

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

**DINÂMICA DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA EM UM SISTEMA
INTENSIVO DE PRODUÇÃO DE LEITE EM MINAS GERAIS**

LETÍCIA CAMÊLO VESPASIANO

Belo Horizonte

2016

Letícia Camêlo Vespasiano

**DINÂMICA DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA EM UM SISTEMA
INTENSIVO DE PRODUÇÃO DE LEITE EM MINAS GERAIS**

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: Elias Jorge Facury Filho

Co-orientadora: Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG

2016

V579d Vespasiano, Leticia Camêlo, 1989-
Dinâmica da tristeza parasitária bovina em um sistema intensivo de produção de leite em Minas Gerais / Leticia Camêlo Vespasiano. – 2016.
55 p. : il.

Orientador: Elias Jorge Facury Filho
Co-orientadora: Júlia Angélica Gonçalves da Silveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Anaplasmosose – Teses. 3. Carrapato de bovino – Teses.
4. Babesiose em bovino – Teses. I. Facury Filho, Elias Jorge. II. Silveira, Júlia Angélica
Gonçalves da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.208 969 68



FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA CAMÊLO VESPASIANO

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

Aprovada em 26 de Janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Elias Jorge Facury Filho
Presidente - Orientador

Prof.ª Júlia Angélica Gonçalves da Silveira
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Prof. Antônio Último de Carvalho
Escola de Veterinária - UFMG

Prof.ª. Camila de Vargas e Bastos
Centro Universitário de Belo Horizonte - UNI-BH

**Dedico aos animais, razão deste e
de todo o meu trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por está presente nos momentos em que mais precisei e pelo dom de trabalhar com seres tão fantásticos.

Aos meus pais, Silvio e Maria Madalena, e minha irmã Júlia por todo amor, oportunidades, cuidado e por apoiarem todas as minhas decisões. Esta conquista também é de vocês!

Ao Leandro por todo apoio, carinho e por ser minha maior companhia durante toda a cansativa fase de escrita.

Às famílias Camêlo e Vespasiano por todo o incentivo.

Aos professores Elias Jorge Facury Filho e Antônio Último de Carvalho pelo exemplo, amizade, paciência, oportunidades, ensinamentos e confiança depositada em mim. Obrigada pelas várias vezes que me fizeram acreditar na minha capacidade!

À professora Júlia Angélica Gonçalves da Silveira por todo ensinamento, amizade, disponibilidade e apoio prestado durante todo o mestrado.

À família Ruminantes pela amizade, companheirismo e experiências trocadas.

Ao Filipe Lucas Melo Mendonça por toda disposição em ajudar, desde a fase das coletas até as análises estatísticas.

Aos professores Múcio Flávio Barbosa Ribeiro e Élide Rabelo por abrirem as portas dos laboratórios, dando todo o suporte que precisei.

À Bruna Torres Silvestre pelo apoio e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

À Fazenda São João por disponibilizarem os animais para o experimento.

Aos amigos Michelle, Victor, Renatinha, Tchela, Mayara, Raquelzinha, Bob e Marina pela amizade, compartilhamentos de desesperos e por entenderem os meus momentos de ausência.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e à todos os professores.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos animais por todo o aprendizado, em especial aos que participaram deste experimento, mesmo que involuntariamente, em favor da melhora das condições de outros animais que possam se beneficiar dos resultados deste estudo.

**“Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe?
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Nada sei.”**

Almir Sater e Renato Teixeira

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Geral.....	17
2.2. Específicos.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. Histórico	18
3.2. Tristeza Parasitária Bovina	18
3.2.1. <i>Anaplasma marginale</i>	18
3.2.2. <i>Babesia bovis</i> e <i>B. bigemina</i>	21
3.3. Epidemiologia e dinâmica da infecção.....	22
3.4. Resistência aos agentes.....	24
3.5. Diversidade genética do <i>Anaplasma marginale</i>	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Local e período das atividades de campo	27
4.2. Aprovação pela comissão de ética	27
4.3. Grupos de animais.....	27
4.4. Coleta de sangue	29
4.5. Locais.....	30
4.6. Esfregaço sanguíneo.....	30
4.7. Volume globular	30
4.8. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	30
4.9. Análises moleculares.....	31
4.9.1. Extração de DNA.....	31
4.9.2. Amplificação do DNA.....	31
4.9.3. <i>Babesia bigemina</i>	31

4.9.4.	<i>Babesia bovis</i>	32
4.9.5.	<i>Anaplasma marginale</i>	33
4.9.6.	Eletroforese em gel de agarose.....	33
4.9.7.	Análises estatísticas.....	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1.	Diagnóstico etiológico da TPB por esfregaço sanguíneo	35
5.2.	Volume globular	36
5.3.	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	38
5.3.1.	Transferência de imunidade passiva	41
5.4.	Análises moleculares.....	41
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
7.	CONCLUSÕES.....	48
8.	REFERÊNCIAS.....	49
9.	ANEXOS	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos grupos, número e idade média dos animais de cada categoria.	28
Tabela 2: Sequência de iniciadores e produto obtido para diagnóstico de <i>B. bigemina</i>	31
Tabela 3: Condição para PCR de <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i> e <i>A. marginale</i> (<i>msp4</i>).	32
Tabela 4: Programa utilizado para realização do PCR para amplificação de <i>B. bigemina</i> ..	32
Tabela 5: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de <i>B. bovis</i>	32
Tabela 6: Programa utilizado para realização do <i>n</i> PCR para amplificação de <i>B. bovis</i>	32
Tabela 7: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de <i>A. marginale</i> .	33
Tabela 8: Programa utilizado para realização do <i>n</i> PCR para amplificação de <i>A. marginale</i>	33
Tabela 9: Valores médios e desvio padrão de parasitemia no esfregaço sanguíneo, de <i>A. marginale</i> , <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> , em bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diferentes categorias: G1 - aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.	35
Tabela 10: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diferentes categorias, positivas no esfregaço sanguíneo e PCR para <i>A. marginale</i> , <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> . G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.	36
Tabela 11: Média do VG e frequência de animais com VG < 24%, em bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diferentes categorias: G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.	37
Tabela 12: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diferentes categorias (1 a 7), com sorologia positiva para anticorpos IgG anti- <i>A. marginale</i> e representação estatística de comparação entre categorias.	38
Tabela 13: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diversas categorias (1 a 7), com sorologia positiva para anticorpos IgG anti- <i>B. bovis</i> e representação estatística de comparação entre categorias.	39
Tabela 14: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diversas categorias (1 a 7), com sorologia positiva para anticorpos IgG anti- <i>B. bigemina</i> e representação estatística de comparação entre categorias.	40

Tabela 15: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diversas categorias (1 a 7), positivas na *n*PCR para *A. marginale* e representação estatística de comparação entre categorias..... 42

Tabela 16: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diversas categorias de idade (1 a 7), positivas na *n*PCR para *B. bovis* e representação estatística de comparação entre categorias. 44

Tabela 17: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diversas categorias (1 a 7), positivas na PCR para *B. bigemina* e representação estatística de comparação entre categorias..... 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do <i>A. marginale</i>	19
Figura 2: Ciclo biológico da <i>Babesia</i> spp.....	21
Figura 3: Animais e ambiente da fase de aleitamento (A), do grupo pós-casinha (B), da fase de recria (C) e do grupo vacas secas (D).....	29
Figura 4: Frequência de bezerras e vacas, em sistema de criação intensivo, soropositivas para <i>A. marginale</i> , <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> por categoria avaliada: G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas..	41
Figura 5: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, soropositivas na RIFI e positivas na <i>nPCR</i> para <i>A. marginale</i> em cada categoria avaliada: G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.	43
Figura 6: Frequência de bezerras e vacas, em sistema de criação intensivo, soropositivas na RIFI e positivas na <i>nPCR</i> para <i>Babesia bovis</i> em cada categoria avaliada: G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.	44
Figura 7: Frequência de bezerras e vacas, em sistema de criação intensivo, soropositivas na RIFI e positivas na PCR para <i>Babesia bigemina</i> em cada categoria avaliada: G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = Grau Celcius

µL = Microlitro

ATP = adenosina trifosfato

cELISA = Ensaio imunabsorvente ligado a enzimas competitivo

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

G = Grupo

ICB = Instituto de Ciências Biológicas

IDE8 = Linhagem de células embrionárias de *Ixodes scapularis*

IgG = Imunoglobulina da classe G

Km = Quilômetro

mL = Mililitro

mM = milimolar

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

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)

RIFI = Reação de imunofluorescência indireta

RNA = Ácido ribonucleico

TAE = Tampão Tris-Acetato-EDTA

TPB = Tristeza parasitária bovina

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

VG = Volume globular, hematócrito

RESUMO

O complexo tristeza parasitária bovina é responsável por grandes prejuízos à pecuária brasileira e o conhecimento de sua epidemiologia tem se tornado cada vez mais necessário. Objetivou-se com este estudo conhecer a dinâmica da infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina* em bezerras da raça Holandês em um sistema de criação intensivo. O experimento foi conduzido em uma fazenda localizada no município de Inhaúma – Minas Gerais, que possui um histórico de altas taxas de morbidade e mortalidade de animais na fase de recria por anaplasmose e babesiose. Foram utilizadas 224 fêmeas bovinas, divididas em sete grupos. A avaliação foi feita através de esfregaço sanguíneo, volume globular, RIFI e PCR. Os animais apresentaram um período de maior susceptibilidade a anaplasmose e a babesiose por *B. bigemina* durante a fase de recria. Já para *B. bovis* a queda da imunidade passiva ocorreu simultaneamente com o desenvolvimento da imunidade ativa. Foram detectados alguns casos de transmissão transplacentária de *A. marginale* e *B. bovis*. As infecções por *Babesia* iniciaram na fase de pós-casinha, período em que os animais passaram a ter contato com carrapatos. As infecções por *A. marginale* tiveram predomínio durante a fase de recria. A queda do VG e o maior número de animais anêmicos ocorreram na fase de maior concentração de quadros clínicos de anaplasmose e babesiose. Os resultados mostraram que os animais jovens desta fazenda apresentam susceptibilidade para *A. marginale* e *B. bigemina*. A situação para *B. bovis* é estável, podendo ocorrer alguns casos esporádicos.

Palavras-chave: Anaplasmose; babesiose; *Anaplasma marginale*; *Babesia bovis*; *Babesia bigemina*; bovinos; imunidade.

ABSTRACT

The tick fever complex is responsible for major losses to the Brazilian livestock and knowledge of its epidemiology has become increasingly necessary. The aim of this study was to know the dynamics of infection by *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *B. bigemina* in Holstein calves in an intensive farming system. The experiment was conducted on a farm in the municipality of Inhaúma - Minas Gerais, which has a history of high rates of morbidity and mortality of animals in the growing phase for anaplasmosis and babesiosis. 224 animals were divided into seven groups were used. The evaluation was done by blood smear, packed cell volume, IFAT and PCR. The animals showed a period of increased susceptibility to anaplasmosis and babesiosis by *B. bigemina* during the growing phase. As for *B. bovis* drop of passive immunity occurred simultaneously with the development of active immunity. Were detected some cases of transplacental transmission of *A. marginale* and *B. bovis*. *Babesia* infections began in the post-house phase, during which the animals began to have contact with ticks. Infections with *A. marginale* had predominated during the growing phase. The fall of the packed cell volume and the largest number of anemic animals occurred in the major phase concentration of clinical cases of anaplasmosis and babesiosis. The results showed that young animals in this farm have susceptibility to *A. marginale* and *B. bigemina*. The situation for *B. bovis* is stable, and there may be some sporadic cases.

Keywords: Anaplasmosis; babesiosis; *Anaplasma marginale*; *Babesia bovis*; *Babesia bigemina*; cattle; immunity.

1. INTRODUÇÃO

As doenças do complexo tristeza parasitária bovina ocorrem em todo o Brasil e são responsáveis por grandes prejuízos à pecuária, pois apresentam alta frequência, levam à elevada mortalidade, diminuição do desempenho, aborto, quedas na produção de leite e carne, gastos com medicamentos. Entre estas doenças, a anaplasmose é a de maior frequência. Acredita-se que o impacto econômico no Brasil seja maior que o causado pela TPB na Austrália e pela anaplasmose nos Estados Unidos (RIBEIRO, 1979; MADRUGA *et al.*, 1987; BOCK *et al.*, 2004; BENAVIDES *et al.*, 2007).

Os principais sinais clínicos da TPB são apatia, apetite diminuído ou ausente, queda na produção de leite, desidratação, emagrecimento, palidez das mucosas, fraqueza, pelos secos, arrepiados e sem brilho, estase gastrointestinal, taquicardia, hipertermia, icterícia, dispneia e hemoglobinúria (GONÇALVES *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2015).

O período de incubação da *Babesia* pode variar de sete a 14 dias e do *Anaplasma marginale* de 21 a 35 dias. Bezerros jovens são mais resistentes à babesiose, com predomínio da forma subclínica da doença (MADRUGA *et al.*, 1984; KESSLER e SCHENK, 1998).

Devido a importância da TPB torna-se necessário o conhecimento da epidemiologia da anaplasmose e da babesiose na área a ser trabalhada, pois pequenas alterações, como no manejo dos animais e climáticas podem provocar mudanças na dinâmica da infecção.

Mesmo com a presença de vetores em grande parte do Brasil, o que permite a infecção de animais jovens nos primeiros meses de vida, ainda verifica-se a ocorrência de babesiose e anaplasmose em bezerros influenciada por diversos outros fatores epidemiológicos (MADRUGA *et al.*, 1987). Assim, mesmo em regiões consideradas endêmicas para estas enfermidades, verifica-se alto número de casos clínicos e alta mortalidade, exigindo cada vez mais a intensificação do conhecimento da epidemiologia da TPB nas propriedades e investimentos no monitoramento e controle.

Estudos epidemiológicos sobre a TPB podem auxiliar no planejamento de medidas de controle e nas estratégias de monitoramento, porém ainda são escassos no Brasil. Além disso, a pecuária de leite experimenta intensificação acentuada nas duas últimas décadas, determinando mudanças nos sistemas de produção que podem estar contribuindo para alterações nos padrões de ocorrência da TPB. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que possam elucidar o comportamento da TPB nos variados sistemas de produção de leite adotados no Brasil, para auxiliar no desenvolvimento de programas de controle dessas enfermidades.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Conhecer a dinâmica da infecção por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* em bezerras da raça Holandês em sistema de criação intensivo, utilizando como parâmetros a infecção por estes agentes (presença do parasito pela PCR e quantificação por esfregaço sanguíneo), alterações de hematócrito e comportamento da imunidade humoral.

2.2. Específicos

- Avaliar a dinâmica de anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em bezerras de diversas faixas etárias;
- Avaliar em que período ocorrem as primoinfecções por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* nas bezerras acompanhadas através da PCR e esfregaço sanguíneo;
- Avaliar através da RIFI (anticorpos IgG) a imunidade das vacas, a transferência de imunidade passiva específica para anaplamose e babesiose e o comportamento da resposta imune para estes agentes nas bezerras;
- Avaliar as alterações de hematócrito ocorridas nas diversas faixas etárias e sua relação com a TPB;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Histórico

Na Romênia em 1888, Babes descreveu um microrganismo intraeritrocitário em bovinos que apresentavam hemoglobinúria, que foi denominado *Haematococcus bovis* (UILENBERG, 2006). De 1889 a 1893, Theobald Smith e Frederick L. Kilbourne conduziram experimentos que demonstraram a participação de carrapatos como vetores de microrganismos em bovinos. Eles identificaram o patógeno da Febre do Texas, um protozoário intraeritrocitário que Smith nomeou *Pyrosoma bigeminum* (ASSADIAN e STANEK, 2002; UILENBERG, 2006). Em 1893, Starcovici os classificaram no gênero *Babesia* e nomeou-os *B. bovis* e *B. bigemina* respectivamente (UILENBERG, 2006). Já *A. marginale* foi descrito em 1910 por Sir Arnold Theiler como pontos marginais em eritrócitos de bovinos doentes (KOCAN *et al.*, 2010).

3.2. Tristeza Parasitária Bovina

Tristeza parasitária bovina é um complexo de doenças causadas principalmente por protozoários e rickettsias, dos gêneros *Babesia* e *Anaplasma* respectivamente, que causam grandes perdas econômicas à pecuária brasileira. A anaplasmoze bovina é causada por uma rickettsia intraeritrocitária, e a principal espécie envolvida no Brasil é *A. marginale*. A babesiose é causada por protozoários intraeritrocitários, e as espécies que acometem os bovinos no Brasil são a *B. bovis* e a *B. bigemina* (KESSLER e SCHENK, 1998).

3.2.1. *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale é uma rickettsia intracelular obrigatória, classificada na ordem Rickettsiales e na família Anaplasmataceae (DUMLER *et al.*, 2001).

Eritrócitos infectados são ingeridos por carrapatos ao se alimentarem de sangue de um hospedeiro portador. As primeiras células do carrapato a serem infectadas por *A. marginale* são as do intestino. Ao se alimentarem pela segunda vez, muitos outros tecidos são infectados, inclusive as glândulas salivares, que a partir delas a rickettsia é transmitida aos bovinos. As formas reticuladas e densas são encontradas em células de carrapatos. Em primeiro lugar aparecem as formas reticuladas, que é a fase vegetativa que divide através de divisão binária. A forma reticulada muda para a forma densa, forma infecciosa que pode sobreviver extracelularmente (Figura 1). Ao ser inoculado no bovino, os corpúsculos iniciais aderem na superfície da hemácia, por invaginação (rofeocitose) da membrana citoplasmática invade os eritrócitos e replica por fissão binária dentro do vacúolo parasitóforo, formando um corpo de inclusão contendo quatro a oito corpúsculos iniciais. Sem rompimento da membrana, através de rofeocitose reversa, os corpos iniciais saem das hemácias e penetram outros eritrócitos (revisado por KESSLER e SCHENK, 1998; revisado por RIBEIRO e PASSOS, 2002; KOCAN *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2014).

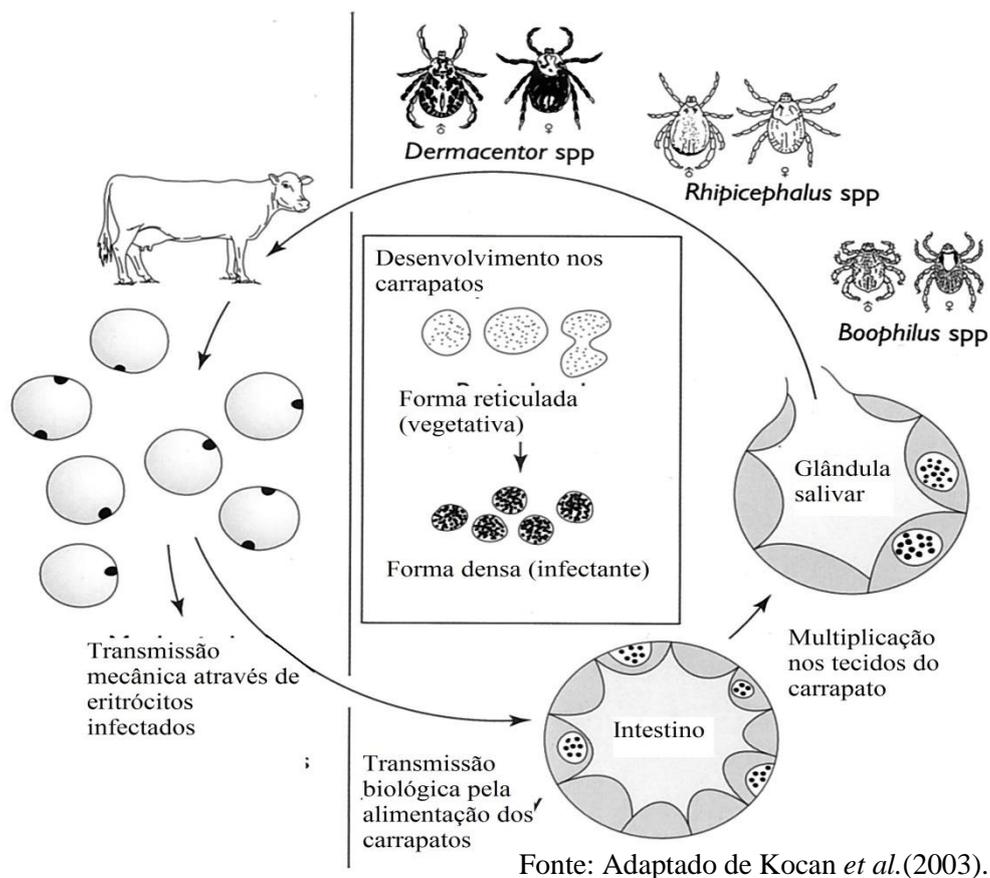


Figura 1: Ciclo biológico do *A. marginale*.

Anaplasma marginale é transmitido biologicamente no Brasil por carrapatos *Rhipicephalus microplus* e mecanicamente por moscas hematófagas ou por fômites contaminados com sangue infectado (KOCAN *et al.*, 2010). Quanto maior a proximidade dos animais, mais facilmente ocorre a transmissão mecânica por moscas hematófagas, já que a medida em que a alimentação do vetor é interrompida, ele passa a se alimentar do sangue de outro animal, podendo assim transmitir *A. marginale* de um bovino infectado para um não infectado (SCOLES *et al.*, 2005). Os tabanídeos compõem um grupo de insetos associado à transmissão mecânica de patógenos, já que ao se alimentarem, causam dor aos animais, tendo a alimentação interrompida pelo hospedeiro, dispersando então para outro animal (FOIL, 1989). Scoles *et al.* (2005) demonstraram que a transmissão biológica de *A. marginale* por carrapatos é mais eficiente que a transmissão mecânica por *Stomoxys calcitrans*, porém não descarta a importância do papel desta na epidemiologia da anaplasmoze.

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.*, 2003; KOCAN *et al.*, 2010). Há também relatos de transmissão congênita, como o descrito por Passos *et al.* (1984), em que encontraram eritrócitos parasitados por *A. marginale* em esfregaço sanguíneo de um bezerro de dois dias de idade. Meneses (2013) em um estudo realizado com

animais da mesma fazenda deste experimento, identificou através de *n*PCR 10% de animais com transmissão transplacentária de *A. marginale*. Estes bezerros foram acompanhados por 70 dias e não manifestaram sinais clínicos de anaplasmose. Apesar de apresentarem resultados positivos na *n*PCR, nos esfregaços sanguíneos eram negativos.

Os períodos de patência e convalescência na anaplasmose são longos, durando em média 25 dias cada um. O período de patência consiste na fase em que inicia a queda do VG até o momento de VG mais baixo. Já o período de convalescência trata-se da fase onde o animal se recupera gradualmente da anemia e consiste no momento de VG mais baixo até o dia que retorna aos limites fisiológicos (COELHO, 2007).

Os sinais clínicos da anaplasmose são anemia, icterícia, febre, fraqueza e depressão. A intensidade e duração da doença são dependentes de diversos fatores: animais mais velhos são mais susceptíveis a forma severa da doença; animais com consumo de energia reduzido apresentam doença clínica menos severa; animais *Bos indicus* são mais resistentes aos carrapatos que animais *Bos taurus* (WANER *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2011).

A anemia ocorre devido à excessiva eritrofagocitose, desencadeada pelos danos que o parasita causa nos eritrócitos e pelo efeito sensibilizante de auto anticorpos anti eritrocitários nos eritrócitos infectados e não infectados. Os eritrócitos danificados e/ou sensibilizados são removidos pelo sistema monocítico-fagocitário. Outros fatores não imunes que podem desempenhar um papel importante na anemia são o fator estimulante de eritrofagocitose inespecífica, atividade da fosfofrutoquinase alterada, e baixos níveis de adenosina trifosfato (ATP) nos eritrócitos, resultando em perturbações funcionais e alterações na proteína e componentes glicoproteicos da membrana de eritrócitos infectados (WANER *et al.*, 2011).

Os bezerros são menos susceptíveis a infecção por *A. marginale* e, quando infectados, menos predispostos a forma clínica da doença e desenvolvem infecções persistentes e imunidade ao longo da vida. Este fenômeno não é completamente compreendido, mas bezerros esplenectomizados são totalmente susceptíveis à infecção e os quadros clínicos são mais graves que os observados em animais mais velhos (KOCAN *et al.*, 2003). Mendonça (2015) através de inoculação de cepas de *A. marginale* em bezerras com anticorpos colostrais, demonstrou que dos animais que tinham anticorpos passivos, apenas 30,8% não se infectaram na primeira inoculação e 15,4% após a segunda, indicando que animais com anticorpos de origem materna contra *A. marginale* não apresentam resistência à infecção. Isto indica que a imunidade contra *A. marginale* não é apenas humoral, como demonstrou Lasmar *et al.* (2012), que através de uma vacina morta cultivada em células IDE8 conseguiu a soroconversão em bezerros, porém esta resposta não foi capaz de prevenir a anaplasmose após desafio, já que por se tratar de uma vacina morta, não foi capaz de estimular o desenvolvimento da resposta celular.

Um estudo realizado por Bock *et al.* (1997) sugere maior atenção aos casos de anaplasmose em rebanhos mestiços e de *Bos indicus* em áreas extensivas, pois existe a possibilidade dela ser uma significativa causa de perdas econômicas, devido a dificuldade ou baixa frequência de diagnóstico.

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

Babesia bovis e *B. bigemina* são protozoários da ordem Piroplasmida (GUGLIELMONE, 1995).

Os esporozoítos penetram nos eritrócitos ao serem inoculados no bovino. No interior do eritrócito ele sofre modificações e transforma-se em trofozoíto, forma capaz de se dividir através de fissão binária. Após a divisão, passam a se chamar merozoítos, que são aptos a saírem dos eritrócitos, provocando assim a ruptura da célula sanguínea. Algumas formas evoluem para as formas sexuadas (gametócitos). Ao ingerir eritrócitos parasitados pelos gametócitos, o carrapato se infecta. No intestino do carrapato surgem os corpos estrelados (gametas masculino e feminino). Os zigotos surgem da fusão dos gametas, penetram as células e sofrem divisão por esquizogonia, originando esporocinetos, que depois são liberados na hemolinfa, realizando outras divisões em diversos órgãos, inclusive no ovário. Assim penetram e se multiplicam nos óvulos, ocorrendo a transmissão transovariana (Figura 2). *Babesia* se multiplica nas células do sistema digestivo das larvas infectadas, migrando para as glândulas salivares, multiplicando e dando origem aos esporozoítos (formas infectantes), que serão inoculadas nos bovinos, no caso de *B. bovis*. Já no caso de *B. bigemina*, as formas infectantes só serão formadas em ninfas e carrapatos adultos (PURNELL, 1981; KESSLER e SCHENK, 1998).

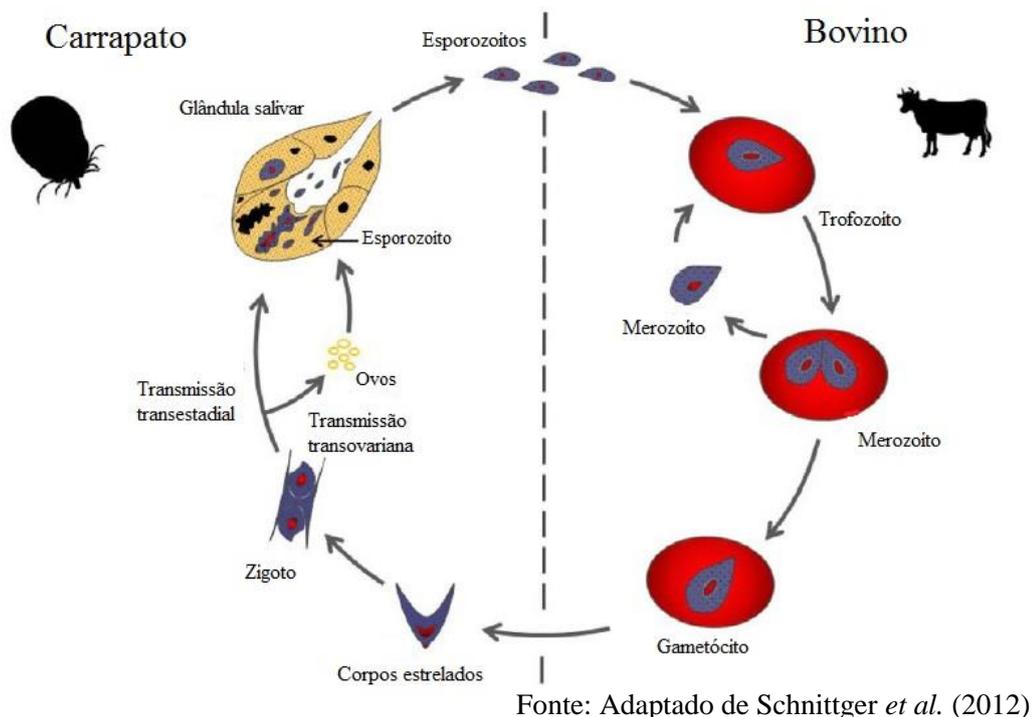


Figura 2: Ciclo biológico da *Babesia* spp.

A transmissão da *Babesia* ocorre biologicamente através do carrapato *R. microplus*. Pode ocorrer também transmissão mecânica, via transfusão sanguínea (KESSLER e SCHENK, 1998).

Bracarense *et al.* (2001), relata um caso de transmissão congênita de *B. bovis* em um bezerro natimorto, ocorrido no Paraná. A vaca apresentou título de anticorpos de 1:80 para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*. Outros agentes foram investigados, mas com resultados negativos. Na necropsia do bezerro, foram coletados tecidos do animal e verificou-se em clap cerebral a presença de hemácias parasitadas por *B. bovis* nos vasos sanguíneos.

O quadro clínico causado por *B. bigemina* é caracterizado por febre, hemoglobinúria e anemia aguda. Já os casos de *B. bovis* são mais severos, podendo ser fatais, apresentando além de febre alta e hemoglobinúria, sintomas nervosos como incoordenação motora, salivação anormal, ranger de dentes e letargia (PURNELL, 1981).

3.3. Epidemiologia e dinâmica da infecção

Ainda são necessários estudos sistemáticos das hemoparasitoses, não possuindo embasamentos epidemiológicos para as diversas áreas do Brasil. Para a formulação de programas de controle e erradicação, faz-se necessário o entendimento de indicadores epidemiológicos, como a difusão de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, e a prevalência da infecção na área a ser implementado, já que em uma mesma região podem ocorrer diferentes situações epidemiológicas (PATARROYO *et al.*, 1987; MADRUGA *et al.*, 1987).

A anaplasmose e a babesiose são doenças hemolíticas e febris e estão relacionadas com a distribuição geográfica do carrapato *R. microplus*, compreendida entre as latitudes 32° Norte e 32° Sul, que nas Américas engloba o México, América Central e quase toda a América do Sul, ficando de fora da área de risco o município de Santa Vitória do Palmar no Rio Grande do Sul, Uruguai e sul da Argentina. Algumas regiões da Argentina e Uruguai são livres do *R. microplus* devido à campanhas de erradicação do carrapato. No norte da América Central o *R. annulatus* também é responsável pela transmissão de *Babesia* spp. aos bovinos (GUGLIELMONE, 1995; VIDOTTO, 2005).

Alguns autores classificam as regiões geográficas do ponto de vista epidemiológico, como áreas de estabilidade ou instabilidade enzoótica. Nas áreas de estabilidade a infecção dos bezerros é precoce, antes da perda da resistência à forma clínica das doenças, que ocorre entre seis e nove meses de idade. Essa condição é possível quando há no ambiente uma taxa de vetores infectados capazes de infectar a maioria dos animais nesta idade preconizada, resultando em pelo menos 75% dos bovinos infectados e imunizados antes da idade em que se encontram susceptíveis. Porém, em regiões onde os animais se infectam tardiamente, observa-se um maior número de quadros clínicos, sendo classificadas como áreas de instabilidade enzoótica (MAHONEY E ROSS, 1972; VIEIRA, 2002).

Porém, atualmente, esta classificação vem sendo questionada, como Jonsson *et al.* (2012), que sugerem não ser apropriado o uso desse termo com base em uma única avaliação transversal

em estudos sorológicos e que os limiares propostos por Mahoney não deveriam ser utilizados em sistemas sem dados específicos de doença clínica, genótipo dos hospedeiros, espécies de patógenos e carrapatos, tendo em vista a grande variação na patogenicidade. Este questionamento ocorre também porque os dados utilizados neste estudo são específicos para *R. microplus* infectados por *B. bovis* e *B. bigemina*, infestando bovinos *Bos taurus* e mestiços, no estado de Queensland, Austrália, não podendo ser aplicado em infecções por diversos patógenos, em que as contribuições relativas da imunidade inata, imunidade passiva e dinâmica da infecção para ocorrência da doença não são tão claras, ou para doenças em que a imunidade inata domina a imunidade adquirida. Portanto, segundo Jonsson *et al.* (2012), os limiares propostos por Mahoney não poderiam ser utilizados efetivamente nem no sistema no qual foi concebido, já que variações de manejo e climáticas de ano para ano podem alterar os parâmetros.

O Brasil é classificado como área enzoótica para TPB, porém as variações edafoclimáticas em algumas regiões desfavorecem o desenvolvimento do *R. microplus* em alguns períodos do ano, sendo consideradas regiões de instabilidade enzoótica. As principais perdas econômicas ocorrem nessas áreas ou quando animais de áreas de instabilidade ou de locais livres são transferidos para áreas de estabilidade (SANTOS *et al.*, 2001).

Costa *et al.* (2011) descreveram a ocorrência de 24 surtos de TPB no sertão paraibano, sendo mais frequentes os casos de anaplasiose. Os autores justificam essa maior frequência pela presença de tabanídeos nas propriedades durante o período chuvoso, o que potencializaria a ocorrência de novos casos. Os adultos foram a maioria dos animais afetados, pois devido às condições climáticas da região, não há presença de carrapatos durante alguns períodos do ano, fazendo com que não ocorra a transmissão contínua dos agentes, principalmente em animais jovens, resultando em um inadequado desenvolvimento da imunidade específica, tornando assim adultos sensíveis.

Melo *et al.* (2001) em um estudo realizado em duas fazendas localizadas na região Metalúrgica de Minas Gerais determinaram a dinâmica da infecção natural por *A. marginale*. Na fazenda B os animais eram expostos aos vetores precocemente, o que resultou em uma produção de imunidade ativa mais rapidamente que os da fazenda A, que em ambas categorias, três a quatro meses e quatro a cinco meses de idade, apresentaram grande decréscimo na frequência de animais positivos na RIFI, com 13,6% de soropositivos e só posteriormente aumentou a frequência. Já os da fazenda B nas mesmas categorias já apresentavam 30,3% e 45,5% respectivamente, que continuou a aumentar nas categorias seguintes. Eles verificaram a influência do manejo adotado e do mês de nascimento dos bezerros, apresentando que animais expostos aos vetores precocemente e os nascidos no período de setembro a dezembro foram infectados nos primeiros dias de vida, como é preconizado. Já a maioria dos nascidos de março a setembro, devido à redução da população de vetores em decorrência das condições climáticas, foi infectada tardiamente por *A. marginale* durante os meses de outubro e novembro, independente da idade.

Pacheco *et al.* (2004) em estudo realizado no Paraná, demonstraram queda nos níveis de anticorpos anti-*A. marginale* séricos nas vacas no periparto, que aos 30 dias pré-parto apresentaram 90% de positivos no cELISA na fazenda A e 81% na fazenda B, e com a aproximação do parto diminuiu em consequência da intensa migração de imunoglobulinas para a glândula mamária para a formação do colostro. Porém, após este período a evolução dos níveis de anticorpos séricos foi diferente entre as propriedades estudadas, devido a pouca exposição dos animais ao *R. microplus*, o que explicaria a ocorrência de surtos de anaplasmosose no periparto naquela região em vacas que foram mantidas livres de carrapatos por até duas lactações e depois alocadas no período pré-parto em piquetes com infestação de larvas de *R. microplus*. Em relação aos bezerros, a primeira infecção na fazenda A foi constatada através de PCR aos 45 dias de idade, momento em que todos os animais eram soronegativos no cELISA. Na fazenda B, que realizou uma melhor colostragem, a menor frequência de animais positivos no cELISA ocorreu tardiamente, aos 135 dias de vida e começaram a ser positivos no PCR também aos 45 dias, mas com evolução do número de positivos mais lenta que na fazenda A. Com isso, segundo Pacheco *et al.* (2004), foi demonstrada a dependência da infecção natural em relação aos níveis de anticorpos colostrais absorvidos, reforçando assim a importância de uma adequada colostragem.

Santana *et al.* (2008) em um trabalho realizado em Turvânia, Goiás, estudaram a dinâmica da infecção natural por *B. bigemina* através da PCR e verificaram um predomínio de primoinfecções ocorrendo entre 31 e 45 dias de vida, podendo estar relacionada ao início da fase susceptível, que corresponde entre a perda de imunidade passiva e a aquisição da imunidade ativa. Um bezerro, dos 37 estudados, apresentou PCR positivo aos dois dias de vida, sugerindo um caso de transmissão transplacentária de *B. bigemina*.

Madrugá *et al.* (1984) realizaram um estudo com bezerros das raças Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore com a finalidade de determinar os níveis de imunoglobulinas anti-*B. bigemina* e *B. bovis*. Observaram um decréscimo na média dos níveis de anticorpos colostrais entre 28 e 56 dias de idade contra *B. bigemina* e entre 56 e 84 dias para *B. bovis*, período em que pode ocorrer quadros clínicos de babesiose. Os autores sugerem que, mesmo não podendo obter nenhuma conclusão da susceptibilidade ou resistência das raças e cruzamentos baseada na curva de anticorpos, a maior semelhança dos títulos de anticorpos entre animais da raça Nelore e seus cruzamentos, que foram menores que os da raça Ibagé, possa estar relacionada com a resistência destes ao *R. microplus*, vetor da *Babesia*.

3.4. Resistência aos agentes

A primoinfecção dos bezerros nas primeiras semanas de vida em área enzoótica é desejável, já que nesta fase as alterações hematológicas e clínicas são menos intensas. Animais jovens são mais resistentes devido aos anticorpos maternos, desde que recebam o colostro. Mesmo com a queda dos níveis de anticorpos, estes animais são relativamente mais resistentes que os adultos, devido à rápida resposta da imunidade celular, grande capacidade

hematopoiética e resquícios de hemoglobina fetal (GONÇALVES, 2000; PEREIRA *et al.*, 2009).

A ocorrência de quadros clínicos de anaplasmose e babesiose em animais jovens mestiços de Nelore na região Centro-Oeste e em Minas Gerais, foi explicada por Madruga *et al.* (1987) devido a probabilidade de haver uma elevada inoculação de microrganismos, na fase de inexistência ou baixa imunidade humoral, mesmo com baixas infestações por teleóginas, mostrando uma adaptação dos carrapatos à alta infecção dos agentes da TPB, formando um eficiente sistema de transmissão.

Durante a fase de portador de *A. marginale*, que ocorre após o período de convalescência, pode-se observar discretas variações de hematócrito e parasitemia, sem a presença de manifestações clínicas. Isso ocorre devido ao ciclo biológico do *A. marginale*, como um mecanismo de evasão da resposta imune, mas também é importante para o desenvolvimento da imunidade e estabelecimento da condição de portador (KIESER *et al.*, 1990).

Deve-se atentar para a ocorrência de surtos quando há mudanças no manejo e quando animais sem exposição aos agentes por um longo período são introduzidos em áreas com infestação dos vetores. Machado *et al.* (2015) acompanharam um surto de anaplasmose em Mambai, Goiás, em bovinos que ficaram por um longo período em sistema sem contato com *A. marginale*, e após serem transferidos para uma área infestada por *R. microplus* e a ocorrência do aumento da população de *S. calcitrans* na propriedade devido ao acúmulo de matéria orgânica, resultou no aumento de casos clínicos e mortalidade dos animais.

Perez *et al.* (1994) demonstraram o aumento da probabilidade de transmissão de *Babesia* em bovinos de corte jovens relacionada com a diminuição da resistência à carrapatos devido ao estresse nutricional combinado com o pico de atividade de larvas infectantes.

Ribeiro (1979) em estudo realizado em Minas Gerais com bovinos Holandês, Zebu e mestiços não observou diferença de prevalência de anticorpos entre as raças.

3.5. Diversidade genética do *Anaplasma marginale*

O Brasil, que é considerado uma área endêmica para anaplasmose, apresenta alta diversidade genética da rickettsia, com cepas já isoladas até em bezerros neonatos (POHL *et al.*, 2013; SILVESTRE *et al.*, 2016). Meneses (2013) detectou três animais recém-nascidos positivos na *nPCR* para *A. marginale* e através do sequenciamento nucleotídico identificou duas novas sequências de repetições em “tandem”, além de outras quatro já descritas, mostrando alta diversidade genética. A caracterização imunológica e molecular das cepas de *A. marginale* é importante para o desenvolvimento de vacinas efetivas para o controle da anaplasmose e para o conhecimento da epidemiologia e virulência do agente (LIS *et al.*, 2015). Mendonça (2015) realizou protocolos vacinais com duas cepas de *A. marginale* e encontrou diferença entre os níveis de proteção. O protocolo UFMG 1 + UFMG 1 foi capaz de proteger 80% dos animais, o

UFMG 3 + UFMG 3 protegeu 76,92% e o UFMG 1 + UFMG 3 não alcançou proteção suficiente para os animais resistirem ao desafio natural.

Bastos *et al.* (2010) inocularam bezerros com uma cepa de *A. marginale* de baixa virulência (UFMG 1) na dose de 2×10^7 eritrócitos infectados. Os animais apresentaram queda de 65% no hematócrito e rickettsemia média de 10,2% após a infecção, mas com sinais clínicos brandos e o tratamento não foi necessário para a recuperação. Setenta e cinco dias após a inoculação com UFMG 1, os animais foram desafiados com uma amostra de alta virulência (UFMG 2) e não manifestaram sinais clínicos da doença, enquanto que no grupo controle (animais não vacinados), houve redução de 71% do hematócrito e rickettsemia de 15,6%, resultando em mortalidade de 60%. Os resultados mostraram que uma cepa de baixa patogenicidade é capaz de proteger contra cepas de alta patogenicidade. O trabalho também mostrou que a infecção por UFMG 1 não impediu a infecção por uma segunda cepa, sugerindo que ocorre proteção sem exclusão entre cepas de *A. marginale*.

Pohl *et al.* (2013) em trabalho realizado em Minas Gerais, demonstraram a existência de grande diversidade genética de *A. marginale* dentro de um único rebanho estudado, mostrando que no campo, os animais estão susceptíveis a desafios heterólogos. Silva *et al.* (2016) em um estudo realizado em Taiacu, São Paulo, encontraram apenas três cepas de *A. marginale* no rebanho analisado. As possibilidades encontradas para explicar estes fatos foram a baixa infestação por carrapatos, já que os animais recebiam tratamento a base de piretróides a cada 21 dias, ou a não entrada de animais de outras propriedades no rebanho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

I - ATIVIDADES DE CAMPO

4.1. Local e período das atividades de campo

A metodologia de estudo utilizada foi a transversal e a coleta do material foi realizada no mês de outubro de 2013 em uma fazenda especializada em atividade leiteira intensiva, localizada no município de Inhaúma – Minas Gerais (19° 29' 27" Sul e 44° 23' 24" Oeste) a 85 km de Belo Horizonte. A propriedade possui um histórico de altas taxas de morbidade e mortalidade de animais na fase de recria por anaplasmoses e babesioses.

4.2. Aprovação pela comissão de ética

As atividades desenvolvidas pertencem ao projeto submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob protocolo nº 357/2013 (Anexo 1).

4.3. Grupos de animais

O rebanho da propriedade é predominantemente composto por animais da raça Holandês preto e branco. As bezerras nasciam no piquete maternidade e logo após o nascimento eram separadas das mães e mantidas em baias coletivas com cama de feno livre de carrapatos, durante as primeiras 24 horas, para a realização dos cuidados iniciais com o recém-nascido. A cura de umbigo foi realizada durante cinco dias, utilizando tintura de iodo 10%, duas vezes ao dia. Os animais receberam seis litros de colostro, oriundo do banco de colostro da fazenda, nas primeiras 12 horas de vida, divididos em duas refeições. Os animais foram criados em um bezerreiro em sistema de casinha com piso de areia, onde permaneceram até a desmama, aos 90 dias de idade. Este tipo de piso, por ser muito quente e com baixa umidade, não permitia a infestação por carrapatos, mas a instalação apresentava população de moscas hematófagas (*S. calcitrans*). Para o aleitamento era utilizado leite de descarte (leite de transição e de vacas em tratamento com antibiótico). As bezerras receberam seis litros de leite/dia até o quinto dia de vida, oito litros/dia do sexto ao 20º dia e dez litros/dia do 21º ao 90º dia, dividido em duas refeições (manhã e tarde). Do terceiro dia de vida ao desmame, água e concentrado foram oferecidos *ad libitum*.

Após o desmame os animais foram transferidos para o lote pós-casinha em piquetes de Tifton com área sombreada, com capacidade de lotação de oito a dez bezerras. Após esta fase, eram transferidas para lotes de recria, compostos de 20 a 30 bezerras. A dieta diária era

oferecida no cocho, composta por concentrado e volumoso (silagem de milho e feno). Água era disponível *ad libitum* durante todas as fases. Nestes piquetes aumentava o desafio natural dos animais, devido também à presença moderada de carrapatos. Os controles de moscas e carrapatos na fazenda eram feitos de forma esporádica, conforme necessidade avaliada pelos funcionários e veterinário da fazenda. A partir do décimo dia no pós-casinha era realizada quimioprofilaxia nos animais utilizando Dipropionato de imidocarb na dosagem de 1,2mg/kg, que era repetida a cada 21 dias. A quimioprofilaxia consiste no uso de um medicamento, geralmente em doses sub-terapêuticas, de forma preventiva, o que permite que os animais tenham contato com os agentes, de modo que desenvolva uma resposta imunológica (SCHEFFER, 2013).

As vacas em produção eram confinadas em sistema free stall e 30 dias pré-parto foram alocadas em piquetes com lotação de oito a dez animais. A dieta era oferecida na forma de mistura total, balanceada para cada fase e nível de produção de leite, de acordo com requisitos do NRC. O fornecimento de água era *ad libitum*.

Para o experimento, foram utilizadas 224 fêmeas bovinas, divididas em sete grupos, como descrito a seguir (Tabela 1) (Figura 3).

Tabela 1: Descrição dos grupos, número e idade média dos animais de cada categoria.

Grupo	Categoria	Nº animais	Idade (dias)		Descrição	Ambiente
			Média	Desvio padrão		
1	Aleitamento 1	42	23,35	15,06	Bezerras mais jovens em aleitamento	Casinhas individuais com piso de areia
2	Aleitamento 2	32	104,13	6,71	Bezerras mais velhas em aleitamento	Casinhas individuais com piso de areia
3	Pós-casinha	30	158,0	29,73	Bezerras mais velhas do pós-casinha	Piquetes de Tifton em grupos de 8-10 animais
4	Recria – risco	30	158,04	23,79	Categoria onde se observava o início dos casos de TPB	Piquetes de Tifton em grupos de 20-30 animais
5	Recria – doentes	30	223,35	41,58	Categoria onde se observava o maior número de casos clínicos de TPB	Piquetes de Tifton em grupos de 20-30 animais
6	Recria – estáveis	30	260,35	38,95	Categoria onde se observava pequeno número de casos clínicos de TPB	Piquetes de Tifton em grupos de 20-30 animais
7	Vacas secas	30	1413,74	327,74	Vacas secas, no final de gestação	Durante a lactação encontravam-se em free-stall e foram transferidas para piquetes após a secagem



Figura 3: Animais e ambiente da fase de aleitamento (A), do grupo pós-casinha (B), da fase de recria (C) e do grupo vacas secas (D).

4.4. Coleta de sangue

Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo anticoagulante (EDTA) através de punção da veia jugular. Alíquotas de sangue total foram utilizadas para determinar o VG e cerca de 2 mL foram congelados a -20°C para posterior extração de DNA e realização de PCR para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*. O restante do sangue foi centrifugado a 1500G por 10 minutos para obtenção de plasma, que foi armazenado a -20°C para posterior detecção de anticorpos IgG específicos para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

II - ANÁLISES LABORATORIAIS

4.5. Locais

Análises moleculares e sorológicas foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Molecular e no Laboratório de Protozoologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG, respectivamente. Os exames de microhematócrito e de esfregaço sanguíneo foram realizados em um laboratório montado na fazenda.

4.6. Esfregaço sanguíneo

Foram confeccionados esfregaços de amostras de sangue obtidas através da punção de capilares na ponta da cauda. Foram corados utilizando o kit Panótico Rápido® Laborclin para determinar a parasitemia em microscopia óptica (100X) em imersão, através da contagem de eritrócitos parasitados observados em 40 campos com celularidade homogênea. O resultado da contagem foi dividido pelo valor total estimado de células presentes nos campos observados de acordo com Mendonça (2015).

4.7. Volume globular

O volume globular (VG) foi determinado através da técnica do microhematócrito (SCHALM, 1975).

4.8. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para a detecção de anticorpos IgG anti-*A. marginale*, anti-*B. bigemina* e anti-*B. bovis* foi utilizado o plasma, seguindo o protocolo laboratorial conforme Silveira (2012). O objetivo foi avaliar a dinâmica dos anticorpos anti-*Anaplasma* e anti-*Babesia* nas bezerras em diversas faixas etárias.

Como antígenos, foram utilizadas lâminas de esfregaço sanguíneo bovino espesso contendo hemácias parasitadas por *A. marginale*, ou por *B. bovis* ou por *B. bigemina*, confeccionadas segundo IICA (1987).

Os plasmas foram diluídos em PBS 1X na proporção de 1:40. Posteriormente foram colocados 2 µL de plasma a ser testado em cada poço da lâmina, e também o controle positivo e o branco (PBS 1X). As amostras foram incubadas em câmara úmida à 37° C por 30 minutos e

posteriormente lavadas duas vezes por três minutos com PBS 1X e uma vez com água destilada, também por três minutos e secas a temperatura ambiente. Após secarem, foi adicionado em cada poço o conjugado anti-IgG bovino contendo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Serotec®) diluído a 1:100 em azul de Evans (1:50 em PBS Tween) e incubadas novamente a 37° C por 30 minutos e lavadas como da primeira vez. Após secarem em temperatura ambiente, foi adicionada glicerina alcalina e as lâminas foram cobertas por lamínula. A avaliação foi feita em microscópio de epifluoresceína (Olympus® BX41), em aumento de 20X e 40X. Como controle positivo foram utilizadas amostras de bovinos sabidamente positivos para cada antígeno e como branco somente o PBS.

4.9. Análises moleculares

O sangue total coletado de dez animais de cada grupo foi utilizado para verificar a presença do DNA dos parasitos através da PCR. Como controle negativo para a reação foi utilizada água Milli-Q ultrapura (DNase e RNase “free”) e como controle positivo o DNA extraído do sangue de animais sabidamente positivos para cada um dos patógenos testados.

4.9.1. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue total foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), seguindo as recomendações do fabricante para 300 µL de sangue.

4.9.2. Amplificação do DNA

O DNA extraído foi amplificado utilizando termociclador automático (Eppendorf Mastercycler® ou Bio-Rad T100 Thermal Cycler®). Os iniciadores, os produtos, as condições e os programas utilizados em cada reação encontram-se descritos nos itens a seguir para cada agente.

4.9.3. *Babesia bigemina*

Foi utilizada a técnica padronizada por Liu *et al.* (2014). Os iniciadores da reação e o produto obtido encontram-se descritos na tabela 2, a condição para PCR na tabela 3 e o programa utilizado na tabela 4.

Tabela 2: Sequência de iniciadores e produto obtido para diagnóstico de *B. bigemina*.

Sequência (5' para 3')	Iniciador	Produto (pb)	Referência
GCGTTGTCGTCGCTCTTG	BbS	646	Liu <i>et al.</i> (2014)
CTTAAATTCGGCGGATGG	BbR		

Tabela 3: Condição para PCR de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* (*msp4*).

Reagente	Volume (µL)
GoTaq® Green Master Mix	7,5
Água Milli-Q	5,4
Mix primer (F+R) (10 mM)	0,6
DNA	1,5
Volume final	15

Tabela 4: Programa utilizado para realização do PCR para amplificação de *B. bigemina*.

Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Duração
1 (1X)	Desnaturação inicial	96	5 minutos
2 (X)	Desnaturação	92	1 minuto
	Anelamento	56	1 minuto
	Extensão	72	1 minuto
3 (1X)	Extensão final	72	10 minutos

4.9.4. *Babesia bovis*

Foi utilizada a técnica de nested PCR (*nPCR*) padronizada por Figueroa *et al.* (1993). Os iniciadores das reações e os produtos obtidos encontram-se descritos na tabela 5, a condição para *nPCR* na tabela 3 e o programa utilizado na tabela 6.

Tabela 5: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de *B. bovis*.

Reação	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Produto (pb)
1ª reação	CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA	BoF	350
	CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA	BoR	
2ª reação	TCAACAAGGTACTCTATATGGCTACC	BoFN	291
	CTACCGAGCAGAACCTTCTCACCAT	BoRN	

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

Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Duração
1 (1X)	Desnaturação	95	2 minutos
	Anelamento	55	1 minuto
	Extensão	73	1,5 minutos
2 (34X)	Desnaturação	95	1 minuto
	Anelamento	55	1 minuto
	Extensão	73	1,5 minutos
3 (1X)	Extensão final	73	15 minutos

4.9.5. *Anaplasma marginale*

Foi utilizada a técnica que tem como alvo o gene *msp4* de *A. marginale* padronizada por de la Fuente *et al.* (2008) e nested PCR (*nPCR*) para aumentar a sensibilidade como descrito por Silveira *et al.* (2012). Os iniciadores das reações e os produtos obtidos encontram-se descritos na tabela 7, a condição para *nPCR* na tabela 3 e o programa utilizado na tabela 8.

Tabela 7: Sequência de iniciadores e produtos obtidos para diagnóstico de *A. marginale*.

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

Tabela 8: Programa utilizado para realização do *nPCR* para amplificação de *A. marginale*.

Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Duração
1 (1X)	Desnaturação inicial	94	5 minutos
2 (29X)	Desnaturação	92	1 minuto
	Anelamento	54	1 minuto
	Extensão	72	2 minutos
3 (1X)	Extensão final	72	8 minutos
4	“Hold”	12	--

4.9.6. Eletroforese em gel de agarose

Para a realização da eletroforese, primeiramente 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% 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 100 volts por 25 minutos e observados posteriormente em lâmpada ultravioleta.

4.9.7. Análises estatísticas

As variáveis volume globular e rickettsemia não obedeceram aos princípios de normalidade e homogeneidade, por isso os grupos foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis,

executado no software estatístico InfoStat® versão 2008. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar a diferença entre os grupos na frequência de animais positivos no *n*PCR, PCR e RIFI utilizando o software estatístico BioStat® versão 2009. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% (SAMPAIO, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Diagnóstico etiológico da TPB por esfregaço sanguíneo

Através da técnica de esfregaço sanguíneo, não foram observadas bezerras positivas para *A. marginale* e *Babesia* spp. na fase de aleitamento (Grupos 1 e 2). Foram observados eritrócitos parasitados por *A. marginale* (Tabela 9), com valores de rickettsemia muito baixos, em alguns animais do pós-casinha (G3 = 0,52), do risco (G4 = 0,08) e doentes (G5 = 2,33). A maior frequência de positivos e a parasitemia de *A. marginale* mais elevada, foi observada no grupo doentes (G5), o que corrobora com as observações dos funcionários da fazenda que relatam maior frequência de casos clínicos de tristeza parasitária neste grupo. Os valores médios de parasitemia de *A. marginale* foram baixos e não atingiram resultados como os observados por Coelho (2007), com valores médios no pico da infecção de 7,3%, porém com infecção experimental com dose mais alta do que ocorre na natural. Outro fato a se considerar é que a metodologia do presente trabalho foi transversal, o que fez com que em muitos animais não fosse observado o pico da infecção.

A observação de *A. marginale* nos esfregaços sanguíneos e a não observação de *Babesia* spp pode ser explicada devido à realização de quimioprofilaxia nos animais a partir do pós-casinha (G3). Na dosagem de 1,2 mg/Kg, o Dipropionato de Imidocarb é capaz de proteger os animais contra *Babesia* spp, mas não é totalmente eficaz contra *A. marginale*, como demonstrou Patarroyo *et al.* (1982), que observou que esta dose foi eficiente no controle da infecção por *Babesia* spp dentro de 24-48 horas após a aplicação, porém apenas diminuiu a parasitemia por *A. marginale*. Um detalhe importante que também deve ser considerado é que os animais do grupo doentes (G5) encontravam-se em tratamento para TPB, o que também pode explicar os resultados negativos para *Babesia* e parasitemias médias discretas de *A. marginale* nos animais deste grupo.

Tabela 9: Valores médios e desvio padrão de parasitemia no esfregaço sanguíneo, de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, em bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diferentes categorias: G1 - aleitamento 1, G2 - aleitamento 2, G3 - pós-casinha, G4 - risco, G5 - doentes, G6 - estáveis e G7 - vacas secas.

Parasitemia (%)	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
<i>A. marginale</i>	0 ^a	0 ^a	0,14 ± 0,52 ^a	0,01 ± 0,08 ^a	0,59 ± 2,33 ^b	0 ^a	0 ^a
<i>B. bovis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. bigemina</i>	0	0	0	0	0	0	0

Médias com letras diferentes na linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos no teste de Kruskal Wallis.

Foram detectados mais animais positivos na PCR que no esfregaço sanguíneo para os três agentes ($p < 0,05$), indicando uma maior sensibilidade da técnica de PCR quando comparada com a técnica de esfregaço sanguíneo (Tabela 10). Segundo Böse *et al.* (1995) a técnica de PCR é 100 vezes mais sensível que a técnica de esfregaço sanguíneo, sendo indicado para a detecção

de portadores. Comparando as técnicas houve diferença estatística nos grupos 1, 6 e 7 para *A. marginale*, corroborando com Mendonça (2015), que também encontrou uma maior sensibilidade na PCR. Mesmo a fazenda apresentando histórico de babesiose, eritrócitos parasitados por *B. bovis* e *B. bigemina* não foram encontrados nos esfregaços sanguíneos. Para *B. bovis* só não houve diferença estatística nos grupos 1 e 2, e para *B. bigemina* a diferença estatística não ocorreu nos grupos 1, 2 e 5. Fahrimal *et al.* (1992) relata que é difícil a detecção de animais portadores infectados com *B. bovis* no esfregaço sanguíneo, devido à baixa concentração de parasitas presentes no sangue periférico.

Tabela 10: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diferentes categorias, positivas no esfregaço sanguíneo e PCR para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*. G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.

Grupo	<i>A. marginale</i>		<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>	
	Positivos esfregaço (%)	Positivos nPCR (%)	Positivos esfregaço (%)	Positivos nPCR (%)	Positivos esfregaço (%)	Positivos PCR (%)
G1	0 ^A	20 ^B	0 ^A	10 ^A	0 ^A	0 ^A
G2	0 ^A	10 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A	0 ^A
G3	13,33 ^A	40 ^A	0 ^A	30 ^B	0 ^A	60 ^B
G4	3,33 ^A	20 ^A	0 ^A	40 ^B	0 ^A	60 ^B
G5	43,33 ^A	100 ^A	0 ^A	40 ^B	0 ^A	10 ^A
G6	0 ^A	80 ^B	0 ^A	40 ^B	0 ^A	50 ^B
G7	0 ^A	80 ^B	0 ^A	70 ^B	0 ^A	60 ^B

Letras diferentes na mesma linha, para cada agente, indicam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste Exato de Fisher.

5.2. Volume globular

Os valores médios de VG apresentaram diferenças entre os grupos ($p < 0,05$), variando entre 19,2% a 35,06% (Tabela 11). O grupo doentes (G5) apresentou a média de VG mais baixa (19,2%), sendo que, 93,3% das bezerras desse grupo apresentaram valores de VG abaixo do fisiológico, de acordo com Jain (1986), caracterizando um quadro de anemia.

Tabela 11: Média do VG e frequência de animais com VG < 24%, em bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diferentes categorias: G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.

Grupo	1 Aleitamen to 1	2 Aleitamen to 2	3 Pós- casinha	4 Risco	5 Doentes	6 Estáveis	7 Vacas secas
Média do VG (%)	30,55 ^d	35,06 ^e	31,3 ^d	26,53 ^{bc}	19,2 ^a	25,77 ^b	29,57 ^{cd}
Frequência de animais com VG < 24% (%)	14,28	0	10	20	93,33	23,33	0
1		X			X		X
2	X			X	X	X	
3					X		
4		X			X		X
5	X	X	X	X			X
6		X					X
7	X			X	X	X	

Média do VG com letras diferentes representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos no teste de Kruskal Wallis. Para frequência de animais com VG < 24%, as colunas assinaladas com X indicam diferença entre a categoria da linha e da coluna pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

Avaliando a frequência de animais em cada grupo com VG menor que 24%, considerado como limite inferior para bovinos (JAIN, 1986), observou-se uma maior frequência também no grupo 5 (doentes), com 93,33% dos animais abaixo do limite fisiológico, seguido do grupo 6 (estáveis) com 23,33% e grupo 4 (risco) com 20% (Tabela 11). Este comportamento do volume globular pode ser explicado no grupo de risco (G4) pelo início da apresentação clínica da TPB. Neste grupo observou-se uma redução do número de animais soropositivos para *A. marginale* em relação às categorias mais jovens, bem como, baixo número de bezerras soropositivas para *B. bigemina*, ou seja, maior susceptibilidade a infecção por estes agentes. Esta fase, portanto, é caracterizada pela alta frequência de animais susceptíveis a babesiose e anaplasiose com início dos casos clínicos. No grupo doentes (G5) observou-se a maior frequência de animais com anemia e o menor valor de VG médio. Este grupo é mais velho que o G4, mas apresenta maior desvio padrão e, possivelmente é formado por animais oriundos do G4, separados do mesmo a partir do monitoramento sanitário diário realizado na fazenda pelos funcionários. A maior variação do desvio padrão da idade média dos animais do G5 em relação ao G4 demonstra que os doentes entram nesse grupo e permanecem no mesmo por um longo período de convalescência, que consiste do momento de VG mais baixo até o dia em que retorna aos limites fisiológicos, que segundo Coelho (2007) dura em média 25 dias. Na anaplasiose o período de patência, ou seja, do início da queda do VG até o momento de volume globular mais baixo é longo, sendo em média 25 dias de acordo com Coelho (2007). Isto ocorre devido à patogenia da anemia na anaplasiose, onde, no início do quadro, há remoção dos eritrócitos parasitados pelo sistema monocítico-fagocitário e, com o decorrer da infecção, hemácias não parasitadas também começam a ser fagocitadas devido aos auto anticorpos que se aderem as

hemácias. Nos quadros de babesiose, ocorre intensa lise de eritrócitos durante a multiplicação dos agentes (revisado por Ribeiro e Passos, 2002), o que determina um quadro mais agudo e com menor tempo de patência. No grupo de animais estáveis (G6), ainda se observa 23% das bezerras anêmicas. Este fato pode ser explicado, no caso da anaplasmosose pela longa fase de convalescência descrita por Coelho (2007) e pelas discretas oscilações de VG que ocorrem durante as recidivas na fase de portador descrita por Kieser *et al.* (1990). Vale a pena destacar que, nesta fase (G6), não há mais animais positivos para *A. marginale* nos esfregaços sanguíneos, porém praticamente todos (80%) são positivos no PCR, determinando assim uma fase de portadores. Nesta fase os animais estão protegidos contra quadros clínicos, mantendo baixos níveis de *A. marginale* (KIESER *et al.*, 1990). Esta condição de portadores foi adquirida através das infecções nas fases anteriores, especialmente nos grupos 4 e 5, entre as idades de 158 e 223 dias.

5.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Na pesquisa de anticorpos IgG anti-*A. marginale* através da RIFI, todos os grupos apresentaram animais positivos, com frequência variando entre 26,66% e 86,66% (Tabela 12). A menor frequência de bezerras soropositivas foi observada no grupo 5 (doentes). Este fato pode explicar a ocorrência de maior frequência de animais com quadro clínico de anaplasmosose, comprovado pela maior frequência de esfregaços de sangue positivos, maior parasitemia média e, conseqüentemente, maior frequência de bezerras anêmicas.

Tabela 12: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diferentes categorias (1 a 7), com sorologia positiva para anticorpos IgG anti-*A. marginale* e representação estatística de comparação entre categorias.

Grupos	1 Aleitamento 1	2 Aleitamento 2	3 Pós- casinha	4 Risco	5 Doentes	6 Estáveis	7 Vacas secas
Frequência de animais soropositivos (%)	71,42	56,25	56,66	36,66	26,66	83,33	86,66
1				X	X		
2					X	X	X
3					X	X	X
4	X					X	X
5	X	X	X			X	X
6		X	X	X	X		
7		X	X	X	X		

As colunas assinaladas com X indicam diferença entre a categoria da linha e da coluna pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

Para anticorpos IgG anti-*B. bovis* foi observada frequência variando de 56,66% a 97,61% (Tabela 13). Houve uma diferença entre as bezerras em aleitamento das categorias 1 e 2, já indicando a queda da imunidade passiva em alguns animais da categoria 2, mas ainda permanecendo com níveis satisfatórios. A menor frequência de animais positivos foi observada

no pós-casinha (G3). Esta queda com rápida recuperação da frequência de animais positivos no grupo seguinte ocorreu provavelmente devido a uma alta taxa de inoculação do agente já no pós-casinha (G3) devido ao início do contato com carrapatos, e também devido ao manejo dos grupos, já que quando os animais saem do pós-casinha para a recria, são transferidos para outro ambiente e com maior concentração de animais por piquete.

Tabela 13: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diversas categorias (1 a 7), com sorologia positiva para anticorpos IgG anti-*B. bovis* e representação estatística de comparação entre categorias.

Grupos	1 Aleitamento 1	2 Aleitamento 2	3 Pós- casinha	4 Risco	5 Doentes	6 Estáveis	7 Vacas secas
Frequência de animais soropositivos (%)	97,61	68,75	56,66	80	70	93,33	93,33
1		X	X	X	X		
2	X					X	X
3	X			X		X	X
4	X		X				
5	X						
6		X	X		X		
7		X	X		X		

As colunas assinaladas com X indicam diferença entre a categoria da linha e da coluna pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

A frequência de bezerras e vacas soropositivas para *B. bigemina* foi inferior a para *A. marginale* e *B. bovis*, variando nos grupos entre 6,66% e 83,33% (Tabela 14). A menor frequência de soropositivos para *B. bigemina* foi observada no grupo doentes (G5), o qual apresentou pequeno número de animais soropositivos (6,66%), inferior aos soropositivos para *B. bovis* e *A. marginale*, caracterizando um grupo de alta susceptibilidade aos quadros clínicos de babesiose por *B. bigemina*. A infecção por *B. bigemina* possivelmente tem grande participação no aumento de casos de anemia observados nesta fase, juntamente com os de anaplasmose. Desta forma, no próximo grupo (G6) observa-se alta frequência de soropositivos para *B. bigemina*, provavelmente como resposta às infecções que ocorreram no G5. Isto também explica o surto de babesiose por *B. bigemina* relatado pelo veterinário responsável pela fazenda alguns meses após a coleta das amostras deste experimento (comunicação pessoal). Um ponto importante é a baixa frequência de vacas secas soropositivas (46,66%), muito abaixo dos 93% descritos por Madruga *et al.* (1984) em situações de pecuária de corte a pasto. Mesmo com Bock e de Vos (2001) afirmando que a imunidade para *B. bigemina* pode durar por até quatro anos, a baixa frequência de vacas soropositivas no final da gestação pode estar relacionada com a perda da imunidade para *B. bigemina* durante o período de lactação, uma vez que ela é mantida em sistema de free stall, sem contato com carrapatos durante toda a lactação, ou seja, no mínimo 300 dias. Além disso, estas vacas já estavam neste sistema por pelo menos dois anos. Esta menor frequência de anticorpos para *B. bigemina* frente à *B. bovis* foi explicada por Patarroyo *et al.* (1987) devido à uma maior distribuição de *B. bovis* tanto no hospedeiro quanto

no vetor, resultando em uma maior taxa de inoculação dos bovinos. Porém Madruga *et al.* (1984) encontraram maior prevalência de *B. bigemina* em relação à *B. bovis*, e explica a ocorrência desse fato devido provavelmente à maior taxa de inoculação de *B. bigemina* pelo *R. microplus*, em consequência da alta infectividade de *B. bigemina*. Do mesmo modo, Silva (2003) encontrou uma maior taxa de infecção de teleóginas de *R. microplus* por *B. bigemina* do que por *B. bovis*.

Tabela 14: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diversas categorias (1 a 7), com sorologia positiva para anticorpos IgG anti-*B. bigemina* e representação estatística de comparação entre categorias.

Grupos	1 Aleitamento 1	2 Aleitamento 2	3 Pós-casinh a	4 Risco	5 Doentes	6 Estáveis	7 Vacas secas
Frequência de animais soropositivos (%)	38,09	37,5	53,33	53,33	6,66	83,33	46,66
1					X	X	
2					X	X	
3					X	X	
4					X	X	
5	X	X	X	X		X	X
6	X	X	X	X	X		X
7					X	X	

As colunas assinaladas com X indicam diferença entre a categoria da linha e da coluna pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

Analisando o comportamento dos três agentes, a queda significativa da frequência de animais positivos na RIFI para *A. marginale* (Figura 4) coincide com a queda do hematócrito que ocorreu a partir do grupo 4 (risco), indicando uma susceptibilidade à anaplasiose e início dos quadros clínicos. O grupo 5 (doentes), onde houve o maior número de animais com hematócrito abaixo de 24%, foi também o grupo onde encontrou-se menor frequência de animais positivos na RIFI para *A. marginale* e *B. bigemina*, exatamente os agentes que mais causam anemia nos animais afetados.

Se os resultados da RIFI forem avaliados de acordo com Mahoney e Ross (1972), que classificam a área como instabilidade enzoótica quando menos de 75% dos animais aos nove meses de idade são soropositivos, classificaremos a propriedade como estável para os três agentes, já que ela apresenta 83,33%, 93,33% e 83,33% animais positivos para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* respectivamente. Mas vale lembrar que além de Mahoney e Ross (1972) não avaliarem infecções por *A. marginale*, deve-se levar em conta outros aspectos que interferem na imunidade dos animais, como a imunidade inata que é forte e tem sido mostrada em associação com os níveis elevados de células “natural killer” esplênicas em bezerros jovens (revisado por Jonsson *et al.*, 2012) e mudanças de manejo e climáticas que possam ocorrer. A situação encontrada na fazenda não corrobora com Mahoney e Ross (1972), já que mesmo mais

de 75% dos animais serem soropositivos aos nove meses de idade, verifica-se a ocorrência de casos clínicos em animais jovens e ausência de quadros clínicos em adultos.

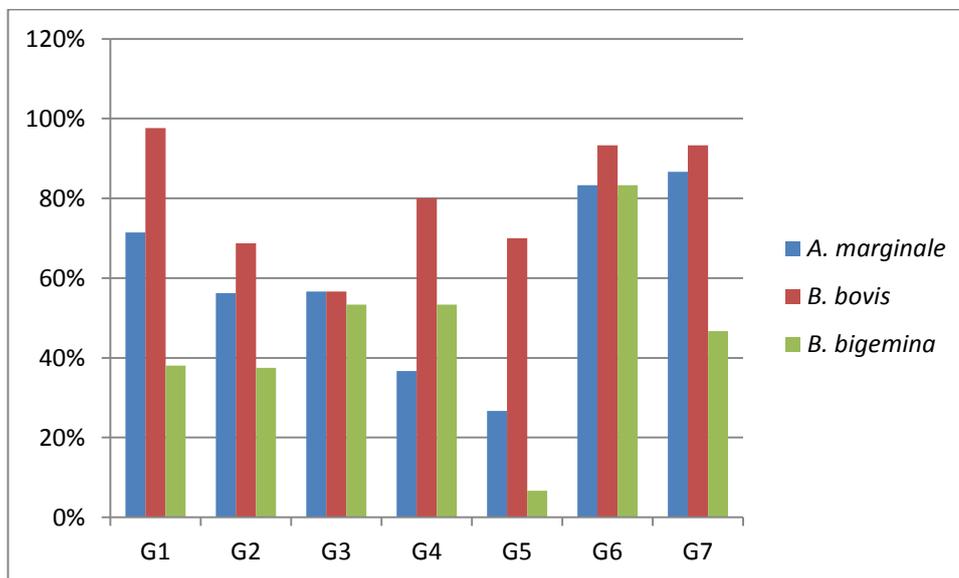


Figura 4: Frequência de bezerras e vacas, em sistema de criação intensivo, soropositivas para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* por categoria avaliada: G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.

5.3.1. Transferência de imunidade passiva

É interessante observar que a frequência de vacas secas soropositivas para os três agentes é semelhante à frequência de bezerras soropositivas na fase de aleitamento, exceto do aleitamento 2 para *B. bovis*, indicando que o manejo da colostragem está adequado, resultando taxas de transferência de imunidade passiva de 82%, 100% e 82% para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* respectivamente. A especificidade de imunoglobulinas para *A. marginale* e *B. bovis* está satisfatória, porém para *B. bigemina*, mesmo com boa transferência de imunidade passiva total, ela mostra-se insatisfatória, devido a baixa frequência de vacas secas soropositivas, indicando um fator de risco para casos de babesiose por *B. bigemina*.

Bezerros neonatos apresentam vários fatores intrínsecos que os fazem mais resistentes à infecção por *Babesia* spp e *A. marginale*, como a maior eficiência da resposta celular, a maior atividade da eritropoiese medular e a presença de hemoglobina fetal nas hemácias (revisado por Ribeiro e Passos, 2002). Apesar disso, animais que absorvem quantidade deficiente de anticorpos colostrais são muito susceptíveis à babesiose por *B. bigemina* (HALL *et al.*, 1968).

5.4. Análises moleculares

Na pesquisa de DNA de *A. marginale* através de *nPCR*, foram encontrados animais positivos em todas as categorias (Tabela 15). A presença de animais positivos na fase de

aleitamento, onde ainda não entraram em contato com carrapatos, destaca a importância da transmissão mecânica deste agente por moscas hematófagas (FOIL, 1989). Outra hipótese seria a ocorrência de transmissão congênita de *A. marginale* e a manutenção do estado de portador por estas bezerras neonatas, já que Meneses (2013) detectou nesta mesma fazenda uma taxa de 10% de transmissão congênita de *A. marginale*.

A frequência de animais positivos no *nPCR* para *A. marginale* se manteve baixa e constante até o grupo de risco (G4). Este fato mostra que a transmissão da anaplasmose entre estes animais foi baixa, uma vez que a infestação por carrapatos era praticamente nula na fase de aleitamento (G1 e G2). As moscas hematófagas estavam presentes em todos os ambientes, porém, a manutenção do número de animais positivos entre os grupos 1, 2, 3 e 4 sugerem que as mesmas tiveram pouca participação nesta transmissão, corroborando com Scoles *et al.* (2005) que demonstraram uma maior eficiência dos carrapatos em transmitir *A. marginale*, quando comparado com moscas *S. calcitrans*. A infestação por carrapatos começava a aumentar nos grupos 3 e 4 e a anaplasmose clínica era observada no grupo 5. Possivelmente vários animais se infectaram nos grupos 3 e 4, porém como o período de incubação de *A. marginale* é alto (21-35 dias) e a manifestação clínica com anemia e queda de VG somente é percebida pelos funcionários alguns dias após o início da doença, muitas vezes em estágio mais avançado no grupo 5, já que segundo Coelho (2007) o valor médio máximo de parasitemia ocorre dois dias antes do pico de anemia. No grupo 5 (doentes) detectou-se 100% de animais positivos no *nPCR*, ao mesmo tempo, menor frequência de soropositivos (26,66%), indicando ser esta a fase de maior risco para anaplasmose na propriedade (Figura 5). Após a fase de doença (G5), os animais tornaram-se portadores e este status foi mantido até a categoria de vacas secas (G7 = 80% PCR), mantendo também a imunidade presente como mostrado pelos resultados da sorologia neste grupo (G7 = 86,66% positivos na RIFI). Segundo Madruga e Araújo (1998) pode-se detectar anticorpos IgG anti-*A. marginale* até 18 meses pós-infecção.

Tabela 15: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diversas categorias (1 a 7), positivas na *nPCR* para *A. marginale* e representação estatística de comparação entre categorias.

Grupos	1 Aleitamento 1	2 Aleitamento 2	3 Pós- casinha	4 Risco	5 Doentes	6 Estáveis	7 Vacas secas
Frequência de animais positivos (%)	20	10	40	20	100	80	80
1					X	X	X
2					X	X	X
3					X		
4					X	X	X
5	X	X	X	X			
6	X	X		X			
7	X	X		X			

As colunas assinaladas com X indicam diferença entre a categoria da linha e da coluna pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

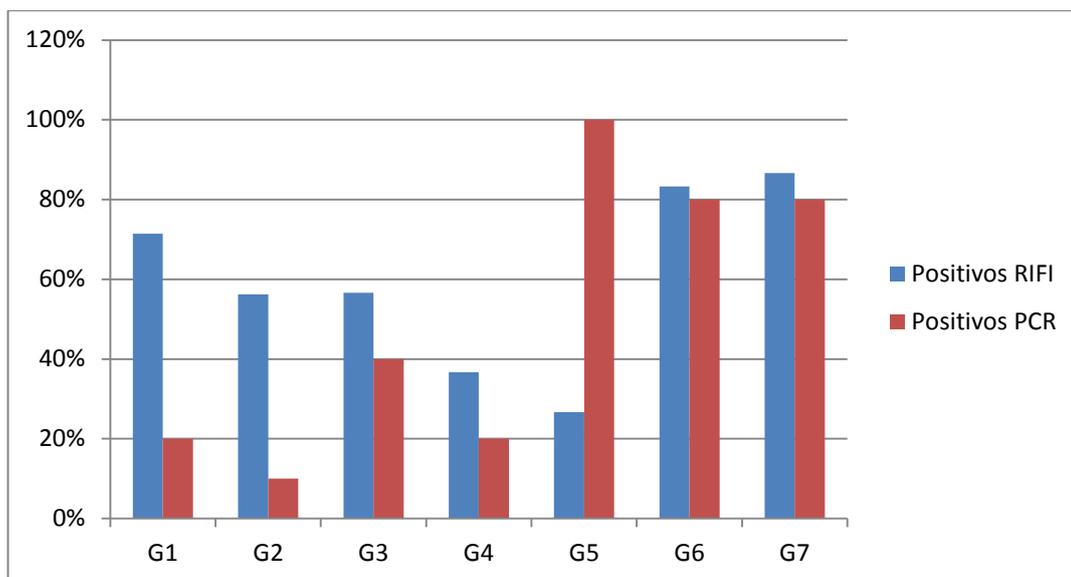


Figura 5: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, soropositivas na RIFI e positivas na *nPCR* para *A. marginale* em cada categoria avaliada: G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.

Detectou-se na pesquisa de *B. bovis* através de *nPCR*, animais positivos em todos os grupos, exceto no grupo 2 (Tabela 16). Na fase de aleitamento, as bezerras eram mantidas em piso de areia e não tinham contato com o *R. microplus*, único vetor do parasito. Porém, um animal da fase de aleitamento 1, que no dia da coleta tinha apenas três dias de vida, foi positivo na *nPCR*, indicando um possível caso de transmissão congênita de *B. bovis*, já que o período de incubação varia de sete a 14 dias (KESSLER e SCHENK, 1998). O primeiro caso de transmissão congênita de *B. bovis* no Brasil foi descrito por Ribeiro *et al.* (1994) em um bezerro Pardo Suíço que não ingeriu colostro e morreu aos três dias de vida. Desta forma, a maioria dos animais se manteve livre da infecção por *B. bovis* até serem desmamados e transferidos para os piquetes no pós-casinha (G3) onde começam a se infectar devido à presença de carrapatos. A presença de grande número de bezerras positivas na sorologia para *B. bovis* é explicada pela eficiente transmissão de imunidade passiva colostrar, uma vez que quase todas as vacas do G7 são positivas para *B. bovis* no *nPCR* e apresentam sorologia positiva. Durante a fase de recria (G4, G5 e G6), 40% das novilhas apresentaram *nPCR* positivo e 80 a 93% foram soropositivas, demonstrando um quadro de estabilidade para *B. bovis* nestas fases (Figura 6). Há relatos de quadros clínicos de babesiose por *B. bovis* na propriedade, mas os casos parecem ocorrer de forma esporádica na forma de surto nas bezerras. A metodologia de coleta de material usada neste trabalho foi transversal e, desta forma, não conseguiu avaliar o comportamento esporádico dos casos de *B. bovis*.

Tabela 16: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diversas categorias de idade (1 a 7), positivas na *n*PCR para *B. bovis* e representação estatística de comparação entre categorias.

Grupos	1 Aleitamento 1	2 Aleitamento 2	3 Pós-casinha	4 Risco	5 Doentes	6 Estáveis	7 Vacas secas
Frequência de animais positivos (%)	10	0	30	40	40	40	70
1							X
2				X	X	X	X
3							
4		X					
5		X					
6		X					
7	X	X					

As colunas assinaladas com X indicam diferença entre a categoria da linha e da coluna pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

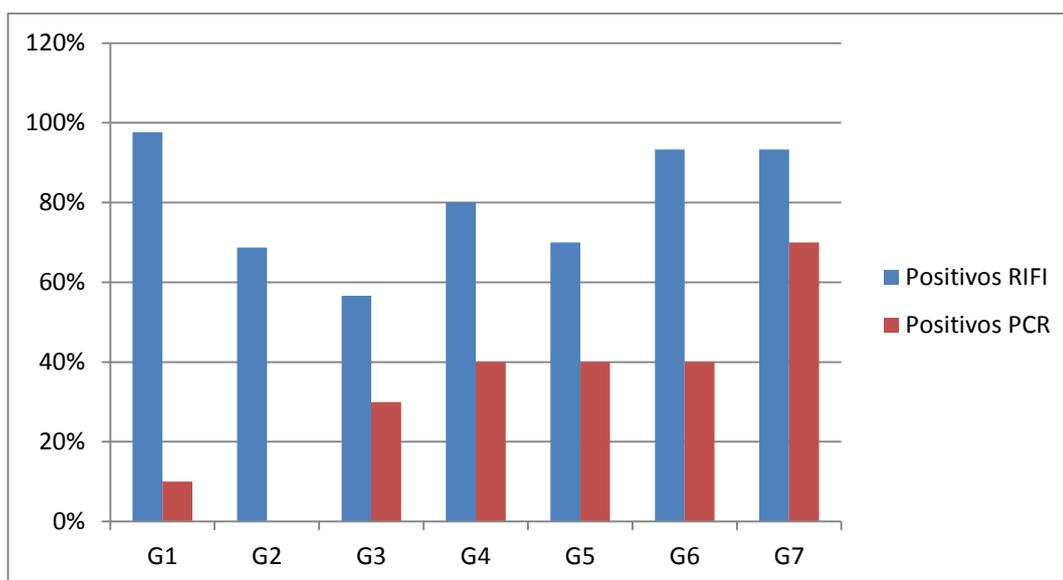


Figura 6: Frequência de bezerras e vacas, em sistema de criação intensivo, soropositivas na RIFI e positivas na *n*PCR para *Babesia bovis* em cada categoria avaliada: G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.

Para *B. bigemina*, foram verificados animais positivos através da PCR somente a partir do pós-casinha (Tabela 17), que é a categoria que os animais passam a ter contato com o *R. microplus*. Estes resultados não corroboram com Santana *et al.* (2008), que encontraram a maioria das primo-infecções ocorrendo entre 31 e 45 dias de vida, porém em animais mestiços sob sistema de criação extensivo para corte. O comportamento dos resultados foi semelhante à RIFI (Figura 7) a partir do grupo 3 (pós-casinha), com frequências de animais infectados iguais

nos grupos pós-casinha e risco. No grupo doentes (G5) houve uma queda nos valores, voltando a subir nos estáveis (G6). Este fato não era esperado, já que é a fase em que os animais estão com sinais clínicos e com IgG baixo. Apesar das técnicas moleculares serem mais sensíveis que o esfregaço, a sensibilidade não é 100%, podendo ocorrer falsos negativos, ainda mais que no caso de *B. bigemina* foi realizada PCR, ao contrário dos demais agentes que foi feita *n*PCR, que é mais sensível.

Cerca de 50% dos animais apresentaram PCR positiva para *B. bigemina* nas fases de recria (G3 a G6) e, apenas 10% no grupo doentes (G5). Este comportamento foi acompanhado pela sorologia. Assim, pode-se observar através dos resultados da RIFI que as bezerras entram na fase de recria (G3) com alta susceptibilidade a infecção por *B. bigemina*, uma vez que apenas 40% delas são sorologicamente positivas, provavelmente ainda com resquícios de imunidade passiva. Assim, os quadros de anemia verificados nos grupos 4 e 5, podem ter contribuição dos casos de babesiose por *B. bigemina*. É interessante observar que, para este agente, apesar de encontrarmos 83% das bezerras mais velhas (G6) com sorologia positiva, nas vacas esta frequência é de apenas 46%, determinando falha na imunização passiva das bezerras durante a fase neonatal. Assim a ausência de contato com carrapatos na fase de aleitamento colabora para a não ocorrência de surtos de babesiose por *B. bigemina* nesta fase, apesar de 60% das bezerras estarem susceptíveis.

Tabela 17: Frequência de bezerras e vacas da raça Holandês, em sistema de criação intensivo, de diversas categorias (1 a 7), positivas na PCR para *B. bigemina* e representação estatística de comparação entre categorias.

Grupos	1 Aleitamento 1	2 Aleitamento 2	3 Pós- casinha	4 Risco	5 Doentes	6 Estáveis	7 Vacas secas
Frequência de animais positivos (%)	0	0	60	60	10	50	60
1			X	X		X	X
2			X	X		X	X
3	X	X			X		
4	X	X			X		
5			X	X			X
6	X	X					
7	X	X			X		

As colunas assinaladas com X indicam diferença entre a categoria da linha e da coluna pelo teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

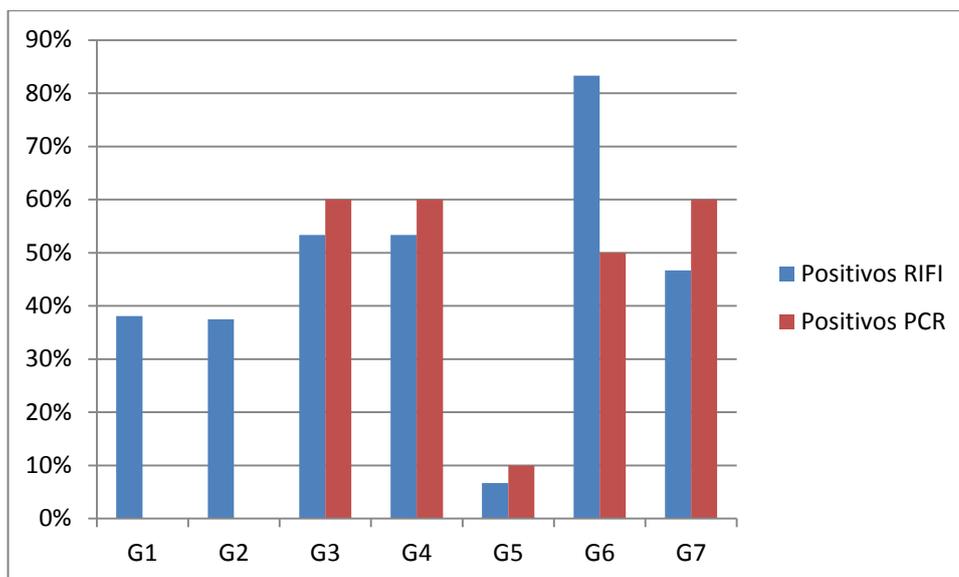


Figura 7: Frequência de bezerras e vacas, em sistema de criação intensivo, soropositivas na RIFI e positivas na PCR para *Babesia bigemina* em cada categoria avaliada: G1 – aleitamento 1, G2 – aleitamento 2, G3 – pós-casinha, G4 – risco, G5 – doentes, G6 – estáveis e G7 – vacas secas.

O comportamento da infecção por *A. marginale* e *B. bovis*, com aumento da frequência de animais positivos na PCR antes do aumento da frequência na RIFI, ocorre porque a presença de anticorpos ativos é um sinal de prévia exposição ao parasito (ROMERO-SALAS *et al.*, 2016) e a RIFI foi para anticorpos IgG, que nas infecções aparecem mais tardiamente (MADRUGA e ARAÚJO, 1998).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A situação encontrada neste estudo, onde a fazenda apresentava mais de 75% de animais soropositivos aos nove meses de idade para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, porém com a ocorrência de casos clínicos em animais jovens, mostra que as classificações de instabilidade e estabilidade enzoótica definidas por Mahoney e Ross (1972) e utilizadas amplamente por diversos autores em casos dos três agentes devem ser utilizadas com cautela, pois somente a frequência de animais soropositivos não é capaz de estabelecer o status epidemiológico de uma fazenda. Diversos outros fatores devem ser levados em consideração e a avaliação deve ser exclusiva para cada local. Segundo Mahoney e Ross (1972) a propriedade estudada seria classificada como estável, porém verificou-se alta frequência de animais susceptíveis e ocorrência de quadros clínicos em animais com menos de nove meses, sendo necessária uma nova caracterização para esta situação.

7. CONCLUSÕES

A queda dos anticorpos colostrais anti-*A. marginale* ocorreu no início da fase de recria (G4), com desenvolvimento da imunidade ativa no G6 (estáveis).

Para anticorpos anti-*B. bovis* a queda dos anticorpos colostrais ocorreu simultaneamente com o desenvolvimento da imunidade ativa.

No caso de *B. bigemina* a menor frequência de animais soropositivos ocorreu no G5 (doentes).

Foram encontrados alguns animais positivos na *n*PCR para *A. marginale* na fase de aleitamento, indicando alguns possíveis casos de transmissão congênita.

As infecções por *A. marginale* ocorreram com predomínio no grupo 5 (doentes), o que coincide com a menor frequência de animais soropositivos. O mesmo comportamento foi observado nos esfregaços sanguíneos.

Houve um caso de transmissão transplacentária de *B. bovis* e a frequência de primo-infecções começou a aumentar no pós-casinha (G3).

As primo-infecções de *B. bigemina* iniciaram no pós-casinha (G3), fase em que as bezerras apresentavam alta susceptibilidade.

A transferência de imunidade passiva ocorreu adequadamente para os três agentes, porém com especificidade de imunoglobulinas para *B. bigemina* insatisfatória.

Houve queda do VG no grupo 4 (risco) devido ao início dos quadros clínicos de anaplasnose.

O maior número de animais com VG abaixo de 24% ocorreu no grupo 5 (doentes) devido aos quadros clínicos de anaplasnose e babesiose por *B. bigemina*.

Foi detectado 23% de bezerras anêmicas no grupo 6 (estáveis) devido ao longo período de convalescência da anaplasnose e o estabelecimento do quadro de portador.

Nesta fazenda os animais jovens apresentam grande susceptibilidade à *A. marginale* e *B. bigemina*. A situação para *B. bovis* é estável, podendo ocorrer somente alguns casos esporádicos.

8. REFERÊNCIAS

ASSADIAN, O.; STANEK, G. Theobald Smith – The discoverer of ticks as vectors of disease. *Wiener Klinische Wochenschrift*, v.114, p.479-481, 2002.

BASTOS, C.V.; PASSOS, L.M.F.; FACURY FILHO, E.J.; RABELO, E.M.; DE LA FUENTE, J.; RIBEIRO, M.F. Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet. J.*, v. 186, p. 374-378, 2010.

BENAVIDES, M.V.; SACCO, A.M.S. Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. *Veterinary parasitology*, v.150, p. 54-64, 2007.

BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. *Parasitology*, v.129, p.247-269, 2004.

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

BOCK, R.E.; DE VOS, A.J.; KINGSTON, T.G.; MCLELLAN, D.J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. *Aust. Vet. J.*, v. 75, n. 5, p. 337-340, 1997.

BÖSE, 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, p. 61-74, 1995.

BRACARENSE, A.P.F.L.; VIDOTTO, O.; CRUZ, G.D. Transmissão congênita de *Babesia bovis*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 53, n. 4, p. 1-3, 2001.

COELHO, L.C.T. *Anaplasmose bovina: parâmetros clínicos e de patologia clínica em bezerros infectados experimentalmente*. 2007. 65p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA, V.M.M.; RODRIGUES, A.L.; MEDEIROS, J.M.A.; LABRUNA, M.B.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 31, n. 3, p. 239-243, 2011.

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.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of

Ehrlichia with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

FAHRIMAL, Y.; GOFF, W.L.; JASMER, D.P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 6, p. 1374-1379, 1992.

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; BUENING, G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, v.50, p. 69-81, 1993.

FOIL, L.D. Tabanids as vectors of disease agentes. *Parasitology Today*, v. 5, n. 3, p. 88-96, 1989.

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.

GONÇALVES, R.C.; SILVA, A.A.; FERREIRA, D.O.L.; CHIACCHIO, S.B.; LOPES, R.S.; BORGES, A.S.; AMORIM, R.M. Tristeza parasitária em bovinos na região de Botucatu – SP: estudo retrospectivo de 1986-2007. *Semina: Ciências Agrárias*, v.32, n.1, p.307-312, 2011.

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

HALL, W.T.K.; TAMMEMAGI, L.; JOHNSTON, L.A.Y. Bovine babesiosis: the immunity of calves to *Babesia bigemina* infection. *Australian Veterinary Journal*, v. 44, p. 259-264, 1968.

IICA – Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura: *Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovine*, San José, Costa Rica, 1987.

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

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.

KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB): conceito, etiologia, transmissão, epidemiologia, diagnóstico e controle. In: KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. *Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos*. Campo Grande: Embrapa – CNPGC, 1998. p. 47-67.

KIESER, S.T.; ERIKS, I.S.; PALMER, G.H. Cyclic rickettsemia during persistente *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infection and immunity*, v. 58, n. 4, p. 1117-1119, 1990.

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.

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

LASMAR, P. V. F.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; BASTOS, C.V.; RIBEIRO, M.F.B. Evaluating the effectiveness of an inactivated vaccine from *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 21, n. 2, p. 112-117, 2012.

LIS, K.; MERA, I.G.F.; POPARA, M.; CABEZAS-CRUZ, A.; AYLLÓN, N.; ZWEYGARTH, E.; PASSOS, L.M.F.; PFISTER, K.; DE LA FUENTE, J. Molecular and immunological characterization of three strains of *Anaplasma marginale* grown in cultured tick cells. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 6, p. 522-529, 2015.

LIU, J.; GUAN, G.; LIU, A.; LI, Y.; YIN, H.; LUO, J. A PCR method targeting internal transcribed spacers: the simultaneous detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle. *Acta Parasitologica*, v. 59, n. 1, p. 132-138, 2014.

MACHADO, R.Z.; SILVA, J.B.; ANDRÉ, M.R.; GONÇALVES, L.R.; MATOS, C.A.; OBREGÓN, D. Outbreak of anaplasmosis associated with the presence of different *Anaplasma marginale* strains in dairy cattle in the states of São Paulo and Goiás, Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v. 24, n. 4, p. 438-446, 2015.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R. Diagnóstico sorológico da tristeza parasitária bovina. In: KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. *Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos*. Campo Grande: Embrapa – CNPGC, 1998. p. 91-108.

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 bezerras da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 19, n. 9, p. 1163-1168, 1984.

MADRUGA, C.R.; HONER, M.R.; SCHENK, M.A.M.; CURVO, J.B.E. Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da tristeza parasitária bovina no Mato Grosso do Sul. *Pesquisa em Andamento – CNPG/Embrapa*, n. 38, p. 1-7, 1987.

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

MELO, V.S.P.; PASSOS, L.M.F.; FACURY FILHO, E.J.; SATURNINO, H.M.; RIBEIRO, M.F.B. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy herds of the Metalúrgica Region, Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.21, p.146-150, 2001.

MENDONÇA, F.L.M. *Utilização de isolados de Anaplasma marginale de baixa virulência em protocolos de imunização de bezerros: análise dos efeitos pós-vacinais e proteção contra o desafio natural*. 2015. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MENESES, R. M. *Isolamento e caracterização molecular de Anaplasma marginale de origem congênita e avaliação da virulência em bezerros experimentalmente infectados*. 2013. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PACHECO, R.C.; VIDOTTO, O.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; KAWASAKI, P.; PRUDÊNCIO, L.B.; MARANA, E.R.M.; PEREIRA, A.L. Dinâmica da infecção natural pelo *Anaplasma marginale* em vacas e bezerros da raça Holandesa, na região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v.25, n.3, p.235-244, 2004.

PASSOS, L.M.F.; LIMA, J.D. Diagnóstico de anaplasmose bovina congênita em Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 36, n. 6, p. 743-744, 1984.

PATARROYO, J.H.; RIBEIRO, M.F.; VARGAS, M.I. Effect of imidocarb dipropionate in brazilian anaplasmosis and babesiosis. *Tropical Animal Health Production*, v. 14, p. 234, 1982.

PATARROYO, J.H.; RIBEIRO, M.F.B.; SANTOS, J.L.; FARIA, J.E. Epidemiologia das babesioses bovinas no estado de Minas Gerais I. Prevalência de anticorpos fluorescentes na Zona da Mata – MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 39, n. 3, p. 423-429, 1987.

PEREIRA, M.A.; GUIMARÃES, A.M.; ROCHA, C.M.B.M. Efeito da estação de nascimento sobre a frequência de bezerras soropositivas para *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* na região sul de Minas Gerais, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.3, p.975-983, 2009.

PEREZ, E.; HERRERO, M.V.; JIMENEZ, C.; HIRD, D.; BUENING, G.B. Effect of management and host factors on seroprevalence of bovine anaplasmosis and babesiosis in Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 20, p. 33-46, 1994.

POHL, A.E., CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M.F.B, SILVEIRA, J.A.G.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 22(1), p. 129-135, 2013.

PURNELL, R.E. Babesiosis in various hosts. In: RISTIC, M.; KREIER, J.P. *Babesiosis*, 1981, p. 25-63.

RIBEIRO, M.F.B. *Aspectos epidemiológicos da anaplasmose bovina em Minas Gerais e avaliação da vacina atenuada*. 1979. 41p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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.F. Tristeza Parasitária Bovina. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n. 39, p. 36-52, 2002.

ROMERO-SALAS, D.; MIRA, A.; MOSQUEDA, J.; GARCIA-VÁZQUEZ, Z.; HIDALGO-RUIZ, M.; VELA, N.A.O.; LEÓN, A.P.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SCHNITTGER, L. 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.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ. 264p., 2010.

SANTANA, A.P.; LINHARES, G.F.C.; MURATA, L.S.; BERNAL, F.E.; TORRES, F.A.; MADRUGA, C.R. Dinâmica da infecção natural por *Babesia bigemina* em bezerros a partir do nascimento detectado pela reação em cadeia da polimerase. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 3, p. 721-730, 2008.

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

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

SCHEFFER, R.F. *Quimioprofilaxia e desenvolvimento de imunidade para tristeza parasitária bovina*. 2013. 36p. Trabalho de conclusão de curso (Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, p. 20-25, 2016.

SILVA, J.B.; FONSECA, A.H. Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the peripartum. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 46, p. 461-465, 2014.

SILVA, M.G.Q. *Avaliação da taxa de infecção de teleóginas de Boophilus microplus (CANESTRINI, 1887) por Babesia bovis e Babesia bigemina em área endêmica em Minas Gerais, Brasil*. 2003. 119p. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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.

SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, E. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). *Transbound. Emerg. Dis.*, v.59, p.353-360, 2012.

SILVESTRE, B.T.; SILVEIRA, J.A.G.; MENESES, R.M.; FACURY FILHO, E.J.; CARVALHO, A.U.; RIBEIRO, M.F.B. Identification of a vertically transmitted strain from *Anaplasma marginale* (UFMG3): Molecular and phylogenetic characterization, and evaluation of virulence. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, p. 80-84, 2016.

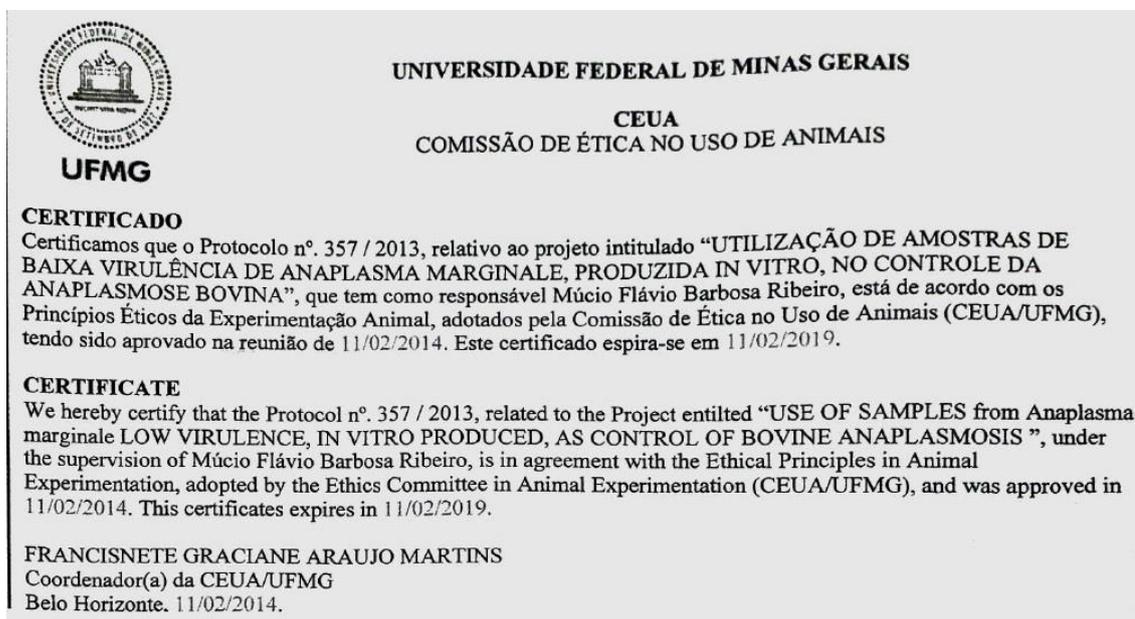
UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. *Veterinary Parasitology*, v.138, p.3-10, 2006.

VIDOTTO, O. *Complexo Carrapato-Tristeza Parasitária e outras parasitoses de bovinos*. Núcleo Pluridisciplinar de Pesquisa e Estudo da Cadeia Produtiva do Leite. 2005. Disponível em: <www.nupel.uem.br/pos-ppz/complexo-08-03.pdf>. Acessado em: 30 mar. 2014.

VIEIRA, M.I.B. *Resposta imune humoral contra Babesia bovis (Babés, 1888), Babesia bigemina (Smith & Kilborne, 1893) e Anaplasma marginale (Theiler, 1910) em bovinos submetidos a distintos métodos de controle do carrapato Boophilus microplus (Canestrini, 1887) na região de Bagé, RS*. 2002. 83p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

WANER, T.; MAHAN, S.; KELLY, P.; HARRUS, S. Rickettsiales. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 4 ed, 2011, p. 589-621.

9. ANEXOS



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