou-se 2 µL de plasma diluído em cada poço da lâmina bem como os controle positivo e negativo. As amostras foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e depois lavadas duas vezes por 3 minutos com PBS 1X e uma vez com água destilada, também por 3 minutos e secas a temperatura ambiente. Depois de seca adicionou-se em cada poço o conjugado Anti-IgG e IgM bovino contendo o isotiocianato de fluoresceína (Sigma Aldrich®), diluído a 1:150 em azul de Evans. Novamente foram incubadas a 37°C por 30 minutos e lavadas como da primeira vez. Após a secagem das lâminas a temperatura ambiente, adicionou-se glicerina

alcalina sobre elas e cobriu-se com lamínula para assim serem levadas ao microscópio de epifluoresceína (Olympus® IX70-FLA), em aumento de 20X e 40X. O controle positivo foi feito a partir de animais sabidamente positivos para cada antígeno e o controle negativo foi usado somente o PBS1x.

### 4.5.3 Análise molecular

Com o objetivo de identificar DNA dos agentes da TPB nas amostras dos bezerros de 01 dia de idade (grupo RN), as 125 amostras de sangue total desse grupo foram submetidas a à extração de DNA seguidas de PCR.

Para extrair o DNA das amostras de sangue total foi utilizado o Kit de Purificação de DNA Genômico da Wizard® (Promega), seguindo as instruções do fabricante para 300 µL de sangue total. Após o procedimento, as amostras foram identificadas e congeladas a -20°C para posterior amplificação do DNA.

O termociclador automático (Bio-Rad T100® Thermal Cycler) foi utilizado para amplificar o DNA extraído e os iniciadores, os produtos e os programas utilizados em cada reação encontram-se descritos nos itens a seguir para cada agente.

A técnica utilizada para amplificar o DNA de *A. marginale* teve como alvo o gene *msp4* de *A. marginale* convencionada por de la Fuente *et al.*, (2008) e nested PCR (nPCR) com intuito de aumentar a sensibilidade foi de acordo com (Silveira, 2012). Os reagentes para nPCR se encontram na tabela 2, os iniciadores da reação e o produto obtido bem como o programa utilizado estão descritos na tabela 3 e 4 respectivamente.

Tabela 2: Reagentes para PCR de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* (*msp4*).

Reagente	Volume (µL)
GoTaq® Green Master Mix (promega)	5,0
Água Milli-Q	3,6
Mix primer (F+R) (10 mM)	0,4
DNA	1,0
Volume final	10

Tabela 3: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de *A. marginale*.

Reação	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
<b>1ª reação</b>	GGGAGCTCCTATGAATTACAGAG AATTGTTTACCCGGATCCTTAGC TGAACAGGAATCTTGC	MSP45 MSP43	<i>msp4</i>	872	de la Fuente <i>et al.</i> (2008)
<b>2ª reação</b>	CGCCAGCAAACCTTTTCCAAAATA TGGGGACACAGGCAAAT	AnapF AnapR	<i>msp4</i>	294	Silveira <i>et al.</i> (2012)

Tabela 4: Programa utilizado para realização do *n*PCR para amplificação de *A. marginale*.

Ciclo	Etapa	Temperatura (C°)	Duração
<b>1 (1x)</b>	Desnaturação inicial	94	5 minutos
<b>2 (29x)</b>	Desnaturação	92	1 minuto
	Anelamento	59	1 minuto
	Extensão	72	1 minuto
<b>3 (1x)</b>	Extensão final	72	8 minutos
	"Hold"	4	--

Para amplificar o DNA de *B. bigemina* utilizou-se a técnica padronizada por Romero-Salas *et al.*, (2016). Os reagentes para *n*PCR, os iniciadores da reação e o produto obtido bem como o programa utilizado estão descritos na Tabela 2, 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5: Sequência de iniciadores e produto obtido para diagnóstico de *B. bigemina*.

Reação	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Produto (pb)	Referência
1ª reação	TCCAACACCAAATCCTCCTA	BoF BoR	260	Romero-Salas et al., (2016)
2ª reação	AAGAGATACCATATCAGGGAACC ATTGGGCACTTCGTTATTTC	BoFN BoRN	195	

Tabela 6: Programa utilizado para realização do nPCR para amplificação de *B. bigemina*

Ciclo	Etapa	Temperatura (C°)	Duração
1 (1x)	Desnaturação	95	3 minutos
2 (29x)	Desnaturação	95	30 segundos
	Anelamento	62	1 minuto
	Extensão	72	30 segundos
3 (1x)	Extensão final	72	7 minutos
	"Hold"	4	--

Para *B. bovis* utilizou-se a técnica de nPCR padronizada por (Romero-Salas et al., 2016). Os reagentes para nPCR, os iniciadores da reação e o produto obtido bem como o programa utilizado estão descritos na Tabela 2, 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de *B. bovis*.

Reação	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Produto (pb)	Referência
1ª reação	TGAACAAAGCAGGTATCATAGG CCAAGGAGATTGTGATAATTCA	BoF BoR	260	Romero-Salas et al., (2016)
2ª reação	TCCACGATCTGTGATACGTCA CAAATCCTTTGCAAACCTCCAA	BoFN BoRN	195	

Tabela 8: Programa utilizado para realização do *n*PCR para amplificação de *B. bovis*.

<b>Ciclo</b>	<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (C°)</b>	<b>Duração</b>
<b>1 (1x)</b>	Desnaturação	95	3 minutos
<b>2 (29x)</b>	Desnaturação	95	30 segundos
	Anelamento	62	1 minuto
	Extensão	72	30 segundos
<b>3 (1x)</b>	Extensão final	72	7 minutos
	"Hold"	4	--

Para a realização da eletroforese, inicialmente o revelador "gel red" (Biotium®) foi diluído em água destilada na proporção de 1:400. Foi aplicado em cada poço no gel de agarose a 1,8% em meio tampão (TAE 0,5X) uma mistura de 5 µL do produto da amplificação com 1 µL de "gel red". Foi utilizado 1 Kb Ladder Plus (Fermentas®) como padrão de peso molecular. Os produtos correram no gel sob o potencial elétrico de 110 volts por 25 minutos e observados posteriormente no foto documentador transluminador L-PIX (Loccus biotecnologia®).

#### **4.6 Análises estatísticas**

Os resultados do esfregaço sanguíneo foram analisados pelo teste de Qui-Quadrado de Pearson e o esfregaço sanguíneo em conjunto com PCR foram avaliados pelo teste de confiabilidade. Os resultados da RIFI foram avaliados a partir do teste de proporção no *software* estatístico R versão 3.2.2. Para variável hematócrito (%) por não seguir o padrão de normalidade, usou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e depois fez-se o Teste de múltipla comparação entre os grupos. Para essas três análises o programa utilizado foi o Stata versão MP16.0. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Esfregaço sanguíneo – Diagnóstico etiológico

Na leitura do esfregaço sanguíneo, todos os grupos de animais apresentaram alguma amostra positiva para *A. marginale*, enquanto em nenhuma categoria foram encontradas formas evolutivas sugestivas de *B. bigemina* e para *B. bovis*. (Tabela 9).

A categoria Animais de Chegada (CH) apresentou 3/124 animais positivos para *A. marginale* (2,41%) e nenhum para *Babesia spp.* Na categoria DG, 12/123 das novilhas de 200 dias de gestação apresentaram-se positividade *A. marginale* (9,75%). Na categoria Recém-Nascidos (RN) encontrou-se 5/125 bezerros positivos para *A. marginale* (4,0%) e nenhum para *Babesia spp.* Na categoria Bezerros Desmama (BD), 6,81% (9/132) dos animais testaram positivo para *A. marginale* e nenhum para *Babesia spp.* No grupo animais de Terminação (TR), verificou-se positividade de três animais para *A. marginale* (3,22%) e nenhum para *Babesia sp.*

Tabela 9: Percentagem (%) de animais positivos no esfregaço sanguíneo para os agentes da TPB em diferentes categorias de bovinos de corte em um sistema de confinamento.

<b>Esfregaço (%)</b>	<b>CH</b>	<b>DG</b>	<b>RN</b>	<b>BD</b>	<b>TR</b>
<i>A. marginale</i>	2,41 <sup>a</sup>	9,75 <sup>a</sup>	4,0 <sup>a</sup>	6,81 <sup>a</sup>	3,22 <sup>a</sup>
<i>B. bovis</i>	0	0	0	0	0
<i>B. bigemina</i>	0	0	0	0	0

Porcentagem com letras iguais indicam que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos no teste de Qui-quadrado. CH = chegada; DG = Diagnóstico de Gestação; RN = Recém Nascidos; BD = Bezerros Desmama; TR = Terminação.

## 5.2. Hematócrito

Os valores da mediana do hematócrito apresentaram diferenças entre grupos ( $p < 0,05$ ), variando entre 31% e 40% (Tabela 10). Discreta redução do hematócrito ocorreu entre a categoria DG e as categorias BD e TR.

Na categoria RN em relação aos demais grupos houve diferença relevante tanto no valor da mediana quanto na frequência dos animais com hematócrito menor que de 24%, sendo que animais RN apresentaram valores abaixo. Do total dos bezerros RN, 20,16% apresentaram valores de hematócrito abaixo de 24%, que é o limite fisiológico de acordo com Jain (1986), caracterizando assim anemia.

Tabela 10: Mediana do hematócrito e percentual de animais com hematócrito menor que 24% em diferentes categorias de bovinos de corte em confinamento.

<b>Categoria</b>	<b>CH</b>	<b>DG</b>	<b>RN</b>	<b>BD</b>	<b>TR</b>
Mediana do hematócrito (%)	39,0 <sup>bc</sup>	38,0 <sup>c</sup>	31,0 <sup>d</sup>	39,0 <sup>ab</sup>	40,0 <sup>a</sup>
Frequência de animais com hematócrito <24% (%)	3,36	0,0	20,16*	0	2,19

Porcentagem com letras diferentes na linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos no teste de múltiplas comparações. \* $p < 0,05$  = diferença significativa no teste Qui-quadrado de Pearson.

CH = chegada; DG = Diagnóstico de Gestação; RN = Recém Nascidos; BD = Bezerros Desmama; TR = Terminação

## 5.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A Tabela 11 e o Gráfico 1 mostram a frequência de soropositividade dos diferentes grupos de animais aos agentes da TPB. Na categoria Chegada (CH) houve a soropositividade de 98,3% para *A. marginale*, 95,8% para *B. bovis* e 76,8% para *B. bigemina*. Na categoria Diagnóstico de Gestação (DG), a frequência de positivos foram 80,1% para *A. marginale*, 91,7% *B. bovis* e 70,2% para *B. bigemina*. Nos recém-nascidos (RN) a frequência encontrada foi 64%, 80% e 80,8% para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Na

categoria Desmama (DM) encontrou-se positividade de 27,5%, 28% e 64,8% para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. E por último, a categoria Terminação (TR) apresentou positividade de 86,9% 79,3% e 64,1% de positividade para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Todos os grupos apresentaram animais positivos.

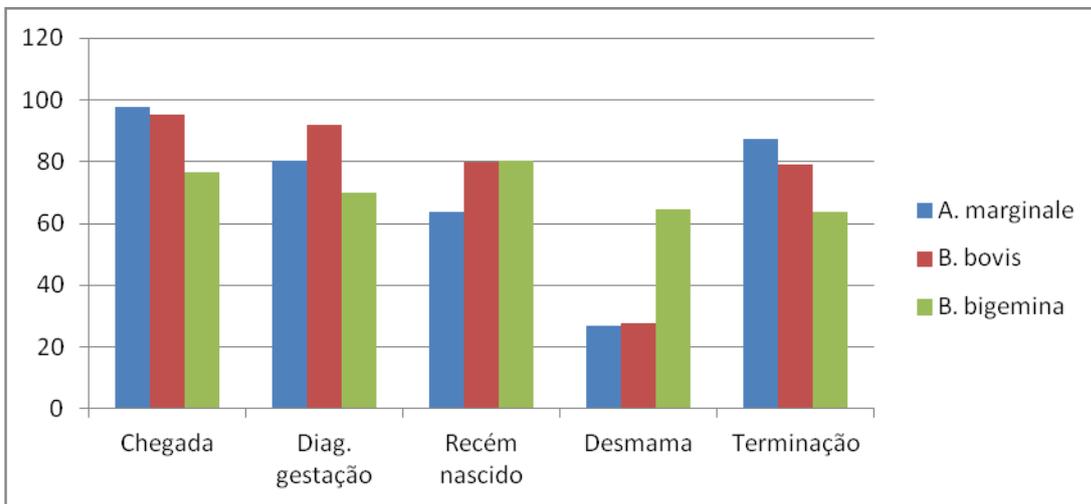
Tabela 11: Frequência (%) de animais positivos ao esfregaço sanguíneo para os agentes da TPB e a sorologia para anticorpos IgG anti- *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* e valores de mediana e o hematócrito menor que 24% em diversas categorias de bovinos de corte em confinamento.

	CH	DG	RN	BD	TR
<b>Esfregaço (%)</b>					
<i>A. marginale</i>	2,41 <sup>a</sup>	9,75 <sup>a</sup>	4,0 <sup>a</sup>	6,81 <sup>a</sup>	3,22 <sup>a</sup>
<i>B. bovis</i>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<i>B. bigemina</i>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>RIFI (%)</b>					
<i>A. marginale</i>	98,3 <sup>a</sup>	80,1 <sup>b</sup>	64,0 <sup>c</sup>	27,5 <sup>d</sup>	86,9 <sup>b</sup>
<i>B. bovis</i>	95,8 <sup>a</sup>	91,7 <sup>ab</sup>	80,0 <sup>b</sup>	28,0 <sup>c</sup>	79,3 <sup>b</sup>
<i>B. bigemina</i>	76,8 <sup>ab</sup>	70,2 <sup>ab</sup>	80,8 <sup>a</sup>	64,8 <sup>b</sup>	64,1 <sup>ab</sup>
<b>Mediana do hematócrito (%)</b>	39,0 <sup>bc</sup>	38,0 <sup>c</sup>	31,0 <sup>d</sup>	39,0 <sup>ab</sup>	40,0 <sup>a</sup>
<b>Frequência de animais com hematócrito &lt;24% (%)</b>	3,36	0,0	20,16	0*	2,19

Porcentagem com letras diferentes na linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos no teste de múltiplas comparações. \* $p < 0,05$  = diferença significativa no teste Qui-quadrado de Pearson.

CH = chegada; DG = Diagnóstico de Gestação; RN = Recém Nascidos; BD = Bezerros Desmama; TR = Termina o.

Gráfico 1: Frequência (%) de animais, de diferentes categorias com sorologia positiva para anticorpos IgG anti- *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*.



#### 5.4 Análise Molecular - Bezerros Recém-nascidos (RN)

Na pesquisa de DNA dos agentes da TPB através da técnica *n*PCR realizado nas amostras da categoria RN encontrou-se 52 animais positivos para *A. marginale*, um para *B. bigemina* e nenhum para *B. bovis* (Tabela 12). Sabe-se que a técnica da PCR é 100 vezes mais sensível que o esfregaço sanguíneo (Tabela 13), sendo a primeira indicada para detecção de animais portadores (Böse *et al.*, 1995)

Tabela 12: Porcentagem de bezerros de corte (3/4 Angus x1/4 Nelore) recém-nascidos positivos para TPB na *n*PCR em sistema de confinamento.

Agente/categoria	Recém-nascidos (RN)
	<i>n</i> PCR (%)
<i>A. marginale</i>	41,6
<i>B. bigemina</i>	0,8
<i>B. bovis</i>	0

Tabela 13: Frequência de bezerros de corte recém-nascidos (RN) positivos no esfregaço sanguíneo e na nPCR para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* em um sistema de confinamento.

	Esfregaço (%)	nPCR (%)
<i>A. marginale</i>	4,0 <sup>a</sup>	41,6 <sup>b</sup>
<i>B. bigemina</i>	0	0,75
<i>B. bovis</i>	0	0

Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) pelo teste de concordância -kappa

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Esfregaço sanguíneo – Diagnóstico etiológico

A categoria Animais de Chegada (CH) apresentou 3/124 animais positivos para *A. marginale* (2,41%) e nenhum para *Babesia spp.* Apesar de funcionários da fazenda terem relatado maior frequência de casos clínicos de babesiose nesse grupo, inclusive confirmado por necropsia e visualização do agente em lâmina, esse resultado já era esperado, pois a coleta da amostra foi realizada após o desembarque e inspeção dos bovinos em que não foi visto animais doentes apesar de não ter sido realizado exame clínico específico. Essa técnica diagnóstica também possui baixa sensibilidade para animais que não estão apresentando a doença clínica cuja parasitemia é maior. Isso ocorre fase aguda da doença para *B. bovis*, cuja parasitemia pode não ser o suficiente para ser detectada por essa técnica, dificultando o diagnóstico. Além disso, *B. bovis* possui comportamento viscerotrópico (Almeida *et al.*, 2019). Portanto, o resultado encontrado está condizente com o esperado. Quanto aos três animais positivos para *A. marginale*, eles poderiam se encontrar na fase aguda da doença, uma vez que a riquetsemia nessa fase é facilmente detectável nos eritrócitos de bovinos (Farias, 1995). Pelo método transversal do estudo, não se sabe se foi detectada doença clínica nesses animais posteriormente, porém havia possibilidade de recuperação, uma vez que já apresentavam sorologia positiva para o agente.

Na categoria DG, 12/123 das novilhas de 200 dias de gestação apresentaram-se positividade *A. marginale* (9,75%). Esses resultados, de certa forma, contrastam com os relatos da equipe fazenda que não manifestou queixas de anaplasmose nessa categoria e com os trabalhos de Vespasiano (2016) e Brito *et al.* (2019) os quais não encontraram esfregaço sanguíneo positivo de *A. marginale* em vacas gestantes provenientes de área em estabilidade enzoótica. Apesar de não ter ocorrido diferença estatística entre os grupos, acredita-se que esse resultado do grupo DG se deve a fatores como o estresse por calor, uma vez que a fazenda é situada no norte de Minas Gerais, local de temperaturas mais elevadas e o confinamento dessas novilhas gestantes não possui cobertura suficiente para promover um sombreamento que desse bom conforto térmico. O estresse por calor é capaz de reduzir a atividade do sistema imune, o que pode propiciar o aumento da proliferação desses patógenos tanto em animais portadores como naqueles recém-desafiados. Bovinos gestantes sob esse tipo de estresse possuem diminuição da fagocitose de neutrófilos e da explosão oxidativa, além de menor proliferação de linfócitos, bem como menor produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF-) por estes leucócitos (Amaral *et al.*, 2010). Outro fator que pode contribuir para esses resultados é a transmissão iatrogênica (vacinação e demais procedimentos) e a mecânica por moscas no caso de *A. marginale*, cuja inoculação do agente em uma categoria com potencial redução da atividade imune pode favorecer o aumento da riquetsemia.

Na categoria Recém-Nascidos (RN) encontrou-se 5/125 bezerros positivos para *A. marginale* (4,0%) e nenhum para *Babesia spp.* De certo modo, vai ao encontro de Costa *et al.* (2016) que observaram positividade no esfregaço sanguíneo em 5% dos bezerros recém-nascidos para *A. marginale* e nenhum para as babesias. O grupo RN para apresentar-se positivo no esfregaço sanguíneo teria que ter sido contaminados via vertical, uma vez que a coleta foi realizada em bezerros com até um dia de vida e o período de incubação para *A. marginale* e *Babesia spp.* é por volta de 21-28 dias e de sete a 14 dias, respectivamente (Kocan *et al.*, 2010 e Bock *et al.*, 2004). Também, concomitante a isso, teria que ocorrer elevada parasitemia para possibilitar a visualização dos parasitos por essa técnica. Esse conjunto de fatores ocorreu somente para *A. marginale* com cinco animais apresentando-se positivos. Já no nPCR foram observados 41,6% (52/125) dos bezerros positivos para *A. marginale*, o que indica maior sensibilidade da técnica molecular quando comparada ao esfregaço sanguíneo (Tabela 10). Já é conhecido que a PCR é 100 vezes mais sensível que o esfregaço sanguíneo, sendo a primeira indicada para detecção de animais portadores (Böse *et*

al., 1995). Quanto à babesiose, somente um animal foi positivo na PCR para *B. bigemina* e nenhum para *B. bovis*.

Na categoria Bezerros Desmama (BD), 6,81% (9/132) dos animais testaram positivo para *A. marginale* e nenhum para *Babesia spp.* Animais nessa fase se encontram no período da janela de susceptibilidade imunológica, quando há queda da proteção dos anticorpos maternos e ainda não há plenitude da imunidade adquirida (Chase et al., 2008). Os resultados da RIFI nesse grupo com baixos níveis de imunoglobulinas contra TPB corroboram o explicado. Com isso, quando esses animais são expostos a patógenos, no caso *A. marginale*, a riquetsemia tende a ser maior em um sistema imune ainda com menor vigor, o que justifica a positividade encontrada no esfregaço sanguíneo para o agente. Maior monitoramento desse grupo quanto a anaplasmosse pode ser útil para detectar precoce o surgimento da doença e minimizar perdas

No grupo animais de Terminação (TR), verificou-se positividade de três animais para *A. marginale* (3,22%) e nenhum para *Babesia sp.* O resultado corrobora com relatos da fazenda de casos clínicos de anaplasmosse e contrasta com a observação de que há adoecimento por *B. bovis* nesse grupo. Mas como já posto, até na doença clínica a chances não são altas de se encontrar *B. bovis* ao esfregaço sanguíneo Apesar da estabilidade enzoótica do grupo observada na RIFI para os patógenos, deve-se levar em conta que nem todos os animais foram reagentes a técnica; que a presença de anticorpos contra os patógenos não assegura proteção imune em muitos casos, pois há outros fatores envolvidos na imunidade do animal como a resposta do sistema fagocitário mononuclear e de leucócitos polimorfonucleares (Clover e Zarkower, 1980); além da variância antigênica do patógeno, que pode ser responsável pelo adoecimento do bovino e elevação da parasitemia mesmo na presença de anticorpos contra o agente (Garcia et al., 2022).

## 6.2. Hematócrito

Os valores da mediana do hematócrito apresentaram diferenças entre grupos ( $p < 0,05$ ), variando entre 31% e 40% (Tabela 11). Discreta redução do hematócrito ocorreu entre a categoria DG e as categorias BD e TR. Sabe-se que vacas prenhes possuem ligeira redução do

hematócrito devido a influência hormonais que resulta em menor hemoconcentração (Jain, 1993).

Na categoria RN em relação aos demais grupos é que houve diferença relevante tanto no valor da mediana quanto na frequência menor que de 24%, com os valores da categoria RN ficou abaixo das demais. Assim foi observado que 20,16% dos bezerros RN apresentaram valores de hematócrito abaixo de 24%, que é o limite fisiológico de acordo com Jain (1986), caracterizando assim anemia. E em contraste ao encontrado, geralmente, espera-se valores altos de hematócrito em bezerros ao nascimento (Jain, 1993; Biondo et al.,1998). Uma das hipóteses para esse baixo hematócrito encontrado seria a influência da anaplasose congênita, pois, segundo dados analisados, metade dos animais RN com anemia foram positivos para a doença no *nPCR* e a literatura ainda não tem clareza sobre as consequências hematológicas para os recém nascidos infectados ainda no útero. Demais animais positivos e com hematócrito dentro do limite fisiológico poderiam se encontrar no início do quadro de anaplasose em que ainda não havia a queda consistente do hematócrito, enquanto aqueles *nPCR* negativo e com anemia poderiam já ter eliminado ainda "in utero" o parasita da circulação sanguínea, mas o quadro de anemia ainda persistiria após o nascimento. Diante da incerteza, sugere-se mais pesquisas para elucidar essa questão a fim de verificar se há relação entre a transmissão vertical de agentes da TPB e queda de hematócrito e entre outras consequências.

### **6.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

#### **6.3.1 Análise por categoria animal**

##### **6.3.1.1 Novilhas de Chegada (CH)**

Segundo o critério de Mahoney (1972), os animais de chegada (CH) possuem baixo risco de surtos ou de adoecimento pela TPB, devido a sorologia positiva contra os agentes da tristeza parasitária ter ocorrido em mais de 75% dos animais. Segundo dados obtidos da fazenda, o grupo CH são novilhas de 7 a 9 meses de idade adquiridas por compra e oriundas

de fazendas situadas em área de estabilidade enzoótica como São Romão-MS, Canabrava do Norte - MT e São Feliz do Xingu-Pará. Isso justifica a soropositividade dos animais por estarem em contato com o agente nessas regiões de origem. Esse resultado é semelhante aos trabalhos de Junior, (2006) e Silva, *et al.* (2014) nos quais a sorologia realizada em bovinos de corte (Nelore e mestiços) no Estado do Pará - Brasil revelou alta positividade para os agentes.

Pontua-se que há relatos da fazenda (comunicação pessoal) de casos clínicos de babesiose que inclui sinais como inapetência, perda de peso, mucosas pálidas e ictéricas e confirmação em achados de necropsia e esfegaço sanguíneo. Deve-se ressaltar que, apesar desse grupo estar dentro dos parâmetros de estabilidade, essa condição não é absoluta para a não ocorrência de casos clínicos. Primeiro, conforme mostra a Tabela 1, não foi 100% dos animais que apresentou titulação positiva preditiva de alguma proteção imune, ou seja, há alguns animais negativos na sorologia e que estariam mais susceptíveis a adoecer. Segundo, que há evidência na literatura que sugere que somente a presença de imunoglobulinas detectáveis não é necessariamente uma indicação de boa imunidade, há outros fatores envolvidos na proteção como a resposta do sistema fagocitário mononuclear e de leucócitos polimorfonucleares, variação antigênica das *Babesias spp.*, susceptibilidade racial, além de outros fatores que influenciam na resposta imune do animal (Bock *et al.*, 2004). Por último, existem fatores de estresse que afetam negativamente a imunidade do bovino o que pode tornar-lo mais susceptível a adoecer (Gonçalves, 2000). E essa categoria foi submetida ao estresse do transporte, devido a viagem longa realizada da origem ao destino, bem como a outros tipos de estresse ao chegarem na fazenda como: mudança de dieta, manejo, clima, alteração nas relações hierárquicas e entre outros. Tudo isso é fator de risco relevante para que animais portadores da TPB possam manifestar a doença e justificar a ocorrência de alguns casos clínicos relatados neste grupo.

#### **6.3.1.2 Novilhas no Diagnóstico de Gestação (DG)**

Segundo critérios estabelecidos, esta categoria animal apresenta altos níveis de anticorpos para *A. marginale* e *B. bovis*, uma vez que mais de 75% dos animais apresentaram soropositividade para tais agentes, o que indica baixo risco de surto ou de adoecimento. Esses

resultados corroboram com Costa *et al.* (2016), que encontraram soropositividade de 86,6% para *A. marginale* e 96,6% para *B. bovis* em animais gestantes aos 120 dias. Vespasiano (2016) também encontrou em vacas prenhes elevados títulos sorológicos para esses dois agentes na taxa de 86,6% e 93,3%, respectivamente.

Já para *B. bigemina*, a sorologia do grupo DG indicou 70,2% de positividade, o que está um pouco abaixo dos 75% preconizado por Mahoney (1972), podendo esta categoria estar sob risco maior de ocorrência de casos de casos clínicos ou surtos por este agente. O resultado difere de Madruga *et al.*, (1984) que encontraram 93% de positividade sorológica para esse agente em vacas de corte prenhes a pasto no Mato Grosso do Sul; Além disso, Madruga *et al.* (2001), na mesma região do país, encontraram soroprevalência de 94,4% *B. bigemina* em 1.367 animais de corte e Junior (2006) encontrou, no Estado do Pará-Brasil, 98,5% de soroprevalência para o agente em fêmeas Nelore e mestiças leiteiras. Ademais, Costa *et al.*, (2016) que encontraram 98,6% de positivo em vacas prenhes aos 120 dias. A explicação desses resultados em respectivos trabalhos foi relacionado à alta infectividade da *B. bigemina*, que permite um índice maior de inoculação pelo carrapato, bem como a maior taxa de infecção de teleógenas de *R. microplus* por *B. bigemina* do que por *B. bovis* (Madruga *et al.*, 1984 e Silva, 2003). Já Vespasiano (2016), do contrário desses trabalhos, relatou baixas taxas da *B. bigemina* (46,6%) em vacas gestantes de leite em piquetes maternidade em Minas Gerais. Apesar de Bock e De Vos (2001) afirmarem que a imunidade contra *B. bigemina* pode durar até 4 anos, Vespasiano (2016) justifica esse resultado devido à manutenção dessas vacas em sistema *free stall* sem contato com carrapatos por, no mínimo, 300 dias (lactação), o que poderia ter promovido a queda da sorologia para o agente. Outros trabalhos como de Santos *et al.* (2017) encontraram também frequência sorológica reduzida para *B. bigemina* (37,2%) em bovinos adultos, porém deve-se atentar que para os demais agentes os resultados são similarmente baixos e a região caracterizava-se por instabilidade enzoótica. Ou seja, nesses casos já é esperado este tipo de desfecho.

### **6.3.1.3 Animais Recém-nascidos (RN)**

Primeiramente, é possível observar que os animais tiveram uma boa transferência de imunidade passiva, mais de 90% dos animais foram enquadrados com boa (5,8 - 6,1 g/dL) e excelente ( $\geq 6,2$  g/dL) no quesito transferência de imunidade passiva, conforme (Tabela 14).

Tabela 14: Percentual de bezerros de corte recém-nascidos de acordo com a categoria de transferência imunidade passiva em um sistema de confinamento.

<b>Categoria*</b>	<b>Proteína sérica total (g/dl)*</b>	<b>Indicação de bezerras/ categoria (%)*</b>	<b>Recém - nascidos (n=125) (%)</b>
<b>Excelente</b>	≥ 6,2	>40	84,3
<b>Boa</b>	5,8 - 6,1	30	7,4
<b>Aceitável</b>	5,1-5,7	20	4,1
<b>Ruim</b>	<5,1	<10	4,1

Fonte: \*Lombard *et al.*, (2020)

Dos 125 bezerros amostrados, 4 amostras não puderam ser analisadas devido hemólise. Das 121 amostras analisadas, 116 (95,8%) apresentaram níveis aceitáveis a excelente de proteína total. Somente cinco animais (4,1%) apresentaram níveis ruins de transferência de imunidade passiva. O valor máximo, a média e o mínimo encontrado de proteína total foi de 11,0 g/dL; 8,3 g/dL e 4,7 g/dL, respectivamente.

Apesar do parâmetro se referir a bezerros leiteiros, geralmente, assumi-se que o gado de corte é criado em condições de confinamento menos intensas e menos expostas aos patógenos do que o gado leiteiro. Assim, os padrões de transferência de imunidade passiva no gado de leite devem ser iguais ou superior ao do gado de corte (Lombard *et al.*, 2020). Também, segundo Todd *et al.* (2018), as concentrações séricas de proteína total de 6,0 a 6,3g/dL são pontos de corte ideais para minimizar doenças e mortes em bezerros de corte.

Segundo Lombard *et al.* (2020), o padrão ouro de coleta de amostra para avaliar a transferência de imunidade passiva é de 24h a 48h de idade, porém a coleta de amostra do grupo RN do estudo se deu após o bezerro nascido se apresentar ativo, em estação, sem nenhum sinal de líquido placentário em seu corpo e possivelmente após as primeiras mamadas do colostro até as 24h ou pouco mais de vida. Isso poderia comprometer os resultados de proteína sérica encontrada no soro desses bezerros, mas partindo do conhecimento que os bezerros nascem sem imunoglobulinas, pois segundo Peter (2013), a placenta sinepiteliocorial cotiledonar do bovino, que é composta por três camadas maternas e três camadas fetais, não permite a transferência de imunoglobulinas da mãe para o feto; e associado que bezerros ao nascimento, antes da colostragem, possuem média de proteína sérica de apenas 4,61 g/dL (Wilm *et al.*, 2018). Com isso, pode-se inferir que o resultado de proteína sérica reflete a boa

transferência de imunidade passiva na maioria dos bezerros recém-nascidos. Além disso, os resultados da RIFI desse grupo podem corroborar isso, uma vez que mostrou que esses animais possuem alta soropositividade na técnica sorológica. O que poderia contrapor a esse resultado da RIFI seria a ocorrência de infecção fetal intrauterina por TPB com produção de anticorpos pelo feto e consequente aumento das proteínas totais, porém os elevados títulos sorológicos no estudo contrapõem com as taxas de transmissão vertical descritas atualmente que são por volta de 10 a 40% para *A. marginale* e de no máximo 10% para as babesias (Maldonado *et al.*, 2012, Meneses, 2013, Grau *et al.*, 2013 e Costa *et al.*, 2016). Soma-se que neste estudo a taxa de transmissão vertical de *A. marginale* foi 41,6%. Ainda, o que reforça que os resultados da RIFI do grupo RN vieram de forma hegemônica do colostro são os trabalhos de Grau *et al.* (2013) e Costa *et al.* (2016), no primeiro, vacas antes do parto que deram 100% de soropositividade na RIFI para *A. marginale*, somente 10% dos recém-nascidos apresentaram-se positivos na sorologia antes de receberem o colostro. O segundo, aponta que somente metade dos bezerros com PCR positivo ao nascer para TPB tiveram positividade na sorologia pré-colostral. Logo, mostra-se que a soropositividade do grupo RN ocorreu, de modo predominante, devido a colostragem e não pela produção de anticorpos pelo feto.

Com relação aos sete animais (4,1%) que obtiveram deficiência da colostragem, não se pode afirmar que, efetivamente, eles permanecerão com nesse *status*, pois em função do período de coleta das amostras ter ocorrido sem o critérios de tempo pós colostragem, esses bezerros poderiam estar ainda em uma fase importante de absorção de proteínas pelo intestino e ainda não ter tido tempo hábil de apresentar o aumento da proteína sérica. E sabe-se que o tempo ótimo de absorção de nutrientes e imunoglobulinas vai até 12 horas após o nascimento, sendo mais eficiente quanto mais cedo ocorrer (Davis e Drackley, 1998).

É importante ressaltar que ainda são necessários mais pesquisas para determinar com mais clareza os valores de referência e os pontos de corte que caracterizam, por exemplo, o sucesso ou a falha da transferência de imunidade passiva em gado de corte, baseado nas medidas de resultados de saúde e desempenho como morbidade, mortalidade e crescimento (Todd *et al.*, 2018). Além disso, principalmente no Brasil, devido a colostragem ser um ponto crítico para a saúde e sobrevivência dos bezerros recém-nascidos, e muitas vezes ser

negligenciada, sugere-se as propriedades de gado de corte conhecer como se encontra a transmissão da imunidade passiva e, assim, implementar um programa de monitoramento e de correção de erros, para que se possa obter melhores índices produtivos e de saúde dos animais.

#### **6.3.1.4 Bezerros da Desmama (BD)**

Os bezerros de Desmama (BD), de modo geral, apresentaram menores valores sorológicos para os três agentes, o que pode estar relacionado com a janela de susceptibilidade que ocorre a época da desmama (três meses de idade aproximadamente), em que há queda da imunidade passiva adquirida via materna com concomitante resposta imune ativa do bezerro ainda não plena e ativa o suficiente para lhe conferir proteção (Chase et al., 2008). Essa categoria por estar com baixos níveis de sorologia positiva para os três agentes, se encontra em risco aumentado de adoecimento ou de surto por TPB.

Quanto à comparação entre os patógenos, esse grupo animal teve maior soropositividade para *B. bigemina* (64,8%) do que para os demais agentes, o que contrasta com Madruga et al. (1984) que apontam queda dos níveis de anticorpos, entre 28 e 56 dias para *B. bigemina* e de 56 a 84 dias para *B. bovis* e com Farias (1995) que indicou proteção colostrar de até no máximo 90 e 60 dias para esses agentes respectivamente. Porém, no estudo de Madruga et al. (1984) houve exposição a esses agentes desde as primeiras semanas de vida do bezerro, o que faz ocorrer, por consequência, a ação neutralizadora dos anticorpos da imunidade passiva de modo mais breve. No caso deste estudo, segundo veterinários da fazenda e pelas condições climáticas do local, não há ou tem-se a níveis muito baixos a infestação por carrapato e com isso, provavelmente, não ocorre a transmissão do parasita, o que pode propiciar a não acontecer a neutralização dos anticorpos colostrais anti-*B. bigemina*. Ainda segundo Tizard (2013), de maneira geral, os anticorpos conseguem proteger os bezerros por 3 a 4 meses de idade. Portanto, não se consegue definir exatamente o motivo do valor acima do esperado de anticorpos desse grupo para *B. bigemina*. Precisa-se de mais estudos que abordam a duração da imunidade passiva contra esse agente em específico e contra os demais agentes da TPB de modo a esclarecer questões como a durabilidade dos anticorpos colostrais nessas condições e se testes sorológicos são bons indicadores de

proteção imune. Quanto a *B. bovis*, o valor de 28% está de acordo com Krolow *et al.* (2002), que afirmaram que devido a queda da imunidade passiva, somente em torno 16,1% dos bezerros não expostos ao agente são positivos a sorologia para *B. bovis* aos quatro meses de idade. No caso do grupo BD, a amostragem foi realizada aos 3 meses de idade, o que pode justificar o nível de positividade ainda um pouco elevado. Assim, a soroprevalência para este grupo quanto a *A. marginale*, está dentro do esperado, visto que a proteção colostrar contra esse agente dura por volta de 60 a 90 dias (Madruga *et al.*, 1985).

### 6.3.1.5 Animais de Terminação (TR)

Os animais de Terminação apresentaram positividade sorológica acima de 75% para *A. marginale* (86,9%) e *B. bovis* (79,3%), o que dentro do critério de Mahoney (1972) indica baixo risco de adoecimento ou surtos de tristeza parasitária causada por esses agentes. Já para *B. bigemina* (64,1%) os animais apresentaram valores abaixo do referenciado, o que faz esses animais estarem sob maior risco de adoecimento para o agente. A categoria TR é composta por machos e fêmeas de 24 a 26 meses de idade e nascidas na fazenda e pelas novilhas adquiridas por compra que foram emprenhadas e pariram na fazenda e depois submetidas à engorda após o desmame da cria, ou seja, são animais que, após a chegada, permaneceram na fazenda por período de 17 a 18 meses. Para melhor entendimento da dinâmica sorológica da TR, seria interessante o conhecimento de quais animais compõe os subgrupos, pois pode haver diferença sorológica entre os animais nascidos na fazenda, que praticamente não são expostos ao carrapato devido ao ambiente desfavorável ao ixodídeo, com os animais oriundos de fazendas externas que podem estar contribuindo para a sorologia de *Babesia spp.*, já que vieram de área endêmica com contato com o carrapato e cuja imunidade natural contra *B. bigemina* pode durar até 4 anos (Bock e De Vos 2001). Quanto ao *A. marginale*, ele é transmitido também por moscas hematófagas que estão presentes no ambiente dos animais. Provavelmente sua prevalência constante se dá por esta via bem como por outras como a transmissão iatrogênica (agulhas) e vertical.

Com relação a *A. marginale*, há relatos da fazenda de alguns casos da doença nessa categoria, o que é condizente com resultado do esfregaço sanguíneo. Altos títulos sorológicos do grupo para esse agente não impede casos clínicos de acontecerem. Excetuando a questão

do estresse do transporte, todos os motivos citados para o grupo CH são válidos para o grupo TR. Porém, no caso de *A. marginale* pode ocorrer o adicional do fator variância de cepa do agente, em que a diversidade genética entre o patógeno conseguiu produzir alta riquetsemia em bovinos de corte da raça Angus (Garcia *et al.*, 2022).

Por fim, um ponto que iria contribuir para entender a fundo a dinâmica da TPB nesse grupo, principalmente da *Babesia sp.*, seria subdividir a categoria em animais de terminação provenientes de local externo e animais nascidos na própria fazenda. Posteriormente, realizar provas sorológicas e moleculares de elevada sensibilidade como a PCR, a fim de possibilitar determinar a diferença sorológica protetiva entre subgrupos, a intensidade da circulação dos agentes entre eles, bem como a realização de sequenciamento genético.

### **6.3.2 Análise comparativa entre as categorias**

#### **6.3.2.1 Novilhas de Chegada (CH) e Novilhas Diagnóstico de Gestação (DG)**

Apesar das duas categorias possuírem alta frequência de titulação sorológica para *A. marginale*, a categoria DG apresenta menor índice de animais soropositivos em relação à categoria CH. Uma das hipóteses que explica isso se deve a transmissibilidade do patógeno, uma vez que a categoria CH é provenientes de áreas endêmicas a pasto em que a contaminação pelo vetor biológico assume papel importante na disseminação da doença. Sabe-se que a transmissão biológica por carrapato é cerca de duas vezes mais eficiente que a transmissão mecânica realizada pela mosca *Stomoxys calcitrans* (Scoles *et al.*, 2005). Já o grupo DG são mantidos em ambiente de confinamento com condições relativamente desfavoráveis ao *R. microplus* o que reduz o contágio dos animais por essa via e assim justifica níveis menores de anticorpos contra o agente.

### 6.3.2.2 Desmama (DM) e Animais de Terminação (TR)

Há clara diferença entre os animais da DM e da TR quanto à sorologia de *A. marginale* e *B. bovis*, sendo que a TR possui mais de duas vezes animais positivos aos agentes. Uma vez que a propriedade possui um ambiente desfavorável ao carrapato e não é relatado a sua presença nos animais, sendo que necessita do ixodídeo, vetor biológico, para manter o agente circulando no rebanho em altos níveis, a explicação mais provável que justifica a sorologia maior de *B. bovis* na TR é que a composição desse grupo amostral possui muitos animais provenientes de propriedades externas em que a presença do carrapato estaria de forma endêmica e a contaminação dos animais pela *B. bovis* ocorreria de modo constante com conseqüente produção de imunoglobulinas para o patógeno. E de fato, segundo dados da fazenda, nessa amostragem há boa parte de animais provenientes de outras localidades.

Quanto ao *A. marginale*, independente da origem dos animais, também se explicaria o elevado contágio em função da transmissão mecânica, principalmente, por moscas hematófagas e pela transmissão vertical que foi 41,6% neste trabalho. Isso então, poderia justificar a ocorrência de elevados títulos sorológicos de *A. marginale* no grupo TR, que no passado, quando faziam parte do grupo DM, por exemplo, provavelmente, tinham o perfil sorológico característico da própria categoria DM, e que depois foram gradualmente se infectando com o patógeno com o passar do tempo no sistema. Como sugestão, para maiores esclarecimentos, é recomendável a realização de provas sorológicas e moleculares (PCR) em subgrupos da categoria TR como já sugerido.

## 6.4 Análise Molecular - Bezerros Recém-nascidos (RN)

Na pesquisa de DNA dos agentes da TPB através da técnica *nPCR* realizado nas amostras da categoria RN encontrou-se 52 animais positivos para *A. marginale*, um para *B. bigemina* e nenhum para *B. bovis* (Tabela 4).

Como a coleta das amostras foram realizadas em bezerros com até um dia de vida, os resultados obtidos evidenciam a ocorrência de transmissão vertical de dois dos três agentes da

TPB nesse grupo, com destaque para o *A. marginale* em que a taxa observada foi 41,6%, o que mostra a importância epidemiológica dessa via de transmissão. Isso ainda é corroborado por veterinários da propriedade que relatam que há casos clínicos e até óbito de bezerros com poucos dias de vida decorrentes da anaplasmose. Pouco se sabe sobre a real contribuição das vias transplacentárias na epidemiologia da TPB, mas quando se observa alta transmissão da doença por esta via e até morte de bezerros por esta causa, já se caracteriza importante, epidemiologicamente, essa forma de transmissão da doença (Kessler 2001, Aubry e Geale 2011 e Costa *et al.*, 2016). Assim, em uma área de estabilidade enzoótica é preciso caracterizar o equilíbrio parasito-vetor-hospedeiro, pois após a perda do equilíbrio, a transmissão vertical pode ser comum, constituindo relevante mecanismo de disseminação de parasitos em rebanhos (Jonsson *et al.*, 2012 e Costa *et al.*, 2016).

Com relação a transmissão das babesias, encontrou-se apenas 0,8% no caso de *B. bigemina* e 0% de *B. bovis*, o que contrapõe com relatos da fazenda que já teve casos de babesiose fatal em bezerro recém-nascido por *B. bovis* confirmada em necropsia e posterior visualização do agente em lâmina. A literatura mostra que a taxa de transmissão vertical de *Babesia sp.* é geralmente baixa. *B. bovis* não foi encontrado em fetos por Andrade (2021). Em contrapartida, a esse e a todos os trabalhos até hoje publicados, Brito *et al.* (2019) encontraram transmissão vertical de *B. bovis* na elevada taxa de 81%. Não há nesse trabalho discussão sobre as causas ou fatores de risco que poderiam justificar o alto índice de transmissão encontrado para o agente.

A transmissão vertical de *A. marginale* é mais frequente que de *Babesia sp.* e já vem sendo relatada há algumas décadas tanto em condições experimentais quanto a campo em vacas gestantes com anaplasmose clínica ou cronicamente infectadas sem sinais da doença (Zaugg e Kuttler 1984, Potgieter e Rensburg 1987 e Salabarría e Pino, 1988). Para efeito comparativo a este estudo, há alguns trabalhos científicos que abordaram a taxa de transmissão vertical de um ou mais agentes da TPB pelas técnicas moleculares PCR ou *n*PCR em bezerros recém-nascidos: para *A. marginale* taxas menores foram encontradas por Cavalcante (2007) em gado Nelore em SP, por Meneses (2013) em bezerros leiteiros em MG e por Grau *et al.* (2013) em gado de corte com valores de 5,88%, 10% e 10,5%, respectivamente. Taxas médias a altas foram observadas por Andrade (2021) em fetos em MG

combinando também técnica sorológica; por Maldonado *et al.* (2012) em gado de corte na Venezuela; por Costa *et al.* (2016) em rebanho leiteiro no nordeste do Brasil; por Pohl *et al.* (2013) em gado de leite em MG; por Silva *et al.* (2014) no RJ e por Brito *et al.* (2019) em Girolando em Rondônia cujos valores foram 19,31%, 20,69%, 25%, 25%, 41% e 68,75%, respectivamente.

No caso da transmissão vertical de *Babesia sp.*, o primeiro caso de transmissão vertical *B. bovis* no Brasil foi relatado por Ribeiro (1994). Apesar disso, atualmente, há escassez de trabalhos que abordam a taxa de transmissão vertical da *Babesia sp.* e sua importância epidemiológica. Há alguns relatos de casos de *B. bovis* na literatura como Yeruham *et al.*, (2003) e Santarosa *et al.*, (2013) que mostram caso clínico de bezerros com menos de uma semana de vida e confirmação da doença através da visualização do parasita em lâmina. Novamente para efeito comparativo a esse estudo desenvolvido, por técnicas moleculares em recém-nascidos por exemplo, Cavalcante (2007) encontrou taxa de transmissão vertical de 5,88% para *B. bovis*, Costa *et al.*, (2016) taxa de 6,66% para *B. bovis* e 3,33% para *B. bigemina*; Vespasiano (2016) 2,38% para *B. bovis* em bezerros leiteiros em MG e Andrade (2021) que não amostra positiva para *B. bovis* e 6,2% para *B. bigemina* em fetos na técnica sorológica. Resultado extremamente alto de 81% foi encontrado para *B. bovis* em gado leiteiro em Rondônia na técnica de *nPCR*; na ocasião 13 de 16 bezerros recém-nascidos atestaram positivo para o agente.

A variabilidade nas taxas de transmissão entre trabalhos científicos e este estudo pode está relacionado a características locais relacionados a rebanhos, como clima, perfil genético dos bovinos e sazonalidade de vetores, além de fatores relacionados à variabilidade genética dos agentes, os quais devem ser considerados nesse tipo de via de transmissão em questão (Britto, 2019). Para *A. marginale*, por exemplo, a diversidade genética é alta no estado de MG (Pohl *et al.*, 2013).

Como discussão dos estudos feitos até hoje acerca do tema, além de haver poucos trabalhos na literatura relacionados à transmissão vertical de TPB, pontua-se que a taxa de transmissão vertical desses recentes trabalhos citados amostraram, relativamente, baixo número de bezerros recém-nascidos sendo que a maioria tinham 30 animais ou menos em seus estudos. Costa *et al.* (2016) amostraram 60 animais e este trabalho mais que o dobro. Andrade (2021) amostrou 145 fetos de abatedouro. Isso revela a necessidade de mais

pesquisas na área e com maior poder de amostragem para assim sanar dúvidas relacionados à transmissão vertical de TPB como: importância epidemiológica dessa via para manutenção da doença no rebanho, bem como seu impacto na fazenda, fatores predisponentes para sua ocorrência e mecanismos de infecção do feto pelo agente. Também descobrir se vacas infectadas cronicamente podem transmitir os parasitos por gestações consecutivas, se há diferença da virulência de cepas de parasitos ou se a variabilidade genética pode influenciar o potencial de transmissão de infecção e doença do feto (Costa *et al.*, 2016). tendo em vista o atual avanço de técnicas moleculares que possuem alta sensibilidade para indentificar DNA dos parasitos associado a intensificação dos sistemas produtivos ocorridos nas últimas décadas que permite obter uma elevada e rápida amostragem de animais, espera-se que estudos mais robustos e esclarecedores na área sejam realizados em um futuro breve.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *status* epidemiológico dos animais que se encontram por volta dos nove meses idade mostra baixo risco de adoecimento ou surtos para os agentes da TPB, segundo critério de Mahoney e Ross (1972). Entretanto, devido aos fatores como: ao alto fluxo de animais vindos de várias localidades, condições climáticas e ambientais específicos da fazenda, pouco ou nenhum vetor biológico dos agentes presentes na fazenda, pode haver alteração da situação da fazenda ao longo do tempo. Além disso, é prudente que se pondere as classificações de estabilidade feitos por esses autores, pois na fazenda apesar do *status* estável, há adoecimento de animais por TPB. Portanto, somente o perfil sorológico dos animais não é o suficiente para determinar o *status* epidemiológico da propriedade.

A fazenda possui alguns fatores de risco que pode contribuir para o surgimento da TPB. Dentre eles está o estresse térmico pelo calor, com isso recomenda-se promover conforto térmico de todas as categorias, principalmente, o grupo DG em que fatores imunossupressores em excesso podem está correlacionado a transmissão vertical de TPB. Além disso, deve-se considerar como importante fator de risco o grau sanguíneo dos animais, sendo que *Bos taurus* possuem menor adaptabilidade a condições climáticas como a da fazenda e maior susceptibilidade a doença.

A taxa de transmissão vertical para *A. marginale* foi alta (41,6%), o que indica importância epidemiológica dessa via no mecanismo de manutenção da doença no rebanho. Quanto a *Babesia bigemina* e *B. bovis* a transmissão vertical foi muito baixa e ausente, respectivamente, não indicando importância epidemiológica dessa via para esses agentes. Porém, como isso contrasta com relatos de alguns casos clínicos de babesiose ocorridos na fazenda em bezerros muito jovens e adultos confirmada em visualização direta do agente em lâmina, sugere-se uma melhor investigação do mecanismo de transmissão desses agentes na fazenda.

## 8. CONCLUSÕES

Todas as categorias apresentaram positividade ao esfregaço sanguíneo para *A. marginale*. Em nenhuma categoria foi encontrado animais positivos para *Babesia sp.*

As categorias CH, DG, BD e TR possuem hematócrito, predominantemente, dentro dos valores de normalidade. Já a categoria RN possui valores da mediana do hematócrito inferior em relação às demais categorias e quadro de anemia em 20,16% dos animais..

Os animais da categoria Chegada (CH) estão em baixo risco de adoecimento ou surtos para tristeza parasitária, uma vez que mais de 75% dos animais da fazenda estão com sorologia positiva para os agentes até aos 9 meses de idade.

De acordo com a sorologia, a categoria Diagnóstico de Gestação (DG) possui menor risco de adoecimento ou surto para os agentes *A. marginale* e *B. bovis* do que para *B. bigemina*.

Houve boa transferência de imunidade passiva nos bezerros recém-nascidos (RN)

Os animais da desmama (BD) é a categoria mais susceptível a TPB, pois apresentaram baixos índices de positividade sorológica a esses agentes, ou seja, esse grupo se encontra em instabilidade enzoótica.

Há transmissão vertical de *A. marginale* em alta frequência (41,6%), tendo esta via importância epidemiológica, enquanto não foi verificada transmissão vertical de *B. bovis* e a de *B. bigemina* foi a uma baixa frequência de 0,8%

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. S. DE ; SENA,L.M; BARIONI, G; MORAES, T.M.A; OLIVEIRA, R.E DE; Comparação entre métodos de avaliação direta para o diagnóstico de babesiose em bovinos. *Research, Society and Development*, v. 8, n. 10, p.1-10., 2019.

ALMEIDA, M. B. DE; F.P.TORTELLI; RIET-CORREA, B; FERREIRA, J.L.M; SOARES, M.P; FARIAS, N.A.R; RIET-CORREA F.; SCHILD, A.L. Tristeza risteza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: Estudo retrospectivo de 1978-2005. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 26, n. 4, p. 237–242, 2006.

ALVAREZ, J. A.; ROJAS, C.; FIGUEROA, J. V. Diagnostic tools for the identification of *Babesia* sp. In persistently infected cattle. *Pathogens*, v. 8, n. 3, 2019.

AMARAL, B. C. D.; CONNOR,E.E; TAO,S; HAYEN,J. BULBOZ,J.; DAHL G.E. Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 38, n. 1, p. 38–45, 2010.

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.

AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 58, n. 1, p. 1–30, 2011.

BACARENSE, A. P. F. .; VIDOTTO, O.; CRUZ, G. . Transmissão congênita de *Babesia bovis*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 53, n. 4, 2001.

BAHIA, M; SILVA, J DE S; GONTIJO, I.S; CORDEIRO, M.D; SANTOS, P DE N; SILVA, C.B.DA; NICOLINO,R.R; MOTA, D.A; SILA, J.B DA; FONSECA, A.H. Characterization of cattle tick fever in calves from the Northwestern Region of Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, v. 29, n. 1, p. 1–10, 2020.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of animal science*, v. 73, n. 9, p. 2804–2819, 1995.

BIONDO, A.W; LOPES, S.T DOS A; KOHAYAGAWA. A; TAKAHIRA, R.K. ALENCAR, N.X. Hemograma de bovinos (*Bos indicus*) sadios da raça nelore no primeiro mês de vida, criados no Estado de São Paulo. *Ciência Rural*, v.28, n.2, p. 251-256, 1998.

BOCK, R. JACKSON,L; DE VO,A; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. *Parasitology*, v. 129, n. SUPPL., 2004.

BOCK, R. E.; VOS, A. J. DE. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: A review of the evidence. *Australian Veterinary Journal*, v. 79, n. 12, p. 832–839, 2001.

BOSE, R.; JORGENSEN, W.K; DALGLIESH R.J; FRIEDHOFF, K.T; DE VOS A.J. CURRENT STATE and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, v. 57, n. 1–3, p. 61–74, 1995.

BRITO, L. G; OLIVEIRA M.C.S., ROCHA R.B., SILVA NETTO F.G., MARIM A.D., SOUZA G.C.R.; MOURA M.M.F. *Anaplasma marginale* infection in cattle from southwestern Amazonia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 3, p. 249–254, 2010.

BRITO, L. G; ROCHA, R.B; BARBIERI F. DA S; RIBEIRO E.S; VENDRAMI F.B; SOUZA, G.C.R; GIGLIOTI, R; REGITANO L.C.A; FALCOSKI, T.O.R.S; TIZIOTO, P.C; OLIVEIRA, M.C.S. *Babesia bovis* infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 4, n. 1–2, p. 78–82, 2013.

BRITO, L. G.; BARBIERI, F DA.S; FERREIRA, T.A.A.; CARNEIRO, D. DE S; AMARAL,

T.M; FIGUEIRÓ, M.R; OLIVEIRA, M.C DE SENA. Transmissão vertical de *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* na epidemiologia da tristeza parasitária bovina. *In: circular técnica* 48. Belém, PA. p. 1–18, 2019..

CALLOW, L.; ROGERS, R. .; VOS, J. A. DE. Tick-borne diseases: cattle-pathology and serology. CSIRO Info ed. East Melbourne: *In Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases*, 1993.

CANEVER, M. F; VIEIRA,L.L; RECK, C; RICHTER, L; MILETTI, L.C. First evaluation of an outbreak of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southern Brazil using multiplex PCR. *Korean Journal of Parasitology*, v. 52, n. 5, p. 507–511, 2014.

CASA, M. DA S. Prevalência e fatores associados á infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Crioula Lageana. *Dissertação de Mestrado*. 129 p, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages-SC, 2017.

CAVALCANTI, G.G; Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bezerros da raça Nelore no Estado de São Paulo. *Dissertação de Doutorado*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP. Botucatu-SP, 2007.

CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, v. 24, n. 1, p. 87–104, 2008.

CLOVER, C.K.; ZARKOWER, A. Immunologic responses in colostrum-fed and colostrum-deprived calves. *Am. J. Vet. Res.*, 41:1002–7, 1980.

COSTA-JÚNIOR, L. M., RABELO, E.M.L; MARTINS FILHO,O.A; RIBEIRO, M.F.B. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. *Veterinary Parasitology*, v. 139, n. 1–3, p. 231, 2006.

COSTA, S. C. L., MAGALHÃES V.C.S; OLIVEIRA, U.V; CARVALHO, F.S; ALMEIDA, C,P; MACHADO, R.Z; MUNHOZ, A.D. Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 2, p. 270–275, 2016.

COSTA, V. M. M; RIBEIRO, M.F.B; DUARTE, G. A.F.P; SOARES, J.F; AZEVEDO, S.S; BARROS, A.T.M; RIET-CORREA, F; LABRUNA M.B. Incidence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* among calves in the semiarid region of Paraíba, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 38, n. 4, p. 605–612, 2018.

DAVIS, C. L.; DRACKLEY, J. K. The development, nutrition and management of the young calf. *Iowa State University Press, Ames*, 1998.

DE LA FUENTE, J.; RUIZ-FONS, F.; NARANJO, V.; TORINA, A.; RODRÍGUEZ, O.; GORTÁZAR, C. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res. Vet. Sci.*, v.84, p.382-386, 2008.

DEVOS, A. J. e POTGIETER, F. Bovine babesiosis. In *Infectious Diseases of Livestock*. In: *Press, O. U. (Ed.)*. p. 278–294. Capetown.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (FAO). Ticks and tick-borne diseases control. In: *Tick-borne diseases control*. FAO Rome, 1984. p. 301–621.

FACURY-FILHO, E. J. *et al.* Effectiveness of enrofloxacin for the treatment of experimentally-induced bovine anaplasmosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, v. 21, n. 1, p. 32–36, 2012.

FARBER, M. “Bovine Sadness Complex” (piroplasmosis), a great problem for tropical and subtropical regions. *Biological and Health Sciences - CONICET*, p. 1–6, 2016.

FARIAS, N. A. R. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. 80 p. *Livraria e Editora Agropecuária*, 1995.

GARCIA, A. B; JUSI, M.M.MG; FRESCHI, C.R; RAMOS,I.A.S; MENDES, N.S; AMARAL,R.B; GONÇALVES, R.L; ANDRE,M.R; MACHADO, R.Z. High genetic diversity and superinfection by *Anaplasma marginale* strains in naturally infected Angus beef cattle during a clinical anaplasmosis outbreak in southeastern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 13, n. 1, 2022.

GIGLIOTI, R; OLIVEIRA, H.N; SANTANA, C.H; IBELLI, A.M.G; NÉO, T.A; BILHASSI,T.B; RABELO, M.D; MACHADO, R,Z; BRITO, L.G; OLIMEIRA, M.C.S. Ticks and Tick-borne Diseases *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state , Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 5, p. 657–662, 2016.

GOFF, W. L; BASTOS, R.G; BROWN,W.C; JOHNSON,W.C; SCHNEIDER, D.A. The bovine spleen: Interactions among splenic cell populations in the innate immunologic control of hemoparasitic infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 138, n. 1–2, p. 1–14, 2010.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. *Ciência Rural*, v. 30, n. 1, p. 187–194, 2000.

GRAU, H. E. G; FILHO, N.A.C; PAPPEN,F.G; FARIAS, N.A.R. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, v. 22, n. 2, p. 189–193, 2013.

GRISI, L; HENKER, L.C; CHRIST,R; PIVA, M.M; Schwertz ,C.I; LUCCA, N.J; BROLL, F; MEDEROS, D,S; MORI, A.M; MENDES, R.E. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal*, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, v. 57, n. 1–3, p. 109–119, 1995.

JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 4 ed, 1986. 1221p

JAIN, N. C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: *Lea & Febiger*, 1993, 417 p.

JONSSON, N.N.; BOCK, R.E.; JORGENSEN, W.K.; MORTON, J.M.; STEAR, M.J. Is endemic stability of tick-borne disease in cattle a useful concept? *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 3, p. 85–89, 2012.

JUNIOR, D. DA S. G. *Prevalência de anticorpos para agentes da Tristeza Parasitária Bovina, Trypanosoma vivax e Borrelia sp em bovinos do nordeste do estado do Pará, Brasil. Dissertação de Mestrado*. 74 pag. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J., BLOUIN, E.F, COETZEE, J.F, EWING S. A. E. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, v. 167, n. 2–4, p. 95–107, 2010.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. Carrapato, tristeza Parasitária e tripanossomose Dos Bovinos. *Embrapa - Cnpqc*, p. 157, 1998.

KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A.A.; MELÉNDEZ, R.D. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 4, p. 698–712, 2003.

KROLOW, R. P. *et al.* Babesia bovis: Imunidade colostrar, primoinfecção e resposta imune em bovinos naturalmente infectados, no Rio Grande do Sul. *Embrapa Pecuária Sul*, p. 4–5, 2002.

KUTTLER, K. L; BRITTO, C.F; RUAS, J.L; SANTOS, T.B; BERNE, M.E.A; SACCO, A.M.S; FARIAS, N.A. *Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: a review.*

*Journal of wildlife diseases*, v. 20, n. 1, p. 12–20, 1984.

ANDRADE, L DA S. Infecção por hemoparasitos e neospora caninum em fetos 19 bovinos de diferentes idades gestacionais oriundos de 20 abatedouro. *Dissertação de Doutorado*. 182 pag. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2021.

LEBLANC, S. Health in the transition period and reproductive performance. *Western Canadian Dairy Seminar*, v. 22, p. 97–110, 2010.

LIGNIÈRES, J. Bovine babesiosis. New investigations and observations on the multiplicity, the evolution and natural transmission of the parasites involved in the disease and on vaccination. *Archives de Parasitologie*, v. 7, p. 398–407, 1903.

LOMBARD, J; URIE,N; GARRY, F; GODDEN, S; QUIGLEY,J; EARLEYWINE, T; MCGUIRK,S; MOORE, D; BRANAN,M; CHAMORRO, M; SMITH, G; SHIVLEY, C; CATHERMAN, D; HAINES, D; HEINRICHS, A.J; JAMES, R; MASS, J; STERNER, K. Consensus recommendations on calf- and herd-level passive immunity in dairy calves in the United States. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 8, p. 7611–7624, 2020.

MADRUGA, C. R., AYCARDI, E., KESSLER, R. H., SCHENK, M. A. M., FIGUEIREDO, G. R., CURVO, J. B. E. Níveis de anticorpos anti-Babesia bigemina e Babesia bovis em bezerros da raça nelore, ibagé e cruzamentos de nelore. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 19, n. 9, p. 1163–1168, 1984.

MADRUGA, C. R., AYCARDI E., KESSLER R.H SCHENK, M.A.M, FIGUEIREDO, G.R; CURVO, J.B.E. Níveis de anticorpos anti-babesia bigemina e babesia bovis, em bezerros da raça nelore, ibage e cruzamernttos de nelore. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, p. 1163–1168, Brasília, 1984.

MADRUGA C.R, MARQUES A.P.C, ARAÚJO, F.R, M. MIGUITA, CARVALHO, C.M.E, ARAÚJO F.S., UMAKI, A.C.S., CROCCI,A.J E QUEIRÓZ R.A. Evaluation of an ELISA for

detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* v. 21, n. 2, p. 72–76, 2001.

MAHONEY, D; ROSS, D. Epizootical factor in the control of bovine babesiosis. *Australian Veterinary Journal*, v. 48, n. 1, p. 292–298, 1972.

MAHONEY, D. F. Bovine babesiosis: A study of factors concerned in transmission. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 63, n. 1, p. 1–14, 1969.

MALDONADO, J.; CONRADO A.; MEDINA, J. Evidencia molecular de transmisión transplacentaria de anaplasma marginale en becerros neonatos cebú de Venezuela. *Zootecnia Tropical*, v. 30, n. 1, p. 109–114, 2012.

MCCOSKER, P. J. The Global Importance of Babesiosis. New York, USA: *Academic Press*, 1981.

MENESES, R.M. Isolamento e caracterização molecular de anaplasma marginale de origem congênita e avaliação da virulência em bezerros experimentalmente infectados. *Dissertação de Mestrado*. 46 p. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2013.

MOREIRA, G.H.F.A. Avaliação clínica e laboratorial em bezerros holandeses primoinfectados experimentalmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Dissertação de Mestrado*. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). 2013.

NEITZ, W. Classification, transmission, and biology of piroplasms of domestic animals. *Annals New York Academy of Sciences*, p. 86 (56-111), 1956.

OLIVEIRA, M. C. DE S.; BILHASSI, T.B; GIGLIOTTI, R; IBELLI, A.M.G; JUNIOR, W.M; OLIVEIRA, H.N. Estudo da prevalência e do nível de infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Angus, Nelore e cruzados, criados em áreas endêmicas do Estado de São Paulo. *Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa*, n. January 2010, p. 1–59, 2014.

PEREIRA, F. T. V. C Braga, KC Burioli, JR Kfoury Jr, LJ Oliveira, PC Papa, AF Carvalho, CE Ambrosio, FW Bazer e MA Miglino. Transplacental transfer of iron in the water buffalo (*bubalus bubalis*): Uteroferrin and erythrophagocytosis. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, n. 5, p. 907–914, 2010.

PETER, A. T. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. *Theriogenology*, v. 80, n. 7, p. 693–705, 2013.

POHL, A. E., CABEZAS-CRUZ .A; RIBEIRO M.F.B; SILVEIRA, J.A.G; SILAGH C.; PFISTER K; PASSO, L.M.F. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 1, p. 129–135, 2013.

POTGIETER, F; RENSBURG, L. VAN. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. *Onderstepoort J Vet Res*, v. 54, p. 557- 560., 1987.

RIBEIRO, M. F. LIMA, J. D; GUIMARÃES, A. M; SCATAMBURLO, M. A; MARTINS, N. E. Transmissão vertical da anaplasmosse bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 47, p. 297–304, 1995.

RIBEIRO, M. F; LIMA, J; SALCEDO, J. H. Attempted transmission of *Anaplasma marginale* by infected *Boophilus microplus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 48, p. 397–402, 1996.

RIBEIRO, M. F. B; COSTA, J. O; TAFURI, W. L. Prenatal infection of calf with *Babesia bovis*: first autoctonous case in Brazil. *Arq. Bras. Vet. Zootec*, v. 46, n. 5, p. 519–526, 1994.

RIBEIRO, M. F. B; PASSOS, L. M. Tristeza Parasitária Bovina. *Cad. Tec. Vet. Zootec*, v. 39, p. 36–52, 2002.

RIET-CORREA, F. SCHILD, A.L; MENDEZ, M.DE.C; LEMOS, R.A.A. Doenças de

ruminantes e eqüinos. *Faculdade De Medicina Veterinária*. Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul. 426 p. segunda ed. São Paulo. Livraria. Varela, 2001.

RISTIC, M; LYKINS, J. D; MORRIS, H. R. Anaplasmosis: Oposonins and hemagglutinins in etiology of anemia. *Exp Parasitol*, v. 31, n. 1, p. 2–12, 1972.

ROMERO-SALAS, D. *et al.* Molecular and serological detection of Babesia bovis- and Babesia bigemina-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Veterinary Parasitology*, v. 217, p. 101–107, 2016.

SALABARRIA, F. F; PINO, R. Trasmisión vertical de Anaplasma marginale en bovinos afectados durante el periodo final de la gestación. *Rev. Cub. Ci. Vet*, p. 179–181, 1988.

SAMPAIO, I.B. M.A. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3 ed. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2010.

SANTAROSA, B. DANTAS, G.N; FERREIRA, D.O.L; ROCHA, N.S; GONÇALVES, R.C AMORIM, R,M; CHIACCHIO, S.B. Infecção neurológica por babesia bovis em bovino neonato relato de caso. *Veterinária e Zootecnia*, v. 20, n. 3, p. 447–452, 2013.

SANTOS, G. B. GOMES, IM.M;,. SILVEIRA, J.A.G; PIRES, L.C.S.R; AZEVEDO ,S. S; ANTONELLI, A.C; RIBEIRO, M.F.B E HORTA, M.C. Tristeza parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 37, n. 1, p. 1–7, 2017.

SANTOS, L. R. DOS; GASPAR, E.B; BENAVIDE, M.V TRENTIN G. Tristeza Parasitária Bovina - Medidas de controle atuais. *In: Empraba Gado de Corte*. Brasília-DF - Brasil.. p. 85–97.

SARTORELLI, P; PALTRINIERI, S; AGNES, F. Non-specific Immunity and Ketone Bodies. I: In Vitro Studies on Chemotaxis and Phagocytosis in Ovine Neutrophils. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, v. 46, n. 10, p. 613–619, 1999.

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. *Veterinary Hematology*. LEA e Febiger, Philadelphia. 807p., 1975.

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

SCOLES, G.A.; BROCE, A.B.; LYSUK, T.J.; PALMER, G.H. 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, n. 4, p. 668-675, 2005.

SILVA, J. B. DA; CORDEIRO, M.D; CASTRO, G.N DE S; SANTOS, P.N DOS; FONSECA, A.R; REIS, A.B; SILVA, N.S; BARBOSA, J.D. Ocorrência sorológica de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bovinos e bubalinos no estado do Pará, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 5, p. 2495–2500, 2014.

SILVA, J. B. DA; FONSECA, A. H. DA. Analysis of the risk factors related to the immune humoral anti-*Anaplasma marginale* in dairy cattle. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 2, p. 777–784, 2013.

SILVA, J. B. DA; NUNES, G.; CASTRO, D. S. Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd cattle . *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 35, núm. 4, 2014, pp. 2491-2500. Universidade Estadual de Londrina Londrina, Brasil, 2014.

SILVA, M. DA G. Q. Avaliação da taxa de infecção de teleóginas de *Boophilus microplus* (canestrini, 1887) por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em área endêmica de Minas Gerais, Brasil. *Tese de Dissertação*. Universidade Federal de Minas Gerais p. 104, 2003.

SILVEIRA, J. A. G. *Ocorrência de hemoparasitos e ectoparasitos em veado-catingueiro (Mazama gouazoubira Fischer, 1814), veado-campeiro (Ozotocerus bezoarticus Linnaeus, 1758) e cervo-do-pantanal (Blastocerus dichotomus Illiger, 1815): utilização de métodos*

*parasitológicos e moleculares*. 2012. 112p. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SMITH, T.; KILBORNE, F. L. Investigations into the nature, causation and prevention of Southern cattle fever. In *Ninth Annual Report of the Bureau of Animal Industry for the Year 1892*, p. 177–304, 1893.

SOUZA, F. DE A. L. BRAGA, JF.V; PIRES, L.V, CARVALHO, CJS DE; COSTA, E.A; RIBEIRO, M.F.B; SANTOS, R.L;. SILVA S. M.M.S. Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 33, n. 9, p. 1057–1061, 2013.

STER, C.; LOISELLE, M. C.; LACASSE, P. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 2, p. 708–717, 2012.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. *Parasitologia Veterinária*. quarta edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasi. 2017.

THEILER, A. The Marginal Points in the Literature on Piroplasmiasis. *Report of the Government on Veterinary Bacteriologist of the Transvaal*, n. Part 2, p. 30–39, 1910.

TIZARD, I. . *Veterinary immunology*. 9. ed. 551p. St. Louis: Elsevier /Saunders, 2013.

TODD, C. G; MCGEE, M; TIERNAN, K; CROSSON, P; RIORDAN, E.O; MCCLURE, J; LORENZ, I; EARLEY, B. An observational study on passive immunity in Irish suckler beef and dairy calves: Tests for failure of passive transfer of immunity and associations with health and performance. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 159, p. 182–195, 2018.

TRINDADE, H. I.; SILVA, G.R.DE ARAUJO; TEIXEIRA, M.C.A; SOUSA, M.G; MACHADO, R.Z; FREITAS, F.L DA C; ALMEIDA, K. DE SOUSA. Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of

Araguaína, State of Tocantins, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 3, p. 169–173, 2010.

VESPASIANO, L. C. Dinâmica Da Tristeza Parasitária Bovina Em Um Sistema Intensivo De Produção De Leite Em Minas Gerais. *Dissertação de Mestrado*. 55p. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais. Brasil, 2016.

VIDOTTO, O. Complexo Carrapato -Tristeza Parasitária e outras parasitoses de bovinos. *Centro de Ciências Agrárias*. Universidade Estadual de Londrina. January 2005, p. 1–10, 2002.

VIEIRA, L. L. Prevalência e dinâmica de infecções por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos na região serrana de Santa Catarina. *Dissertação de Mestrado*. 60p. Universidade Federal de Santana Catarina - Lages, 2014.

WANER, T.; MAHAN, S.; KELLY, P.; et al. Rickettsiales. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J. G. et al. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4.ed. Wileyblackwell., 2010. c.31, p.589-621.

WILM, J.; COSTA, J.H.C; NEAVE, H.; WEARY D.M; VON KEYSERLINGK, M.A.G. Technical note: Serum total protein and immunoglobulin G concentrations in neonatal dairy calves over the first 10 days of age. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 7, p. 6430–6436, 2018.

YERUHAM, I.; AVIDAR, Y; AROCH. I; HADANI. A. Intra-uterine infection with *Babesia bovis* in a 2-day-old calf. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*, v. 50, n. 2, p. 60–62, 2003.

ZAUGG, J. .; KUTTLER, K. . Bovine anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostrum antibodies. *Am J Vet Res*, v. 45, n. 3, p. 440–443, 1984.

## ANEXOS

Anexo 1- Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo da Prevalência da Tristeza Parasitária e Tripanossomose Bovina em diferentes categorias de bovinos de corte em sistema de confinamento.", protocolo do CEUA: 255/2021 sob a responsabilidade de Tiago Facury Moreira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 24/01/2022.

Vigência da Autorização	24/01/2022 a 23/01/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Bovino / F1 Aberdeen Angus / Nelore
Nº de animais	133
Peso/Idade	280kg / 10(meses)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Gado de corte - São João da Ponte
*Espécie/linhagem	Bovino / 3/4 Aberdeen Angus / Nelore
Nº de animais	133
Peso/Idade	36kg / 1(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda Gado de corte - São João da Ponte
*Espécie/linhagem	Bovino / 3/4 Aberdeen Angus / Nelore
Nº de animais	133

Peso/Idade	150kg / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda Gado de corte - São João da Ponte
*Espécie/linhagem	Bovino / 3/4 Aberdeen Angus / Nelore
Nº de animais	133
Peso/Idade	450kg / 20(meses)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda Gado de corte - São João da Ponte
*Espécie/linhagem	Bovino / Aberdeen Angus / Nelore
Nº de animais	133
Peso/Idade	550kg / 20(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Fazenda Gado de corte - São João da Ponte

**Considerações posteriores:**

24/01/2022	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia
------------	--

	24/01/2022. Validade: 24/01/2022 à 23/01/2027.
--	--

Belo Horizonte, 30/06/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Fonte: Sistema de solicitações da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA  
 (<https://www.ufmg.br/bioetica/ceua/formularios/>)