

WAGNER JOSÉ NASCIMENTO PORTO

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DAS INFECÇÕES POR *Babesia bovis* (BABES, 1888),
Babesia bigemina (SMITH e KILBORNE, 1893) e *Anaplasma marginale* (THEILER,
1910) EM BOVINOS NO ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL**

RECIFE

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

WAGNER JOSÉ NASCIMENTO PORTO

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DAS INFECÇÕES POR *Babesia bovis* (BABES, 1888),
Babesia bigemina (SMITH e KILBORNE, 1893) e *Anaplasma marginale* (THEILER,
1910) EM BOVINOS NO ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador:
Prof. Dr. Leucio Câmara Alves

RECIFE

2007

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

P853i Porto, Wagner José Nascimento
Inquérito sorológico das infecções por *Babesia bovis* (Babes, 1888), *Babesia bigemina* (Smith e Kilborne, 1893) e *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em bovinos no Estado de Alagoas, Brasil / Wagner José Nascimento Porto. -- 2007.
67 f. : il.

Orientador : Leucio Câmara Alves
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. *Babebiose*
 2. *Anaplasmosose*
 3. Tristeza parasitária bovina
 4. Epizootiologia
 5. Sorologia
 6. ELISA
 7. Alagoas (BR)
- I. Alves, Leucio Câmara
II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DAS INFECÇÕES POR *Babesia bovis* (BABES, 1888),
Babesia bigemina (SMITH e KILBORNE, 1893) e *Anaplasma marginale* (THEILER,
1910) EM BOVINOS NO ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL**

Tese de Doutorado elaborada por

WAGNER JOSÉ NASCIMENTO PORTO

Aprovada em 09/02/2007

BANCA EXAMINADORA

Dr. Leucio Câmara Alves
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dr. Nicolau Maués da Serra Freire
Fundação Oswaldo Cruz – RJ

Dr. Flávio Ribeiro de Araújo
Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte - MS

Dra. Marta Pedrosa Souto Maior
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – AL

Dra. Adriana Soares Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – PE

Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Departamento de Medicina Veterinária -UFRPE

“Sonhar mais um sonho impossível. Lutar quando é fácil ceder. Vencer o inimigo invencível. Negar quando a regra é vencer. Sofrer a tortura implacável, romper a incabível prisão, voar no limite improvável. Tocar o inacessível chão. É minha lei, é minha questão, virar este mundo, cravar esse chão. Não me importa saber, se é terrível demais. Quantas guerras terei que vencer por um pouco de paz.

E amanhã se esse chão que beijei, for meu leito e perdão. Vou saber que valeu delirar e morrer de paixão. E assim, seja lá como for, vai ter fim, a infinita aflição. E o mundo vai ver uma flor brotar do impossível chão”.

(Joe Quest/Mitch Leigh, versão Chico Buarque e Ruy Guerra).

Dedico aos meus pais, Pedro de Azevedo Porto (*in memoriam*) e Marilene Melo Nascimento Porto (*in memoriam*), responsáveis por essa conquista.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pelo milagre da vida.
- Aos meus irmãos e sobrinhos, pelo amor que nos une e nos torna mais fortes.
- Ao Dr. Leucio Câmara Alves, orientador e amigo, pela confiança e oportunidade que me foi dedicada.
- Ao Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, pela valiosíssima ajuda na execução dos experimentos.
- Ao Dr. Rinaldo Aparecido Mota, pelos ensinamentos, colaborações e disposição em ajudar, sempre com um sorriso no rosto, simplicidade e humildade.
- À Dra. Marta Pedrosa Souto Maior, exemplo de força e coragem, pelo incentivo nos momentos mais difíceis dessa conquista.
- À amiga Flaviana Santos Wanderley, pelo apoio e pelas palavras de conforto nas horas certas, dando-me coragem para continuar a batalha.
- Ao amigo Silas Filho, pelas sempre oportunas, ajudas e conselhos.
- Aos amigos Elton Brandão, Flávio Gouveia e Wagner Mariano, pela grande amizade, aconchegante acolhida e agradável convívio em Campo Grande.
- À amiga Ana Lydia Vasco, companheira de jornada, pelos conselhos e experiências compartilhadas.
- Aos professores, acadêmicos e técnicos do Centro de Estudos Superiores de Maceió - CESMAC, que direta ou indiretamente ajudaram na realização desse trabalho.
- Aos amigos Carlos Alberto Ramos e Elaine de Pádua sem os quais eu não teria conseguido realizar este trabalho.
- A todos que fazem o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte, pela ajuda na execução desse trabalho.
- À Embrapa Gado de Corte, pela possibilidade da realização deste trabalho;
- Ao CNPq, pelo incentivo financeiro para a execução desse trabalho.

RESUMO

A prevalência de anticorpos séricos para infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* foram investigados em bovinos das Mesorregiões do Agreste, Leste e Sertão do Estado de Alagoas, Brasil. Amostras de soro de 1155 bovinos provenientes de 26 propriedades foram analisadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados mostraram que 70,22% (811/1155) dos animais foram sororreagentes para *B. bovis*, 77,40% (894/1155) para *B. bigemina* e 27,45% (317/1155) foram positivos à infecção por *A. marginale*, o que evidencia que o Estado de Alagoas pode ser classificado como área de instabilidade enzoótica para *B. bovis* e *A. marginale*, e estabilidade enzoótica para *B. bigemina*. A prevalência da infecção por *Babesia* sp foi mais alta ($p < 0,05$) em rebanhos de corte do que nos rebanhos leiteiros ou de aptidão mista. Com relação à infecção por *Anaplasma marginale* houve diferença não significativa. Conclui-se que medidas preventivas devem ser adotadas especialmente nas áreas de instabilidade enzoótica.

Palavras-chave: Babesiose, Anaplasnose, Epizootiologia, ELISA.

ABSTRACT

The prevalence of serum antibodies to *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* infections were investigated in cattle farming herds from three regions called Sertão, Agreste and Leste of Alagoas State, Brazil. Sera samples from 1,155 cattle raised in 26 farms were evaluated by enzyme immunoassay (indirect ELISA). At the same time a questionnaire survey was conducted in the data were also analyzed. According to the results, 70.22% (811/1155) of the animals were positive for *B. Bovis* and 77.40% (894/1155) for *B. bigemina* and 27.45% (317/1155) of the animals were positive for antibodies against *A. marginale*. The seroprevalence showed that the State of Alagoas is considered enzootically unstable for *B. bovis* and *A. marginale* enzootically stable for *B. bigemina*. The prevalence of *Babesia* sp infection was higher ($p < 0.05$) in beef cattle than for dairy cattle and mixed herds. Regarding the infection by *A. marginale*, antibodies levels were more elevated in dairy cattle than others kind of rearing, but this difference was not significant. It is concluded that preventive measures should be adopted especially unstable areas.

Keywords: Babesiosis, Anaplasmosis, Epizootiology, ELISA.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 Localização dos Municípios Estudados nas Mesorregiões do Estado de Alagoas, 2007 46

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 Localização dos Municípios Estudados nas Mesorregiões do Estado de Alagoas, 2007 58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1	Distribuição dos animais estudados de acordo com a procedência e o sexo, 2007	46
----------	---	----

CAPÍTULO 2

TABELA 1	Prevalência de bovinos sororeagentes para <i>Anaplasma marginale</i> , segundo idade, nas regiões do Agreste, Leste e Sertão Alagoano, 2007	60
TABELA 2	Prevalência de bovinos sororeagentes para <i>Anaplasma marginale</i> , segundo sexo, nas regiões do Agreste, Leste e Sertão Alagoano, 2007	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	<i>Babesia sp</i>	15
3.1.1	Agente Etiológico	15
3.1.2	Ciclo Evolutivo	15
3.1.3	Epizootiologia e Controle da Babesiose Bovina	16
3.1.4	Patogenia e Sinais Clínicos	19
3.1.5	Diagnóstico	20
3.2	<i>Anaplasma marginale</i>	21
3.2.1	Agente Etiológico	21
3.2.2	Ciclo Evolutivo	22
3.2.3	Epizootiologia e Controle da Anaplasnose Bovina	23
3.2.4	Patogenia e Sinais Clínicos	26
3.2.5	Diagnóstico	27
	REFERÊNCIAS	28
4	CAPÍTULO 1	
	Prevalência de anticorpos anti- <i>Babesia bovis</i> e anti- <i>Babesia bigemina</i> em bovinos do Estado de Alagoas	43

5	CAPÍTULO 2	
	Inquérito sorológico da infecção por <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos no Estado de Alagoas	55
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67

1 - INTRODUÇÃO

A babesiose bovina é uma hemoparasitose causada por protozoários parasitas do gênero *Babesia*, assim como a anaplasmosose pela riquetsia *Anaplasma marginale*, ambos microrganismos intraeritrocitários. São enfermidades transmitidas por artrópodes hematófagos e estão disseminadas em todo o mundo, ocorrendo em extensas áreas da Austrália, África, América Central e do Sul e Estados Unidos. Mais de 1,2 bilhões de bovinos em todo o mundo estão expostos ao risco de desenvolverem a doença (McCOSKER, 1981).

Os custos resultantes às perdas produtivas e controle da babesiose e anaplasmosose para a pecuária na Austrália foram estimados em mais de 16 milhões de dólares por ano e em outros países como Kenya, Zimbábue, Tanzânia, África do Sul, China, Índia, Indonésia e Filipinas, os custos foram, em média, de 15 milhões de dólares anuais (BOCK, 2004).

No Brasil, as perdas econômicas relacionadas a estas enfermidades atingem 500 milhões de dólares anuais, segundo estimativas do Ministério da Agricultura, atualizadas por Grisi et al. (2002). Esses custos estão relacionados a tratamentos dos animais doentes, ao controle dos vetores, manejo e prevenção das enfermidades.

Os fatores que favorecem a infecção e disseminação da doença são raça, idade, situação imunológica, manejo e a presença do vetor. No Brasil, o agente transmissor de *Babesia* sp é o carrapato *Boophilus microplus* e para *A. marginale*, além desse carrapato, o agente também pode ser transmitido por moscas e mosquitos hematófagos (DICMANS, 1950; HAWKINGS et al., 1982; WANDURAGALA e RISTIC, 1993), além da via transplacentária (ZAUG e KUTTLER, 1984; RIBEIRO et al., 1995; KESSLER, 2001) e iatrogênica (GUGLIELMONE et al., 1997).

Alguns inquéritos soropidemiológicos foram realizados anteriormente em várias regiões do Brasil em diferentes sistemas de produção. A situação é bastante variável nas diversas regiões do Brasil (MADRUGA et al., 1983; RIBEIRO et al., 1984; ALVES, 1987; SALCEDO et al., 1987; LINHARES, 1992; OLIVEIRA et al., 1992; MADRUGA et al., 1993; ARTILES et al., 1995; VIDOTTO et al., 1997; ARAÚJO et al., 1997, 1998; SOARES et al., 2000; SOUZA et al., 2000; MADRUGA et al., 2001; MELO et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SOUZA et al., 2001; BARROS et al., 2005; MELO, 2005) em função das condições edafoclimáticas próprias de cada região, que atuam como fatores determinantes de pressão sobre as populações de carrapatos vetores e, dessa forma, condicionam características epidemiológicas locais (MAHONEY e ROSS, 1972).

Além disso, outros fatores podem interferir nas diferentes prevalências observadas como o antígeno utilizado (MADRUGA et al., 2000), a sensibilidade e especificidade do teste sorológico empregado (ROSS e LOHR, 1968; MEHLITZ e EHRET, 1974; FUJINAGA et al., 1981; MOLLOY et al., 1988; MOLLOY et al., 1998), a endemicidade de cada local (MADRUGA et al., 2001), além de outros fatores inerentes ao hospedeiro vertebrado (BOCK et al., 1999; MADRUGA et al., 2001; CARRIQUE MAS et al., 2000; BOCK et al., 2004).

Considerando-se a importância destes agentes para criações de bovinos em todo o país e a ausência de dados epidemiológicos no estado de Alagoas, assim como a necessidade de se conhecer a prevalência e distribuição da doença para fins de auxiliar na implantação de medidas de controle, objetivou-se com este estudo realizar um inquérito soropidemiológico das enfermidades no referido Estado.

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL:

- Avaliar a situação epidemiológica da infecção por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bovinos provenientes do Estado de Alagoas.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Calcular a prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos provenientes do Estado de Alagoas;
- Calcular a prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos provenientes do Estado de Alagoas;

3 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – *Babesia* sp

3.1.1 – Agente etiológico

Inicialmente Babes (1888) observou no sangue de bovinos doentes na Romênia, microrganismos que se assemelhava muito a bactérias. O parasito naquela época foi denominado *Haematococcus bovis*, hoje conhecido como *Babesia bovis*.

Em 1893, Smith e Kilborne estudando a etiologia e a epidemiologia da “Febre do Texas” que ocorria no sul dos Estados Unidos em bovinos, identificaram como agente causal da doença um protozoário que recebeu a denominação de *Pyrosoma bigeminum*, mais tarde re combinado para *Babesia bigemina*, cuja transmissão era realizada por um artrópode, o carrapato do boi, *Boophilus annulatus*.

O gênero *Babesia* está classificado no Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Piroplasmorina e Família Babesiidae (LEVINE, 1971, 1985; ALLSOPP et al., 1994).

Na dependência dos aspectos morfológicos destes agentes, dois grupos de *Babesia* são reconhecidos: aquelas chamadas grandes, cujos corpos piriformes medem entre 2,5 - 4,5 x 2,5 μm e as pequenas com tamanho de 0,4 - 1,5 x 1,5 μm . Atualmente encontram-se descritas mais de 100 espécies de *Babesia* parasitando diferentes espécies animais; no entanto, *B. bigemina* e *B. bovis* são as únicas encontradas infectando bovinos no Brasil, sendo transmitidas pelo carrapato *Boophilus microplus* (VANZINI e RAMIRES, 1995).

3.1.2 – Ciclo evolutivo

As espécies de *Babesia* são heteroxenas, ou seja, necessitam de dois hospedeiros para completar o ciclo biológico, o bovino e o carrapato; no bovino, hospedeiro vertebrado, ocorre somente reprodução assexuada dos protozoários e no carrapato, hospedeiro invertebrado, ocorre tanto reprodução assexuada como sexuada (FRIEDHOFF, 1988).

A fêmea do carrapato se infecta com *Babesia* no final do estágio parasitário em bovino infectado. No intestino do carrapato inicia-se a reprodução sexuada dando origem aos

oocinetos que invadem todos os órgãos do carrapato, inclusive ovários, num processo contínuo de divisão assexuada. Através da infecção dos ovários, os oocinetos passam aos ovos e larvas, configurando a transmissão transovariana, de geração a geração. O processo de esporogonia continua nas larvas, invadindo também todos os órgãos, inclusive as células da glândula salivar, onde são produzidos os esporozoítos que serão transmitidos aos bovinos por ocasião do parasitismo do carrapato (FRIEDHOFF, 1988).

Nos bovinos, os esporozoítos vão diretamente parasitar os eritrócitos, se transformando em trofozoítos que por reprodução assexuada formam novos parasitos, os merozoítos, que invadem novas células e assim sucessivamente (FRIEDHOFF, 1988). Como consequência das sucessivas merogonias o hospedeiro bovino poderá ou não apresentar a doença clínica, dependendo de vários fatores entre os quais, a virulência do parasito, a quantidade de inóculo e o nível de resistência do hospedeiro.

A destruição de eritrócitos por *Babesia* sp continua até que o hospedeiro morra ou, por tratamento ou processo imunológico, elimine ou diminua a parasitemia, passando a ser um portador sadio (JOYNER e DONNELLY, 1979).

3.1.3 - Epizootiologia e controle da babesiose bovina

Na babesiose bovina a transmissão dos bioagentes dá-se principalmente por meio de carrapatos infectados, as formas infectantes (esporozoítos) são inoculadas diretamente na circulação durante o repasto sanguíneo (VILORIA e SALCEDO, 2004).

A transmissão de *Babesia* sp é influenciada por vários fatores que interferem na etologia destes parasitos, entre eles: clima; raça, idade e manejo do hospedeiro; uso de carrapaticidas e presença de agricultura na região. Caso ocorra um desequilíbrio nos componentes do ciclo: parasito, hospedeiro e vetor, o quadro clínico ou subclínico pode se estabelecer nos rebanhos (FRIEDHOFF e SMITH, 1981).

A importância econômica da babesiose bovina no Brasil varia de uma região para outra, dependendo principalmente das condições climáticas para disseminação da doença e da adoção de práticas de manejo (GRISI et al., 2002).

Vários estudos soropidemiológicos foram realizados no Brasil e diferentes taxas de prevalências foram observadas nas diversas regiões do país. Alves (1987) observou a prevalência de 87,9% de animais reagentes a *B. bigemina* e 27,9% para *B. bovis* no município de Garanhuns, Pernambuco; Araújo et al. (1997) relataram taxas de bovinos com sorologia

positiva para *B. bovis* e *B. bigemina* acima de 91% no Estado da Bahia; Barros et al. (2005) encontraram em Senhor do Bonfim e Euclides da Cunha, na Bahia, prevalências acima de 86% para *B. bovis* e *B. bigemina*; Linhares (1992), detectou uma prevalência de 98,72% para *B. bovis* e 97,45% para *B. bigemina* no Município de Goiânia e Santos et al. (2001) observaram a prevalência de 98,9% e 93,3% para *B. bovis* e *B. bigemina* na Microrregião de Goiânia; Salcedo et al. (1987) observaram na Zona da Mata de Minas Gerais a prevalência de 79,04 e 82,53% para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente; Artiles et al. (1995) encontraram 74% dos animais reagentes para *B. bovis* e 87% para *B. bigemina* em Bagé no Rio Grande do Sul.

Mahoney (1972) descreveu três situações epizootiológicas:

Áreas enzoóticas - locais onde as condições climáticas permitem a presença do carrapato durante praticamente todo o ano, sendo a *Babesia* sp continuamente inoculada nos animais a partir do nascimento, quando são mais resistentes, permitindo que estes não adoçam e desenvolvam uma imunidade específica suficiente, o que os tornará adultos resistentes. Nestas regiões, normalmente não ocorrem casos clínicos de babesiose nos animais nativos, são áreas de estabilidade enzoótica.

Áreas epizoóticas - onde as condições climáticas ou questões de manejo e controle de carrapato não permitem a presença constante deste, não há transmissão contínua dos protozoários aos bovinos, estes podem passar a fase jovem sem serem inoculados, não desenvolvendo imunidade específica adequada e tornando-se adultos sensíveis. Estas regiões são conhecidas como epizoóticas, instáveis ou de instabilidade enzoótica, ou seja, pode ocorrer surto da doença clínica, com grande número de mortes.

Áreas livres - que não oferecem condições para manutenção da população de carrapatos, devido às condições climáticas adversas, não ocorrendo casos de babesiose, como em regiões do extremo Sul do Brasil e da Argentina, onde ocorre um longo período de frio responsável pela ausência do carrapato, tornando os animais totalmente desprotegidos, sem anticorpos, por não terem contato com *Babesia* sp.

A babesiose na maioria do território brasileiro caracteriza-se por estabilidade enzoótica. Entretanto, esta situação epizootiológica não impede que esta enfermidade cause prejuízos acima de 250 milhões de dólares anuais no Brasil (MADRUGA et al., 2001). O conhecimento e o controle do estado imunológico dos animais é extremamente importante para que se possa decidir quais os métodos de controle e imunização devem ser utilizados (YOUNG, 1988).

Conforme Guglielme (1995), dependendo da raça explorada, manejo, níveis de infestações do carrapato *B. microplus*, áreas consideradas estáveis podem tornar-se instáveis e vice-versa. Certas práticas de manejo, como a diminuição das populações de carrapato por excesso de uso de acaricidas, conseqüentemente diminuindo a transmissão de hemoprotozoários, ou até mesmo por falhas no tratamento com o aumento da taxa de infecção do carrapato, podem acarretar surtos de babesiose se os animais não estiverem devidamente protegidos (SOLARI e QUINTANA, 1994).

A elaboração de estratégias adequadas de controle depende, principalmente, de informações sobre a epidemiologia da babesiose, especialmente na dinâmica da transmissão pelo carrapato (MORZARIA et al., 1992). O controle da babesiose é realizado através do tratamento químico específico ou controle através da quimioprofilaxia ou imunoprofilaxia. O tratamento químico é realizado com drogas babesicidas derivadas da diamidina como o diaceturato de diminazina ou com dipropionato de imidocarb. O controle profilático está baseado em medidas de controle/imunização do rebanho utilizadas para evitar o aparecimento da doença (VANZINI e RAMIREZ, 1995). Estas medidas são as vacinas, premunição, quimioprofilaxia, além de técnicas de manejo de animais e de campo que envolvam cuidados com a distribuição do vetor, hospedeiro e com o ambiente (FRIEDHOFF e SMITH, 1981), de maneira a assegurar a imunidade e/ou proteção do rebanho (GUGLIELMONE, 1995).

A premunição é um método que foi e ainda é muito utilizado; consiste na inoculação de sangue de bovinos portadores de *Babesia* sp em animais sensíveis com objetivo de induzir a resposta imune. Existe o risco de inocular outros agentes infecciosos, induzir a auto-imunidade, bem como provocar reações graves nos animais pela virulência da cepa ou número elevado de parasitos inoculados (SILVA e LIMA, 1995).

A quimioprofilaxia é uma maneira de imunizar os animais com a utilização de químicos como, por exemplo, o dipropionato de imidocarb e subsequente exposição dos animais à infestação pelo carrapato de maneira constante. A proteção química dura em torno de 28 dias, sendo necessário garantir uma infestação de carrapatos logo após a utilização da droga para o desenvolvimento da resposta imune (KUTTLER e JOHNSON, 1996).

Nas áreas endêmicas, ou seja, com condições climáticas que permitam o desenvolvimento normal do carrapato durante todo ano, deve-se evitar a superinfestação por carrapatos, através de um manejo eficaz, como por exemplo, a aplicação de banhos estratégicos (MAHONEY, 1962a). Em regiões estáveis, é importante que os bezerros sejam expostos à infestação pelo carrapato para que se tornem adultos imunes, constituindo uma medida profilática natural (MAHONEY e ROSS, 1972). Anualmente a imunidade deve ser

reforçada através de infestações leves dos bovinos com o vetor para propiciar uma situação de estabilidade com risco mínimo (VANZINI e RAMIREZ, 1995).

Em áreas de instabilidade enzoótica o controle é mais difícil, uma vez que as condições climáticas oferecem simultaneamente, condições favoráveis e desfavoráveis de sobrevivência tanto para os agentes como para os vetores, consideradas áreas marginais (MAHONEY e ROSS, 1972). Nestas regiões, por serem instáveis, podem ocorrer estímulos de infecções inconstantes, insuficientes para produzir imunidade no rebanho, o que traz grandes possibilidades de surtos (SOLARI e QUINTANA, 1994).

Conforme YOUNG (1988), nas regiões instáveis o conhecimento do estado imunológico do rebanho é importante para poder decidir pela utilização, ou não, de métodos de controle e imunização. Nas áreas livres deve-se evitar a entrada de agentes e vetores, os quais podem provocar surtos, bem como os animais destas áreas, devem ser protegidos antes de serem transportados para regiões endêmicas (VANZINI e RAMIREZ, 1995).

3.1.4 - Patogenia e sinais clínicos

Nos animais infectados por *Babesia* sp, a multiplicação dos protozoários ocorre nos eritrócitos o que pode levar a desencadear a aumento da fragilidade osmótica (LOSOS, 1986a) e hemólise intravascular, principalmente na infecção por *B. bigemina*. Usualmente a anemia resultante da infecção inicialmente é normocítica normocrômica podendo na fase aguda apresentar-se macrocítica hipocrômica correspondendo ao aparecimento de reticulócitos.

Anemia, icterícia e hemoglobinúria podem ser resultantes da intensa hemólise intravascular. Os achados de necropsia revelam membranas mucosas pálidas e ictericas, hepatomegalia, distensão da vesícula biliar e bexiga, além de congestão dos rins e edema pulmonar (PANDEY e MISHRA, 1977).

Inicialmente, a infecção por *Babesia* sp causa doença clínica caracterizada por febre (40-41°C), anorexia, depressão, palidez das mucosas, icterícia, hemoglobinúria e sinais de incoordenação (LOSOS, 1986a).

A doença causada por *B. bigemina* encontra-se associada ao aparecimento de membranas mucosas pálidas, hemoglobinúria, icterícia, aumento da frequência respiratória, além de diarreia ou constipação (LOSOS, 1986a; BOCK, 2004).

Na infecção por *B. bovis* a liberação de citocinas e outros agentes desempenham importante papel na gênese da doença (BOCK et al., 2004) na vasodilatação, hipotensão, aumento da permeabilidade capilar, edema, coagulação intravascular disseminada e estase sanguínea (AHMED, 2002).

Particularmente, a estase sanguínea é resultante da agregação de eritrócitos parasitados, o que leva ao aparecimento de sinais nervosos, respiratórios e doença renal (LOSOS, 1986a; VILORIA e SALCEDO, 2004).

A doença cerebral é o aspecto mais importante da infecção por *B. bovis*, e pode ser caracterizada por incoordenação, ataxia, coma e morte (VILORIA e SALCEDO, 2004).

3.1.5 – Diagnóstico

Para o diagnóstico da infecção por *Babesia* sp devem ser levados em conta dados epizootiológicos, sinais clínicos, exames laboratoriais e lesões observadas na necropsia. No caso de animais com sinais clínicos, surtos ou mortes, o mais importante é o diagnóstico clínico, imediato, através da avaliação dos sintomas como: febre, anemia, icterícia, anorexia, hemoglobinúria e sintomas nervosos. O diagnóstico pelos sinais clínicos é relativamente simples, porém muitas vezes a doença se apresenta de forma super aguda, onde os sintomas nem sempre são identificados. Além disso, a avaliação dos sinais clínicos de forma isolada não permite um diagnóstico específico, já que os sintomas podem ser comuns a outras enfermidades (MADRUGA et al., 1986).

Para um diagnóstico de certeza deve-se fazer uma avaliação dos sinais clínicos e dos resultados dos exames laboratoriais (KESSLER e SCHENK, 1998). O exame laboratorial direto identifica o agente intraeritrocitário, através de estiraços de sangue periférico dos animais infectados, colhidos da ponta da cauda, orelha e até mesmo da veia jugular, obtendo um diagnóstico de certeza e específico (BÖSE et al., 1995). Também faz parte do exame laboratorial, estimar a porcentagem de eritrócitos, através da técnica do microhematócrito (KESSLER et al., 1992). O esfregaço sanguíneo ainda é o método de diagnóstico mais apropriado para a detecção de um animal portador de hemoparasitos na fase aguda da doença, porém torna-se inviável em estudos epidemiológicos para a identificação de animais portadores sadios (ALMERIA et al., 2001).

O diagnóstico epidemiológico é de grande valia para verificar a presença e intensidade do agente no ambiente, através da identificação de animais portadores sadios, permitindo a

programação de medidas profiláticas adequadas (MAHONEY, 1972). A identificação dos animais cronicamente infectados, ou seja, sem apresentar sintomatologia clínica, pode ser feita de maneira indireta ou direta.

O imunodiagnóstico através de testes sorológicos é capaz de verificar a presença e intensidade de anticorpos específicos no soro dos animais e serve indiretamente como indicador da presença do agente (MAHONEY, 1962b). Segundo Böse et al. (1995), muitos testes têm sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos para *Babesia* sp; entretanto, três são rotineiramente mais utilizados: os testes de Imunofluorescência Indireta, ELISA e Fixação de Complemento. Cada prova sorológica apresenta vantagens e desvantagens, conforme seu nível de sensibilidade, especificidade, fácil execução e custo (WEILAND e REITER, 1988).

As técnicas sorológicas de rotina, particularmente, Imunofluorescência Indireta, oferece alguns inconvenientes como a subjetividade do operador durante a leitura, número limitante de amostras e nem sempre é muito específica (BÖSE et al., 1995), bem como em algumas situações, os animais podem apresentar resultados positivos sem apresentar a infecção, como no caso de anticorpos colostrais em animais jovens ou quando tenham sido esterilizados por quimioterapia (JOHNSTON et al., 1973; MAHONEY, et al., 1979).

Com os avanços da biologia molecular, as novas técnicas de diagnóstico oferecem algumas vantagens em relação aos testes sorológicos mais utilizados, pois são mais específicos e sensíveis, permitindo que as medidas de controle sejam adotadas com maior segurança (GASSER, 1999).

3.2 - *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910)

3.2.1 – Agente etiológico

Dumler et al. (2001) propuseram a reorganização da Ordem Rickettsiales, baseando-se em análises de seqüências de ácidos nucléicos, propriedades antigênicas, ecologia, distribuição geográfica e patogenia.

Baseado no dendograma apresentado por Dumler et al. (2001), *Anaplasma marginale* está classificado no Reino Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria e Ordem Rickettsiales. O gênero *Anaplasma*, que pertence a Família Anaplasmataceae, consiste num organismo intracelular obrigatório, encontrado exclusivamente dentro de vacúolos no citoplasma da célula do hospedeiro (RISTIC, 1968; DUMLER et al., 2001).

O gênero *Anaplasma* inclui organismos Gram-negativos, pequenos, geralmente pleomórficos, cocóides a elipsoidais que residem em vacúolos citoplasmáticos, isoladamente, ou mais freqüentemente, formando inclusões compactas (mórulas). Estão presentes em células hematopoiéticas maduras ou imaturas, particularmente células mielóides e neutrófilos, incluindo eritrócitos, no sangue periférico ou tecidos, usualmente em órgãos ricos em fagócitos mononucleares (baço, fígado e medula óssea) de hospedeiros mamíferos.

São imóveis e não cultiváveis em meio livre de células causando doenças em canídeos, humanos e ruminantes, como bovinos, caprinos e ovinos e seus vetores, quando conhecidos, são carrapatos (DUMLER et al., 2001).

A. marginale infecta eritrócitos de bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos, além de uma variedade de ruminantes silvestres (WANDURAGALA e RISTIC, 1993). Em bovinos, duas espécies estão envolvidas na patogênese da anaplasmoze, *A. marginale* considerada a espécie mais patogênica e *A. centrale* que causa infecção moderada em bovinos. Etmologicamente, o termo “Anaplasma” foi sugerido em razão do agente à microscopia de luz, aparentar-se desprovido de citoplasma, enquanto os termos *marginale* e *centrale* indicam sua localização periférica e central dentro dos eritrócitos, respectivamente (RISTIC, 1968).

Existem duas amostras de *A. marginale* morfologicamente distintas, uma apresentando estrutura denominada apêndice ou cauda e outra com ausência desta estrutura (RISTIC, 1968; KOCAN et al., 1978). Os apêndices de *A. marginale* geralmente não são visualizados por métodos convencionais de coloração, como Giemsa e Wright, sendo necessários métodos especiais, como “novo azul de metileno”, microscopia de imunofluorescência ou de contraste de fase (RIBEIRO e LIMA, 1996).

3.2.2 - Ciclo evolutivo

A infecção por *A. marginale* no bovino inicia-se com a penetração dos corpos iniciais nos eritrócitos por meio do processo denominado rofeocitose, o qual envolve invaginação da membrana citoplasmática formando o vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo, os corpos iniciais multiplicam-se por divisão binária e/ou processo de brotamento, originando até oito corpúsculos (RISTIC, 1968; RIBEIRO e LIMA, 1996).

O ciclo evolutivo de *A. marginale* em carrapatos é complexo e é coordenado com o ciclo de alimentação dos artrópodes (KOCAN et al., 1992). Os eritrócitos infectados ingeridos pelo carrapato no repasto sangüíneo são a fonte de infecção de *A. marginale*. Após o

desenvolvimento da riquetsia nas células intestinais, outros tecidos do carrapato tornam-se infectados, como a glândula salivar, a partir da qual, as riquetsias são transmitidas para vertebrados durante a alimentação (KOCAN et al., 1992; GE et al., 1996). Os bovinos se tornam infectados quando as formas densas são transmitidas durante a alimentação dos carrapatos, via glândula salivar (KOCAN et al., 2003).

Durante o curso da infecção o número de eritrócitos infectados aumenta exponencialmente, e os bovinos que se recuperam da infecção aguda permanecem persistentemente infectados, servindo como reservatório para transmissão mecânica ou biológica desta riquetsia (KIESER et al., 1990; KOCAN et al., 1992; ERIKS, 1993).

3.2.3 - Epizootiologia e controle da anaplasmosse bovina

A transmissão de *A. marginale* ocorre mecânica e biologicamente. A transmissão biológica é efetuada por carrapatos ixodídeos, e aproximadamente 20 espécies foram citadas como vetores (DIKMANS, 1950; EWING, 1981). A transmissão por carrapatos pode ocorrer estágio a estágio (transestadial) ou por um mesmo estágio (intra-estadial) (KOCAN et al., 2003). A transmissão intra-estadial é efetuada por carrapatos machos. Estudos mostraram que os machos de *Dermacentor* desempenham um importante papel na transmissão biológica, pois se tornam persistentemente infectados com a riquetsia, podendo transmiti-la repetitivamente quando se transferem entre bovinos (KOCAN et al., 1992), funcionando, desta forma, como reservatórios.

Os carrapatos adquirem o parasito quando se alimentam em bovinos nas fases aguda (80%) ou crônica (27%) da infecção (ERIKS et al., 1993).

A transmissão mecânica frequentemente ocorre via fômites contaminados com sangue, como agulhas, instrumentos de descorna e de tatuagem, aparatos de colocação de brincos, e instrumentos de castração (KOCAN et al., 2003). Também é realizada por dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus*, *Stomoxys* e *Culex* (EWING, 1981; POTGIETER et al., 1981; FOIL, 1989), sendo considerada a principal forma de disseminação em áreas das Américas Central e do Sul e África onde carrapatos vetores não ocorrem (EWING, 1981; FOIL, 1989).

Em adição às formas de transmissão descritas, o agente pode ser transmitido *in utero*, a partir do segundo trimestre de gestação (ZAUGG e KUTLER, 1984; ZAUGG, 1985). Na

África do Sul, esse tipo de transmissão ocorreu em 15,6% dos casos (POTGIETER e RENSBURG, 1987).

Alguns fatores relacionados principalmente com idade, imunidade, taxa de inoculação de *A. marginale* pelos vetores, clima, manejo, raça, têm sido apontados na epizootiologia da anaplasnose bovina (RISTIC, 1968; ALONSO et al., 1992; WANDURAGALA e RISTIC, 1993; HUNGERFORD e SMITH, 1997).

Em áreas enzoóticas, com elevadas populações de vetores, a primo-infecção por *A. marginale* ocorre em bezerros, nos primeiros dias de vida, quando apresentam alterações clínicas e hematológicas menos severas (RIBEIRO e REIS, 1981). Numa população de animais susceptíveis, a mortalidade em decorrência da anaplasnose é maior em animais adultos (HUNGERFORD e SMITH, 1997). Sendo assim, Ross e Lohr (1970) sugeriram que os anticorpos colostrais sejam um dos fatores responsáveis pela resistência natural dos bezerros à infecção.

Além da imunidade passiva, essa resistência, ainda que não bem definida, está comumente associada a uma rápida resposta imunológica, particularmente à imunidade celular decorrente da persistência do timo (BUENING, 1973), à grande atividade eritropoiética da medula óssea (RISTIC et al., 1968) e a uma possível ação protetora da hemoglobina fetal (ANDERSON et al., 1972).

Outro fator importante na epizootiologia da anaplasnose consiste no número de vetores no ambiente. Em áreas onde ocorrem flutuações na população desses vetores, por condições climáticas desfavoráveis, manejo inadequado ou medidas de controle adotadas, os animais jovens não se infectam e, quando adultos, ao entrarem em contato com a riquétsia, sofrem doença clínica aguda. Portanto, nessa situação de instabilidade, os níveis de infestação dos vetores são baixos para a transmissão do agente, e geralmente as manifestações clínicas ocasionam altas taxas de mortalidade (MADRUGA et al., 1983, MELO et al., 2001).

Em relação à faixa etária, bezerros são menos susceptíveis a anaplasnose, desenvolvendo infecções brandas e imunidade persistente por toda a vida. Este fenômeno é pouco compreendido, mas a remoção do baço torna os bezerros novamente sensíveis à infecção, que é freqüentemente mais severa do que em animais mais velhos (KOCAN et al., 2003). A resistência de bezerros a anaplasnose está, pelo menos em parte, associada à ingestão de anticorpos colostrais. Nas áreas de estabilidade, devido à proteção adquirida nos primeiros meses de vida, apenas casos clínicos esporádicos são observados (PAYNE e OSORIO, 1990).

Com relação às raças, segundo Kuttler et al. (1970), Otim et al. (1980) e Wilson et al. (1980), existe menor grau de susceptibilidade dos zebuínos (*Bos indicus*) e os cruzamentos *Bos indicus* X *Bos taurus* está relacionado à seleção genética, pois estes animais apresentam menores infestações por carrapatos, sugerindo que são mais resistentes às infecções por *A. marginale*.

Ribeiro e Reis (1981) e Madruga et al. (1985) observaram que a prevalência de anticorpos anti-*A. marginale* independe do fator racial. Bock et al. (1997) também verificaram que tanto *Bos taurus* como *Bos indicus* são susceptíveis quando expostos à infecção por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*.

Como as elevadas morbidade e mortalidade causadas pela anaplasmose têm se constituído em sério problema para o desenvolvimento da pecuária brasileira, existe a necessidade de se estabelecer medidas de controle, a partir de informações epidemiológicas, capazes de diminuir os índices da doença, cujas prevalências chegam a atingir 64% dos bovinos em Bagé, Rio Grande do Sul (ARTILES et al., 1995), 86% em Santa Catarina (DALAGNOL et al., 1995), 67,4% em Londrina (VIDOTTO et al., 1997), 98,21% na Mesorregião do Médio Paraíba, Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2001), 91,16% na Mesorregião Norte Fluminense, Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2000), 81,10% na Zona da Mata de Minas Gerais (RIBEIRO et al., 1984), 55% na Região Metalúrgica de Minas Gerais (MELO et al., 2001), 96,92% na Mesorregião Goiânia (SANTOS et al., 2001), 96,9% na Bahia (ARAÚJO et al., 1998) , 16,3% em Sergipe (OLIVEIRA et al., 1992) e acima de 88% em Pernambuco (MELO, 2005).

Em áreas de estabilidade enzoótica, o controle da anaplasmose bovina é baseado na manutenção do equilíbrio enzoótico. O controle dos vetores transmissores deve ser realizado de modo a permitir o desenvolvimento de um nível de parasitismo nos bezerros antes do desaparecimento da imunidade passiva (GOMES, 1998).

Em situações de instabilidade enzoótica ou na importação de animais de áreas livres, o controle deve ser baseado na exposição da população ao risco (GOMES, 1998).

De forma geral, o controle da anaplasmose bovina consiste principalmente nos tratamentos quimioterápicos e/ou quimioprofiláticos, controle estratégico de vetores e imunização (PALMER, 1989; WRIGHT, 1990).

A imunização de animais é necessária para proteger os rebanhos em regiões onde os níveis de transmissão pelos vetores são elevados ou baixos, principalmente em rebanhos altamente susceptíveis, como os importados, provenientes de áreas livres para áreas

enzoóticas. Neste caso, os animais a serem vacinados devem ser mantidos livres de carrapatos durante o período de reação vacinal (KESSLER e SCHENCK, 1998).

3.2.4 - Patogenia e sinais clínicos

A patogenia da anaplasmosose está relacionada ao processo de fagocitose de eritrócitos aparentemente não infectados, juntamente com os infectados, devido a uma resposta auto-imune causada pela alteração da membrana eritrocitária pela riquetsia (RISTIC, 1968, KUTTLER, 1984, LOSOS, 1986b).

O período pré-patente da infecção varia com o número de organismos infectantes, estendendo-se de sete a 60 dias, com média de 28 dias (KOCAN et al., 2003). Após a infecção, o número de eritrócitos infectados aumenta geometricamente. As células parasitadas são subseqüentemente fagocitadas por macrófagos, principalmente no baço, resultando em anemia branda a severa e icterícia, sem ocorrência de hemoglobinemia ou hemoglobinúria (KOCAN et al., 2003). No curso da anemia induzida pela anaplasmosose não ocorre depressão da medula óssea. Ao contrário, os bovinos apresentam hiperplasia eritróide, que constitui um mecanismo compensatório (JATKAR e KREIER, 1967).

A anaplasmosose caracteriza-se clinicamente por anemia, temperatura elevada, variando entre 39°C e 41°C, anorexia, icterícia e apatia. Vacas em período de lactação apresentam repentina queda na produção e animais gestantes podem abortar devido a anóxia fetal (RISTIC, 1968; AJAYI et al., 1978; CORREA, et al. 1978; LOSOS, 1986b).

A intensidade da anemia não apresenta correlação com o grau de parasitemia, mas com a produção de anticorpos contra a membrana dos eritrócitos, constituindo-se, segundo Kuttler (1984), numa doença auto-imune.

Outros sinais clínicos são perda de peso, e letargia. A morte pode ocorrer principalmente em animais acima de dois anos de idade (AJAYI et al., 1978; KOCAN et al., 2003). Os animais que sobrevivem à fase aguda da anaplasmosose desenvolvem infecções persistentes e tornam-se reservatórios de *A. marginale* (KIESER et al., 1990; ERIKS et al., 1993).

3.2.5- Diagnóstico

A infecção aguda é diagnosticada com base no histórico, sinais clínicos, determinação do volume globular e demonstração da riquetsia intraeritrocítica em estiraços de sangue corados (ALVES, 1987; WANDURAGALA e RISTIC, 1993). Os estiraços sangüíneos são de difícil interpretação, devido à confusão com corpúsculos de Heinz, de Howell-Jolly, e de artefatos fixados ou de corantes (RISTIC, 1968).

Os animais que sobrevivem à infecção aguda e permanecem como portadores saudáveis, mantêm baixo nível de parasitemia, o que dificulta a detecção microscópica da riquetsia, sendo necessária a realização do diagnóstico por meio da detecção de anticorpos específicos por testes sorológicos, e/ou da identificação do DNA rickettsial no sangue utilizando técnicas moleculares (RICHEY, 1981; ZAUGG et al., 1986).

Várias técnicas sorológicas têm sido descritas para o diagnóstico da anaplasmoze bovina como aglutinação rápida em cartão (TC) (AMERAULT e ROBY, 1968; TODOROVIC et al., 1977), aglutinação em tubo capilar (AC) (RISTIC, 1962), aglutinação em microesferas de látex (AL) (RODGERS et al., 1988), fixação do complemento (FC) (TODOROVIC et al., 1977; GOFF et al., 1990), imunofluorescência indireta (IFI) (GONZALEZ et al., 1978; MONTENEGRO-JAMES et al., 1985), radioimunoensaio (RIA) (SCHUNTNER e LEATCH, 1988) e “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) (THOEN et al., 1980; KNOWLES et al., 1982; MONTENEGRO-JAMES et al., 1985; BARRY et al., 1986; DUZGUN et al., 1988; NAKAMURA et al., 1988; ALONSO et al., 1992).

Entre os testes sorológicos mais utilizados para imunodiagnóstico da anaplasmoze bovina, destacam-se a IFI e o ELISA (THOEN et al., 1980; WRIGHT, 1990; ALONSO et al., 1992; NIELSEN et al., 1996).

A IFI é considerada uma prova simples e sensível para detecção de animais infectados quando comparada com a TC (GONZALEZ et al., 1978; WRIGHT, 1990; BASTOS, et al., 2000). Esse teste vem sendo utilizado em estudos de soroprevalência da anaplasmoze em muitas regiões do mundo (KROON et al., 1990; WRIGHT, 1990; ALONSO et al., 1992; JORGENSEN et al., 1992), sendo também indicado para pesquisas onde são requisitadas titulações (WILSON et al., 1978; WRIGHT, 1990).

Embora a IFI seja uma das técnicas mais utilizadas, o teste ELISA apresenta maior sensibilidade e especificidade, além das vantagens de seus resultados poderem ser obtidos

diretamente através de um leitor automático, evitando problemas com interpretações dúbias comuns nas reações fraco-positivas observadas na IFI (GOFF e WINWARD, 1985; DUZGUN et al., 1988; NAKAMURA et al., 1988; KROON et al., 1990; NIELSEN et al., 1996).

REFERÊNCIAS

AHMED, J. S. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. **Parasitology Research**, New York, v.88, n.13, May 2002. Supplement 1.

AJAYI, S. A. et al. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. **Research Veterinary Science**, London, v. 25, n. 1, p. 76-81, 1978.

ALLSOPP, M. T. et al. Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, New York, v. 108, p. 147–152, 1994.

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

ALONSO, M. et al. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 11, n. 3, p. 713-733, 1992.

ALVES, L. C. **Prevalência da babesiose bovina em gado leiteiro no município de Garanhuns, Estado de Pernambuco**. 1987. 125f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

AMERAULT, T. E.; ROBY, T. O. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 153, p. 1828-1834, 1968.

ANDERSON, I. L. et al. *Anaplasma marginale*: hemoglobin patterns in experimentally infected young calves. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 32, n. 2, p. 265-271, 1972.

ARAÚJO, F. R. et al. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de congglutinação rápida. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 111-115, 1997.

ARAÚJO, F. R. et al. Frequência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 3, p. 243-246, 1998.

ARTILES, J. et al. Prevalência de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 2, supl. 1, p. 179, 1995.

BABES, V. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academic des Sciences**, Paris, v. 107, p. 692-694, 1888.

BARROS, S. L. et al. Serological survey of *Babesia Bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunoabsorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 6, p. 613-617, 2005.

BARRY, D. N. et al. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. **Australian Veterinary Journal**, Brunswich, v. 63, n. 3, p. 76-79, 1986.

BASTOS, P. A. S. et al. Avaliação das provas de IFI, ELISA e TCR na detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 125 - 127, 2000.

BOCK, R. E. et al. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 75, n. 5, p. 337-340, 1997.

BOCK, R. E. et al. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 77, n. 11, p. 748-751, 1999.

BOCK, R.; et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**. New Cork, v. 129, Suppl: p. 247-269, 2004. Supplement.

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

BUENING, G. M. Cell-mediated immune responses in calves with anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 34, n. 6, p. 757-763, 1973.

CARRIQUE MAS, J. J. et al. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 29-38, 2000.

CORREA, W. M. Et al. Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 42, n. 2, p. 227-228, 1978.

DALAGNOL, C. A. et al. Prevalência de anticorpos contra *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em bovinos de corte na região de clima Cfb. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 220, 1995. Supplement 1.

DIKMANS, G. The transmission of anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 11, p. 5-16, 1950.

DUMLER, J. S. et al. Reorganization of the 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**, Reading, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DUZGUN, A. et al. A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 29, p. 1-7, 1988.

ERIKS, I. S. et al. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, US, v. 31, p. 2091-2096, 1993.

EWING, S. A. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: NATIONAL ANAPLASMOSIS CONFERENCE, 7., 1981, Mississippi. **Proceedings...**: Mississippi State University, 1981.

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

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. cap. 2, p. 23-52.

FRIEDHOFF, K.T.; SMITH, R.D. Transmission of *Babesia* by ticks. In: RISTIC, M.,; KREIER, J.P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 267-321.

FUJINAGA, T. et al. Serological relationship between a large *Babesia* found in Japanese cattle and *Babesia major*, *B. bigemina* and *B. bovis*. **Research in Veterinary Science**, London, v. 29, p. 230-234, 1981.

GASSER, R. B. PCR - Based technology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 84, p. 229-258, 1999.

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

GOFF, W. L., WINWARD, L. D. Detection of geographic isolates of *Anaplasma marginale*, using polyclonal bovine antisera and microfluorometry. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 11, p. 2399-2400, 1985.

GOFF, W. L. et al. Comparison of a DNA probe, complement-fixation and indirect immunofluorescence tests for diagnosing *Anaplasma marginale* in suspected carrier cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 381-390, 1990.

GOMES, A. O carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle. In: KESSLER, R. H., SCHENK, M. A. M. (Ed.). **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1998. p. 9-44.

GONZALEZ, E. F. et al. Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination tests for the diagnosis of bovine anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 39, p. 1538-1541, 1978.

GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

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

GUGLIELMONE, A. A. et al. Different seasonal occurrence of anaplasmosis outbreaks in beef and dairy cattle in an area of Argentina free of *Boophilus microplus* ticks. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 19, n. 1, p. 32-33, 1997.

HAWKINS, J. A. et al. Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). **American Journal of Veterinary Research, Chicago**, v. 43, p. 732-734, 1982.

HUNGERFORD, L. L., SMITH, R. D. Variations in seroprevalence and host factors for bovine anaplasmosis in Illinois. **Veterinary Research Communication**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 9-18, 1997.

JATKAR, P. R.; KREIER, J. P. Pathogenesis of anemia in *Anaplasma* infection. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 44, n. 5, p. 393-399, 1967.

JOHNSTON, L. A. Y. et al. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Babesia argentina* infection in cattle. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 49, n. 8, p. 373-377, 1973.

JORGENSEN, W. K. et al. Prevalence of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* at selected localities in Sri Lanka. **Tropical Animal Health and Production**, Montgomery St. v. 24, n. 1, p. 9-14, 1992.

JOYNER, L.P.; DONNELLY, J. The epidemiology of Babesial infections. **Advances in Parasitology**, San Diego, v. 17, p. 115-140, 1979.

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

KESSLER, R.H. et al. Tristeza Parasitária dos Bovinos (TPB). In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. **Doenças parasitárias dos bovinos de leite**. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL, 1992. p. 1-30.

KESSLER, R. H, SCHENK, M. A. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB): conceito, etiologia, transmissão, epidemiologia, diagnóstico e controle. In: Madruga, C. R. **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. Campo Grande: Embrapa, 1998. p. 47-67.

KIESER, S. T. et al. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. **Infection and Immunity**, Washington, v. 58, n. 4, p. 1117-1119, 1990.

KNOWLES, R. T., et al. Clinical and serological evidence of bovine babesiosis and anaplasmosis in St. Lucia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 307-311, 1982.

KOCAN, K. M. et al. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, p. 499-507, 1992.

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

KOCAN, K. M. et al. Ultrastructure of anaplasma inclusions (Pawhuska isolate) and their appendages in intact and hemolyzed erythrocytes and in Complement-Fixation antigenic. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 39, n. 7, p. 1123-1129, 1978.

KROON, J. F. E. M. et al. The indirect fluorescent antibody test for bovine anaplasmosis. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 12, n. 2, p. 124-128, 1990.

KUTLLER, K. L. Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: a review. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 20, n. 1, p. 12-20, 1984.

KUTLER, K. L. et al. Estudio epizootológico del *Anaplasma marginale* y del *Trypanosoma theileri* em Colombia. **Revista del Instituto Interamericano Cooperative de la Agricultura (IICA)**, v. 5, p. 127-148, 1970.

KUTTLER, K.L.; JOHNSON, L.W. Chemoprophilactic activity of imidocarb, diaminazene and oxytetracycline against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 21, p. 107-118, 1996.

LEVINE, N. D. Taxonomy of the piroplasms. **Transactions of the American Microscopical Society**, Lawrence, v. 90, p. 2-33. 1971.

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**. Ames, Iowa State University Press, 1985.

LINHARES, G. F. C. et al. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babes,1888) em bovinos na região Centro-Oeste do Brasil. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, n. 1, p. 85-91, 1992.

LOSOS, G. J. Babesiosis. In: LOSOS, G. J. **Infectious tropical diseases of domestic animals**. New York: Longman Scientific & Technical, 1986a. cap. 1, p. 3-97.

LOSOS, G. J. Anaplasmosis. In: LOSOS, G. J. **Infectious tropical diseases of domestic animals**. New York: Longman Scientific & Technical, 1986b. cap. 19, p. 741-795.

MADRUGA, C. R. et al. Epidemiologia de anaplasnose e babesiose em bovinos da região de cerrado do Estado do Mato Grosso do Sul. I. Prevalência. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 35, p. 631-640, 1983.

MADRUGA, C. R. et al. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça nelore, ibagé e cruzamento de nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 1, p. 135-142, 1985.

MADRUGA, C.R. et al. **Diagnóstico da tristeza parasitária bovina no Estado de Mato Grosso do Sul**: inquérito de opinião [S. l.]: Fundação Cargill, 1986. 40p. il. (EMBRAPA-CNPGC. Circular técnica, n.18).

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

MADRUGA, C. R. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 109-112, 2000.

MADRUGA, C. R. et al. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 72-76, 2001.

MAHONEY, D. F. The epidemiology of babesiosis in cattle. **The Australian Journal of Science**, Sidney, v. 24, p. 310-313, 1962a.

MAHONEY, D. F. Bovine babesiosis: diagnosis of infection by a complement fixation test. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 38, p. 48-52, 1962b.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 48, n. 5, p. 292-298, 1972.

MAHONEY, D. F. et al. The immune response of cattle to *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. **International Journal for Parasitology**, v. 9, p. 297-306, 1979.

McCOSKER, P. J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M.; KREIER, J. P. (Ed.) **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981.

MEHLITZ, D.; EHRET, R. Serological investigations on the prevalence of piroplasmosis and anaplasmosis in cattle in Botswana. **Zentralblatt für Tropenmed Parasitokund.** v. 25, p. 3-10, 1974.

MELO, V. S. P. et al. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy herds of the Metalúrgica Region, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 4, p. 146-150, 2001.

MELO, V. S. P. **Utilização das proteínas recombinantes MSP1a e MSP2 no diagnóstico da anaplasmoze bovina.** 2005. 90f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.

MOLLOY, J. B. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle. **Parasitology Research.** New York, v. 84, n. 8, p. 651-656, 1988.

MOLLOY, J. B. et al. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle in Australia and Zimbabwe. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 33, n. 1-4, p. 59-67, 1998.

MONTENEGRO-JAMES, S. et al. Modified indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infections in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, p. 2401-2403, 1985.

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

NAKAMURA, Y. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using solubilized antigen for detection of antibody to *Anaplasma marginale*. **Tropical Animal Health and Production**, Montgomery St., v. 20, p. 259-266, 1988.

NIELSEN, K. et al. Development and validation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 67, n. 31, p. 133-142, 1996.

OLIVEIRA, A. A. et al. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmosse no Estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 44, n. 5, p. 377-386, 1992.

OTIM, C. et al. A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Australian Veterinary Journal**, Brunswich, v. 56, n. 6, p. 262-266, 1980.

PALMER, G. H., et al. Immunization of cattler with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, p. 3666-3669, 1989.

PANDEY, N. N.; MISHRA, S. S. Studies on the harmatological changes and blood glucose level in *Babesia bigemina* infection in indigenou cow calves. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 54, p. 880-883, 1977.

PAYNE, R. C.; OSORIO, O. Tick-borne diseases of cattle in Paraguai. I- Seroepidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis. **Tropical Animal Health and Production**, Montgomery St., v. 22, n. 1, p. 53-60, 1990.

POTGIETER, F. T. et al. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 48, p. 119-122, 1981.

POTGIETER, F. T.; van RENSBURG, L. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 54, n. 4, p. 557-560, 1987.

RIBEIRO, M. F. B. et al. Epidemiologia da anaplasmosse bovina no Estado de Minas Gerais. I- Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 36, n. 4, p. 425-432, 1984.

RIBEIRO, M. F. B. et al. Transmissão congênita da anaplasmosse bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 47, n. 3, p. 297-304. 1995.

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 61, p. 31-39, 1996.

RIBEIRO, M. F. B.; REIS, R. Prevalência da anaplasmosse em quatro regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 33, n. 1, p. 57-62, 1981.

RICHEY, E. J. Bovine anaplasmosis. In: HOWARD, R. J. (Ed.). **Current veterinary therapy food animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1981. p. 767-772.

RISTIC, M. A capillary tube agglutination test for anaplasmosis: a preliminary report. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 141, p. 588-594, 1962.

RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WEINMAN, D.; RISTIC, M. **Infectious blood diseases of man and animals**. New York: Academic Press, 1968. p. 473-536.

RODGERS, S. J. et al. The development of a semi-automated latex agglutination test for the detection of antibodies to *Anaplasma marginale* using a cell culture-derived antigen. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 29, p. 282-292, 1988.

ROSS, J. P., LOHR, K. F. Transmission and persistence of colostral antibodies to *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie**, Stuttgart, v. 21, p. 401-411, 1968.

SALCEDO, J. H. P. et al. Epidemiologia das babesioses no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos fluorescentes na “Zona da Mata”, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 39, p. 423-429, 1987.

SANTOS, H. Q et al. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, pela reação de imunofluorescência indireta e ELISA. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 8, n. 1, p. 31-34, 2001.

SCHUNTNER, C. A.; LEATCH, G. Radioimmunoassay for *Anaplasma marginale* antibodies in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 504-507, 1988.

SILVA, A. C.; LIMA, J. D. Utilização de inóculo padronizado na premunição de bovinos contra anaplasmoses e babesioses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 2, suplemento 1, p. 212, 1995.

SOARES, C. O. et al. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.

SOLARI, M. A.; QUINTANA, S. Epidemiologia y Prevencion de los Hemoparasitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. In: NARI, A.; FIEL, C. **Enfermedades parasitarias de importancia econômica en bovinos**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1994, cap. 24, p. 481-507.

SOUZA, J. C. P. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 97-101, 2000.

SOUZA, J. C. P. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na Mesorregião do Médio Paraíba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 309-314, 2001.

THOEN, C. O. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in cattle in a herd in which anaplasmosis was diagnostic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, US, n. 5, v. 11, p. 499-502, 1980.

TODOROVIC, R. A. et al. Comparison of rapid card agglutination test with complement-fixation test for diagnosis of *Anaplasma marginale* infection in Colombian cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 2, p. 167-172, 1977.

VANZINI, V. R.; RAMIREZ, L. M. Babesiosis y anaplasmosis bovina—diagnostico, epidemiologia y control. **Veterinária Argentina**, n. 25, v. 3, p. 137-190, 1995.

VIDOTTO, O., et al. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 49, n. 5, p. 655-659, 1997.

VILORIA, M. I. V.; SALCEDO, J. H. P. Patofisiologia da infecção por *Babesia bovis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, suplemento 1, p. 48-52, 2004.

WANDURAGALA, L.; RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. **Rickettsial and Chlamydial diseases of domestic animals**. Oxford: Pergamon Press, 1993. p. 65-83.

WEILAND, G.; REITER, I. Methods for the measurement of the serological response to *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Ratón, Florida: CRC Press, 1988. cap. 9, p. 143-162.

WILSON, A. J. et al. A comparison of 4 serological tests in the detection of humoral antibodies to anaplasmosis in cattle. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 54, n. 8, p. 383-386, 1978.

WILSON, A. J. et al. Susceptibility of *Bos indicus* crossbred and *Bos taurus* cattle to *Anaplasma marginale* infection. **Tropical Animal Health and Production**, Montgomery St., v. 12, n. 2, p. 90-94, 1980.

WRIGHT, I. G. Immunodiagnosis and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. **Revue Scientifique et Technique** (International Office of Epizootics), Paris, v. 9, n. 2, p. 345-356, 1990.

YOUNG, A. S. Epidemiology of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Ratón: CRC Press, 1988. cap. 5. p. 81-98.

ZAUGG, J. L.; KUTTLER, K. L. Bovine anaplasmosis: *in utero* transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies. **American Journal Veterinary Research**. Chicago, v. 45, n. 3, p. 440-443. 1984.

ZAUGG, J. L. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 3, p. 570-572, 1986.

CAPÍTULO 1

4. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos do Estado de Alagoas

Prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos do Estado de Alagoas

Prevalence of antibodies anti-*Babesia bovis* and anti-*Babesia bigemina* in cattle from Alagoas State, Brazil

RESUMO

Objetivou-se, nesse estudo, calcular a prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos do Estado de Alagoas, Brasil, através do teste de imunoadsorção enzimática. Um total de 1155 amostras de soro bovino foram coletadas em 26 fazendas distribuídas nas Mesorregiões do Agreste, Leste e Sertão do Estado. Os resultados mostraram que 70,22% (811/1155) dos animais foram sororreagentes para *Babesia bovis* e 77,40% (894/1155) para *Babesia bigemina*, o que evidencia que o Estado de Alagoas pode ser classificado como área de instabilidade enzoótica para *B. bovis* e estabilidade enzoótica para *B. bigemina*. Contudo, quando a prevalência de anticorpos anti-*Babesia* sp foi analisada por mesorregião, constatou-se que a situação de estabilidade e instabilidade variou nas mesorregiões estudadas. Assim, o Sertão foi classificado como área de estabilidade enzoótica para *B. bovis* e *B. bigemina*, assim como o Leste para *B. bigemina*. Os resultados mostram que adoção de medidas preventivas deve ser realizada nas áreas de instabilidade enzoótica para reduzir a morbidade e mortalidade causadas por esses parasitos sanguíneos.

Palavras-chave: Babesiose, Epizootiologia, ELISA, Brasil.

ABSTRACT

The goal of this research was to determine the prevalence of antibodies anti-*Babesia bovis* and anti-*Babesia bigemina* in cattle raised in the state e of Alagoas, Brazil, through enzyme immunoadsorption assay (ELISA). A total of 1155 sera samples from cattle were collected from 26 herds distributed on the three regions called Sertão, Agreste and Leste. According to the results, 70.22% (811/1155) of the animals were positive for *B. bovis* and 77.40%

(894/1155) for *B. bigemina*. The seroprevalence showed that the State of Alagoas has to be considered enzootically unstable for *B. bovis* and enzootically stable for *B. bigemina*. However this epidemiological situation is not the same in the three regions studied. Thus, Sertão region was characterizing as enzootically unstable area for *B. bovis* and the Sertão and Leste to *B. bigemina*. As evidenced by this study that preventive measures should be adopted in enzootic unstable areas in order to minimizing the morbidity and mortality caused by these blood parasites.

Keywords: Babesiosis, Epizootiology, ELISA, Brazil.

INTRODUÇÃO

A babesiose bovina, também conhecida como piroplasmose, é um dos principais fatores limitantes à bovinocultura em áreas tropicais e subtropicais do mundo (ARAÚJO et al., 1997), sendo responsável por elevada morbidade e mortalidade (WRIGHT, 1990), diminuição da produção de carne e leite, gastos com produtos antiparasitários, controle de seus vetores, medidas de quarentena (MADRUGA et al., 2000), além de causar sérios problemas na comercialização de animais de zonas livres de carrapato para zonas enzoóticas (CALLOW, 1978).

No Brasil, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* têm sido incriminados como agentes etiológicos da doença em bovinos, a qual se encontra associada à distribuição de seus vetores, carrapatos ixodídeos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BARKER e MURREL, 2002).

Apesar da babesiose bovina ser considerada endêmica em vários estados da federação, essa enfermidade continua causando prejuízos da ordem de 250 milhões de dólares anuais (MADRUGA et al., 2001).

Sendo assim, os inquéritos soroepidemiológicos (BOSE et al. 1990) são necessários para o reconhecimento da situação epizootiológica de cada região, indicando a necessidade de adoção de medidas preventivas que minimizem as perdas (MADRUGA et al., 2000).

No Estado de Alagoas, apesar da ocorrência de casos clínicos de *Babesia* sp em bovinos, não existem estudos que demonstrem a prevalência da enfermidade em bovinos.

Neste contexto, objetivou-se calcular a prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos provenientes das diversas regiões do Estado de Alagoas, através do teste de imunoadsorção enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados soros de 1155 bovinos machos e fêmeas (Tabela 1), raças e idades variadas, provenientes das mesorregiões do Agreste, Leste e Sertão do Estado de Alagoas (Figura 1), localizado a leste da região Nordeste, que possui vegetação caracterizada pela presença de floresta tropical, mangues litorâneos e caatinga, com clima tropical, temperatura média anual de 24° C e pluviosidade média que varia de 800 a 1200 milímetros por ano (MENDES JÚNIOR, 2002).

Tabela 1 – Distribuição dos animais estudados de acordo com a procedência e o sexo, Alagoas, 2007

Região	Macho	Fêmea	Total
Agreste	77	419	496
Leste Alagoano	38	297	335
Sertão	44	280	324
Total	159	996	1155

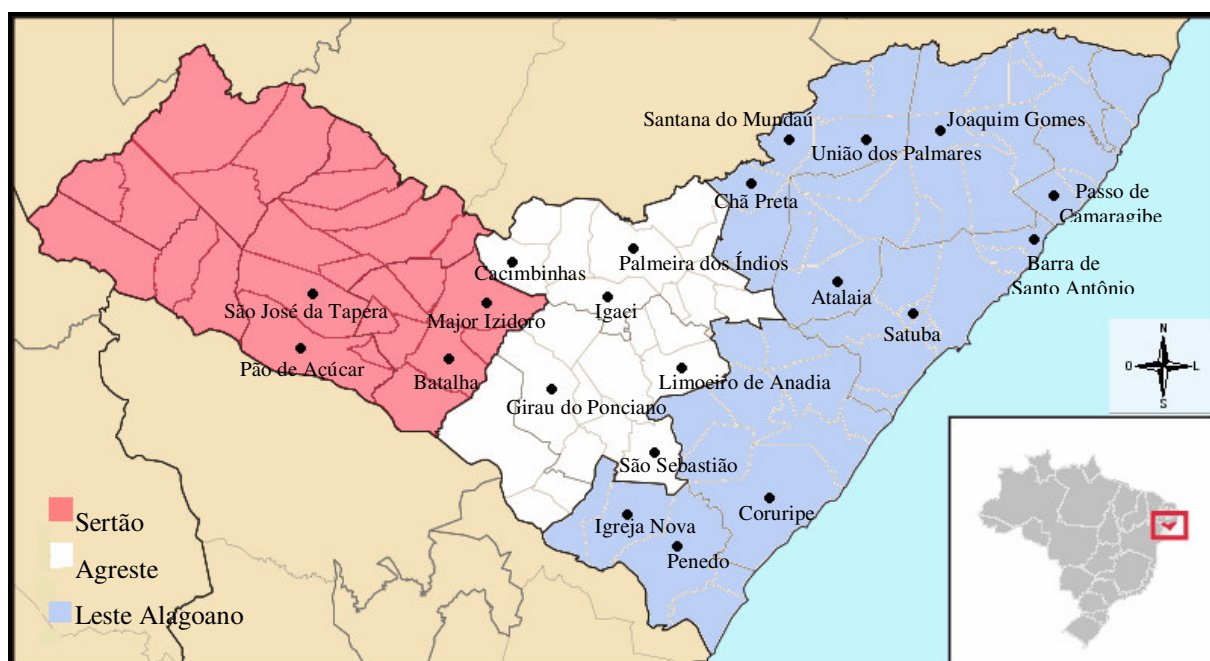


Figura 1 – Localização dos Municípios Estudados nas Mesorregiões do Estado de Alagoas, 2007

O tamanho da amostra foi calculado de acordo com o modelo estatístico do Centro Panamericano de Zoonoses (1979). As propriedades visitadas foram escolhidas por conveniência não probabilística, de acordo com Costa Neto (1977).

Realizou-se o teste de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para pesquisa de anticorpos anti-*Babesia* sp no Laboratório de Biologia Molecular da Área de Sanidade Animal da EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande. Os antígenos brutos de *B. bovis* e *B. bigemina* utilizados no teste ELISA foram obtidos de acordo com Madruga et al. (2000) e Madruga et al. (2001), respectivamente.

Os soros controles negativos utilizados nas provas sorológicas foram provenientes de bovinos de raça Aberdeen Angus, com aproximadamente 18 meses de idade, mantidos no isolamento da Área de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte. Os soros controles positivos foram de animais da mesma raça e idades dos soros negativos, porém de animais infectados experimentalmente com *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente.

A leitura dos resultados do teste de ELISA foi realizada em espectrofotômetro para microplacas, com filtro de 405 nm. O ponto de corte foi determinado para cada placa e a classificação dos soros em positivos e negativos baseou-se na densidade óptica fornecida pelo leitor (FREY et al., 1998).

Realizou-se análise estatística descritiva por meio de distribuições absolutas e relativas, além da técnica de estatística inferencial utilizando-se o teste Qui-quadrado de independência ou teste Exato de Fisher quando as condições para o teste Qui-quadrado não foram verificadas. Considerou-se para a decisão dos testes estatísticos, o nível de significância de 5%. O programa utilizado para a obtenção da análise estatística foi o EpiInfo versão 6.02. (DEAN et al., 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que no Estado de Alagoas, 70,22% (811/1155) dos animais foram positivos para anticorpos contra *B. bovis* e 77,40% (894/1155) contra *B. bigemina*.

Quando a prevalência da infecção foi analisada por mesorregião, constatou-se que os resultados para pesquisa de anticorpos anti-*Babesia* sp foram semelhantes no leste e agreste

alagoano com 67,16% (225/335) e 78,81% (264/335); 69,15% (343/496) e 74,6% (370/496), respectivamente, para *B. bovis* e *B. bigemina*.

No entanto, observou-se um maior percentual de animais sororreagentes no sertão alagoano, onde se constatou 75,31% (244/324) para *B. bovis* e 80,56% (261/324) para *B. bigemina*. A análise estatística revelou diferença não significativa ($p < 0,05$) entre a prevalência de anticorpos anti *Babesia* sp e a região estudada.

Esses resultados mostram prevalências inferiores às aquelas encontradas por Alves (1987) que observou a prevalência de 87,9% de animais sororreagentes a *B. bigemina* no município de Garanhuns, Pernambuco; Araújo et al. (1997) que relataram taxas de bovinos com sorologia positiva para *B. bovis* e *B. bigemina* acima de 91% no Estado da Bahia; Barros et al (2005) encontraram em Senhor do Bonfim e Euclides da Cunha, na Bahia, prevalências acima de 86% para *B. bovis* e *B. bigemina*; Linhares et al. (1992), que detectou uma prevalência de 98,72% para *B. bovis* e 97,45% para *B. bigemina* no Município de Goiânia, e Santos et al. (2001) que observaram a prevalência de anticorpos de 98,9% e 93,3% para *B. bovis* e *B. bigemina* na Microrregião de Goiânia; Madruga et al. (2000) que relataram a prevalência de anticorpos de 83,9% para *B. bovis* em quatro municípios do Pantanal do Mato Grosso do Sul; Salcedo et al. (1987) que observaram na Zona da Mata de Minas Gerais a prevalência de anticorpos de 79,04% e 82,53% para *B. bovis* e *B. bigemina* respectivamente; Soares et al. (2000) que relataram a soroprevalência de 90,9% para *B. bovis* na Mesorregião do Norte Fluminense no Estado do Rio de Janeiro e Artiles et al. (1995) que encontraram 74% dos animais sororreagentes para *B. bovis* e 87% para *B. bigemina*; Bagé no Rio Grande do Sul.

Contudo, as prevalências aqui observadas foram superiores às encontradas por Alves (1987) que relatou a prevalência de anticorpos de 27,9% para *B. bovis* no município de Garanhuns; Madruga et al. (1993) que mostraram uma prevalência da infecção de 56,9% e 35,8% em Boqueirão e no Cariri Estado da Paraíba, respectivamente, e Barros et al. (2005) que observaram que 56,4% e 63,7% dos animais foram reagentes para *B. bovis* e 54,8% e 53% para *B. bigemina* em Juazeiro e Uauá na Bahia, respectivamente.

A razão para diferentes prevalências observadas pode ser resultante da natureza do antígeno utilizado no testes sorológicos (MADRUGA et al., 2000), da sensibilidade e especificidade do teste empregado (ROSS e LOHR, 1968; MEHLITZ e EHRET, 1974; FUJINAGA et al., 1981; MOLLOY et al., 1988; MOLLOY et al., 1998), da enzootia de cada local (MADRUGA et al., 2001), além de outros fatores inerentes ao hospedeiro vertebrado (BOCK et al., 1999, 2004; CARRIQUE MAS et al., 2000; MADRUGA et al., 2001).

De acordo com os resultados aqui obtidos para *B. bovis* e *B. bigemina*, o Estado de Alagoas pode ser classificado segundo Mahoney e Ross (1972) como uma área de instabilidade enzoótica para *B. bovis* e estabilidade enzoótica para *B. bigemina*.

Contudo, quando se analisou cada mesorregião do Estado, isoladamente, pode-se observar que a situação de estabilidade e instabilidade não foi uniforme nas diversas áreas estudadas. Sendo assim, o sertão foi classificado como área de estabilidade enzoótica para *B. bovis* e *B. bigemina*, e o leste alagoano apenas para *B. bigemina*.

Essas diferenças na endemicidade encontradas nas regiões do Estado ocorrem, principalmente, em função das condições climáticas e edáficas próprias de cada região, que atuam como fatores determinantes de pressão sobre as populações de carrapatos vetores e, dessa forma, condicionam características epidemiológicas locais (MAHONEY e ROSS, 1972).

No sertão de Alagoas, apesar do clima seco, encontra-se uma das mais importantes bacias leiteiras do Nordeste e o rebanho encontrado nessa região é predominantemente da raça holandesa, sendo os animais desta raça mais susceptíveis à infestação por carrapatos (PAYNE e OSÓRIO, 1990; BOCK et al., 1999) e conseqüentemente a *Babesia* sp (BOCK et al, 2004). Por outro lado, no agreste o rebanho bovino é misto, encontrando-se animais com aptidão para corte ou leite e alguns municípios desta região fazem parte da bacia leiteira do Estado.

Conforme Guglielmone (1995), dependendo da raça explorada, manejo, níveis de infestações do carrapato *Boophilus microplus*, áreas consideradas estáveis podem tornar-se instáveis e vice-versa. Não obstante, certas práticas de manejo, como a diminuição das populações de carrapato por excesso de uso de acaricidas, ou mesmo por falhas no tratamento e/ou controle, podem acarretar modificações no estado epizootológico de cada região (SOLARI e QUINTANA, 1994).

Por outro lado deve-se levar em consideração que a resistência dos bovinos à infecção por *Babesia* sp é determinada pelas características inatas dos animais, como raça, idade e pela resposta imune específica como a imunidade induzida por uma infecção ativa ou por transferência passiva de anticorpos (MADRUGA et. al., 2001).

Com relação ao sexo, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) à presença de anticorpos anti-*B. bovis* nas fêmeas. Neste contexto, deve-se considerar que condições fisiológicas de gestação, parto e lactação podem aumentar a susceptibilidade à infecção pelo parasito.

Quanto à idade, a prevalência de anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* no Estado de Alagoas foi mais alta entre os animais adultos ($p < 0,05$). Segundo Mahoney e Ross (1972)

a incidência de *B. bovis* e *B. bigemina* pode variar em função da idade, contudo assegura que a maior frequência pode ser observada após os doze meses de idade. No entanto, essa diferença aqui observada pode ser devido ao fato que 74,37% da amostragem do presente estudo foi constituída por animais adultos.

Ainda em relação ao fator idade, os animais jovens até aproximadamente nove meses de idade, apresentam uma maior resistência à *Babesia* sp devido aos anticorpos colostrais recebidos da mãe, à presença de resquícios da hemoglobina fetal, à intensa hematopoiese e a um fator sérico, dialisável de peso molecular baixo (14 Kda) que inibe a multiplicação do parasito, promovendo sua eventual morte no interior dos eritrócitos (LEVY et al., 1982).

CONCLUSÃO

Os resultados mostram diferenças na enzootia nas regiões do Estado, com isso, a adoção de medidas preventivas deve ser realizada nas criações de bovinos do Estado de Alagoas.

REFERÊNCIAS

ALVES, L. C. **Prevalência da babesiose bovina em gado leiteiro no município de Garanhuns, Estado de Pernambuco.** 1987. 125f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ARAÚJO, F. R. et al. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de congutinação rápida. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 111-115, 1997.

ARTILES, J. et al. Prevalência de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 179, 1995. Supplement 1.

BARKER, S. C.; MURREL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Experimental and Applied Acarology**. Amsterdam, v. 28, p. 55-68, 2002.

BARROS, S. L. et al. Serological survey of *Babesia Bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunoabsorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 6, p. 613-617, 2005.

BOCK, R. E. et al. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 77, n. 11, p. 748-751, 1999.

BOCK, R.; et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**. New York, v. 129, p. 247-69, 2004. Supplement.

BOSE, R. et al. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. **Parasitology Research**, New York, v. 76, n. 8, p. 648-652, 1990.

CALLOW, L.L. Ticks and tick-borne diseases as a barrier to the introduction of exotic cattle to the tropics. **World Animal Review**, Rome, v. 28, p. 20-25, 1978.

CARRIQUE MAS, J. J. et al. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 29-38, 2000.

CENTRO PAN-AMERICANO DE ZOONOSES (Ramos Mejia, Argentina). **Procedimientos para estudios de prevalência por muestro**. Ramos Mejia: Centro Pan-Americano de Zoonoses, 1979. 35p. (Nota técnica 18. Rev. 1).

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264p.

DEAN, A.G. et al. Word processing, database and statistics program for epidemiology in microcomputers. Version 6.2. Atlanta: Centers of Disease Control, 1990.

FREY, A. et al. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**. v. 221, p. 35-41, 1998.

FUJINAGA, T. et al. Serological relationship between a large Babesia found in Japanese cattle and *Babesia major*, *B. Bigemina* and *B. Bovis*. **Research in Veterinary Science**, London, v. 29, p.: 230-234, 1981.

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

LEVY, M.G. et al. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. **Infection and Immunity**, Washington, US, v. 37 n. 3, p. 1127-1131, 1982.

LINHARES, G. F. C. et al. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babes,1888) em bovinos na região Centro-Oeste do Brasil. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, n. 1, p. 85-91, 1992.

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

MADRUGA, C. R. et al. Desenvolvimento de uma prova de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 4, p. 167-170, 2000.

MADRUGA, C. R. et al. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 72-76, 2001.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 48, n. 5, p. 292-298, 1972.

MEHLITZ, D.; EHRET, R. Serological investigations on the prevalence of piroplasmiasis and anaplasmosis in cattle in Botswana. **Zentralblatt für Tropenmed Parasitokund.**, v. 25, p. 3-10, 1974.

MENDES JÚNIOR, B. O. Perfil econômico de Alagoas. Fortaleza: Banco do Nordeste, 2002. 58p.

MOLLOY, J. B. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle. **Parasitology Research**. New York, v. 84, n. 8, p. 651-656, 1988.

MOLLOY, J. B. et al. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle in Australia and Zimbabwe. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 33, n. 1-4, p. 59-67, 1998.

PAYNE, R. C., OSORIO, O. Tick-borne diseases of cattle in Paraguai. I- Seroepidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis. **Tropical Animal Health and Production**, Montgomery St., v. 22, n. 1, p. 53-60, 1990.

ROSS, J. P. J.; LOHR, K. F. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. **Research in Veterinary Science**, London, v. 9, p. 557-562, 1968.

SALCEDO, J. H. P. et al. Epidemiologia das babesioses no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos fluorescentes na “Zona da Mata”, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 39, p. 423-429, 1987.

SANTOS, H. Q. et al. 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**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 133-137, 2001.

SOARES, C. O. et al. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.

SOLARI, M. A.; QUINTANA, S. Epidemiologia y Prevencion de los Hemoparasitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. In: NARI, A.; FIEL, C. **Enfermidades parasitarias de importancia econômica en bovinos**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1994. cap. 24, p. 481-507.

WRIGHT, I. G. Immunodiagnosis and immunoprofylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 9, n. 2, p. 345-356, 1990.

CAPÍTULO 2

5. Inquérito sorológico da infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos no Estado de Alagoas

**Inquérito sorológico da infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos no
Estado de Alagoas**

**Serological survey of the infection by *Anaplasma marginale* in bovines in the
State of Alagoas, Brazil**

RESUMO

Estudo sorológico para *Anaplasma marginale* foi conduzido em bovinos provenientes das Mesorregiões do Sertão, Agreste e Leste do Estado de Alagoas, Brasil. Amostras de soro de 1155 animais de 26 fazendas foram analisadas pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados mostraram que 27,45% (317/1155) dos animais foram positivos à infecção por *A. marginale*. Nas mesoregiões estudadas a prevalência da infecção variou de 19,76% a 36,42%, caracterizando-as como áreas de instabilidade enzoótica

Palavras-chave: Anaplasmosse, Epizootiologia, ELISA, Brasil.

ABSTRACT

A serologic survey of *Anaplasma marginale* was carried in cattle farming herds from three regions called Sertão, Agreste and Leste of Alagoas State, Brazil. Sera samples from 1155 cattle raised in 26 farms were evaluated by enzyme immunoassay (ELISA). The results showed 27.45% (317/1155) of the animals were positive for antibodies against *A. marginale*. The prevalence the infection ranged from 19.76% to 36.42% characterizing all of the regions studied as enzootically unstable areas.

Key-words: Anaplasmosis, Epizootiology, ELISA, Brazil.

INTRODUÇÃO

A anaplasmosose é uma doença infecciosa de ruminantes, responsável por grandes prejuízos para a pecuária bovina mundial, causada por uma riquetsia intraeritrocítica obrigatória e transmitida principalmente por carrapatos (McDOWELL et al., 1964; JAMES et al., 1985; LIMA, 1991). No Brasil, o agente causal desta doença nos bovinos é *Anaplasma marginale* (RISTIC, 1968).

Os graves problemas atribuídos à enfermidade nos países em desenvolvimento, juntamente com métodos de controle ineficazes reforçam a necessidade de estudos sobre a enfermidade para o desenvolvimento de métodos imunoproláticos e técnicas imunodiagnósticas mais eficientes (RODGERS et al., 1988).

Neste sentido, as provas sorológicas são importantes para diagnóstico e realização de estudos epidemiológicos, principalmente com intenção de se identificar os animais portadores, com vistas à adoção de medidas preventivas (RODGERS et al., 1988).

Dentre os testes sorológicos que vêm sendo utilizados para detecção de anticorpos contra *A. marginale*, destacam-se o teste de aglutinação (RISTIC, 1962; AMERAULT e ROBY, 1968), fixação de complemento (TODOROVIC et al., 1977), imunofluorescência indireta (MONTENEGRO-JAMES et al., 1985), e imunoadsorção enzimática (ELISA) (THOEN et al., 1980; NAKAMURA et al., 1988; MOLLOY et al., 1999).

Apesar da sensibilidade e especificidade destes testes, em geral, serem consideradas aceitáveis, reações falso-positivas têm sido verificadas quando antígenos brutos são utilizados, devido à contaminação com componentes celulares, como membranas de eritrócitos e fragmentos celulares, e tais reações têm sido responsáveis pela ocorrência de reatividade cruzada pela presença de isoanticorpos nos soros dos bovinos (AMERAULT e ROBY, 1968).

Apesar de vários inquéritos soroepidemiológicos terem sido conduzidos em diferentes regiões do país (MADRUGA et al., 1983; RIBEIRO et al., 1984; OLIVEIRA et al., 1992; VIDOTO et al., 1997; ARAÚJO et al., 1998; SOUZA et al., 2000; MELO et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SOUZA et al., 2001; YOSHIHARA et al., 2003; MELO, 2005), não há registros sobre a situação da anaplasmosose bovina no Estado de Alagoas. Diante disso objetivou-se com esse estudo avaliar a infecção por *A. marginale* em bovinos neste Estado.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Estado de Alagoas que possui 27.933,1 km² e um efetivo bovino de 816.067, sendo 234.439 no sertão, 294.441 no agreste e 287.187 no leste alagoano (IBGE, 2004).

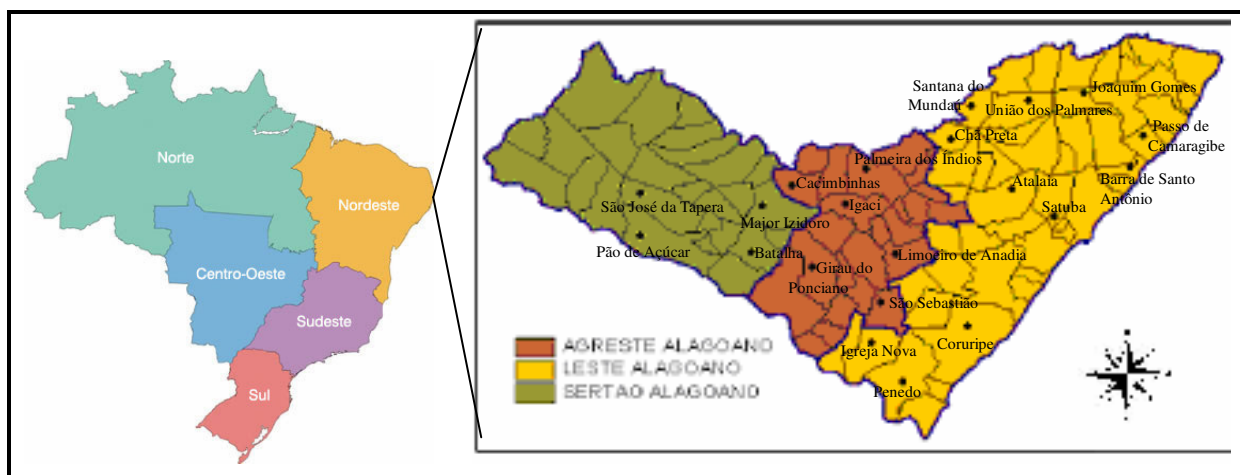


Figura 1 – Localização dos Municípios Estudados nas Mesorregiões do Estado de Alagoas, Brasil, 2007

Foram utilizados soros de 1155 bovinos de ambos os sexos, raças e idades variadas, provenientes de 26 fazendas de diferentes sistemas de criação (extensivo, semi-intensivo e intensivo) do Estado de Alagoas, sendo 335 animais provenientes de 11 fazendas localizadas no Leste Alagoano, 496 de seis fazendas do Agreste e 324 de nove fazendas do Sertão de Alagoas. As fazendas visitadas foram escolhidas por conveniência não probabilística de acordo com Costa Neto (1977). O tamanho da amostra utilizada nesse estudo foi obtido de acordo com o Centro Panamericano de Zoonoses (1979).

As amostras séricas foram identificadas, centrifugadas e acondicionadas em tubos plásticos de polipropileno e mantidas a -20° C até a realização dos testes.

O teste de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para pesquisa de anticorpos anti-*A. marginale* foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Área de Sanidade Animal da EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande- MS. Os antígenos de *A. marginale* foram obtidos de acordo com Araújo et al. (2005), utilizando-se a proteína recombinante MSP1a para os testes de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Araújo et al., 2005). A diluição do conjugado determinada foi de 1:10.000; antígeno e os soros diluídos a 1:600.

Os soros controles negativos utilizados nas provas sorológicas foram provenientes de bovinos de raça Aberdeen Angus, com aproximadamente 18 meses de idade, mantidos no isolamento da Área de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte. Os soros controles

positivos foram de animais da mesma raça e idades dos soros negativos, porém de animais infectados experimentalmente com *A. marginale*.

A leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA com filtro de 490 nm. Para a interpretação dos resultados, utilizou-se ponto de corte determinado para cada placa (FREY et al., 1998) e a classificação das amostras em negativas e positivas foi baseada na densidade óptica fornecida pelo leitor.

Realizou-se análise estatística descritiva por meio de distribuições absolutas e relativas, além da técnica de estatística inferencial utilizando-se o teste Qui-quadrado de independência ou teste Exato de Fisher quando as condições para o teste Qui-quadrado não foram verificadas. Considerou-se para a decisão dos testes estatísticos, o nível de significância de 5%. O programa utilizado para a obtenção da análise estatística foi o EpiInfo versão 6.02 (DEAN et al., 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que 27,45% (317/1155) dos animais do Estado de Alagoas foram sororreagentes para *A. marginale*.

Esta prevalência foi inferior àquelas encontradas no estado do Paraná por Vidotto et al. (1997) que observaram 67,4% de animais sororreagentes na cidade de Londrina e em Umuarama, Yoshihara et al. (2003) verificaram 76,1% de bovinos da raça nelore sororreagentes; em Minas Gerais, Ribeiro et al. (1984) detectaram anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em 81,1% dos bovinos criados na Zona da Mata; e para este mesmo estado Melo et al. (2001) calcularam a prevalência de 55% da infecção por *A. marginale* em bovinos da região metarlúrgica; para a mesorregião Norte Fluminense no Rio de Janeiro, Souza et al. (2000), relataram 91,16% dos bovinos sororreagentes e na mesorregião do Médio Paraíba, Santos et al. (2001), estimaram a prevalência de 98,21%; em Goiás, na microrregião de Goiânia, Santos et al. (2001) observaram a prevalência de 96,92% de bovinos sororreagentes; em Pernambuco, Melo (2005) observou a prevalência da infecção superior a 88% dos animais estudados, e Araújo et al. (1998), que relataram em rebanhos leiteiros do Estado da Bahia, prevalência superior a 90%. Contudo os resultados aqui obtidos foram superiores àqueles descritos por Oliveira et al. (1992) em Sergipe, que observaram a prevalência de 16,3% entre os bezerros avaliados e Madruga et al. (1983) que obtiveram prevalência de 7,95% em animais procedentes da região do Cerrado do estado do Mato Grosso do Sul.

Quando a prevalência foi analisada por região estudada, observou-se positividade à infecção em 30,15% (101/335) no leste alagoano e 36,42% (118/324) no sertão e 19,76% (98/496), no agreste, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Com base na prevalência obtida, e de acordo com os conceitos previamente estabelecidos por Mahoney e Ross (1972), o Estado de Alagoas foi classificado como área de instabilidade enzoótica para *A. marginale*.

Apesar da prevalência da anaplasmoze bovina ser considerada elevada na maior parte do território brasileiro, diferenças nas condições climáticas de cada região, a utilização de animais com maior grau de sangue para aptidão leiteira, introdução de animais de áreas livres em áreas endêmicas, falhas na imunidade passiva, além da frequência da população de carrapatos e da dinâmica de transmissão de *A. marginale* podem ser responsáveis pelas diferentes taxas de prevalência observadas nas diversas regiões do Brasil como discutido por Melo (2005).

Com relação à idade, foi observada maior prevalência da infecção em animais adultos (Tabela 1).

Tabela 1 – Prevalência de bovinos sororeagentes para *Anaplasma marginale*, segundo idade, nas regiões do Agreste, Leste e Sertão Alagoano, 2007

Região	Bezerros				Adultos			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR
Agreste	25	16,67	125	83,33	73	21,10	273	78,90
Leste	20	37,74	33	62,26	81	28,72	201	71,28
Sertão	16	17,20	77	82,80	102	44,16	129	55,84

FA – frequência absoluta; FR - frequência relativa

Valor de $p=0,002^*$

* $p < 0,05$

Sobre a faixa etária dos animais e sua susceptibilidade a anaplasmoze, Kocan et al. (2003) observaram que os bezerros são mais resistentes devido à imunidade passiva e geralmente sofrem infecções brandas e imunidade persistente por toda a vida.

Este fenômeno ainda é pouco compreendido, mas a remoção do baço torna os bezerros novamente sensíveis à infecção, que é frequentemente mais severa do que em animais mais velhos. Este fato também foi relatado por Madruga et al. (1985) que observaram que a ingestão de anticorpos colostrais determina uma maior proporção de animais negativos.

Em bezerros Ibagé, Nelore e seus cruzamentos a proporção de animais negativos para anticorpos colostrais aumenta a partir dos 30 dias e atinge o máximo aos 60 dias de vida,

enquanto as riquetsemias são detectadas a partir dos 30 dias e atingem um pico aos 90 dias (MADRUGA et al., 1985).

Em áreas de estabilidade, devido à proteção adquirida nos primeiros meses de vida, apenas casos clínicos esporádicos são observados (PAYNE e OSÓRIO, 1990). Hungerford e Smith (1997) afirmam que a taxa de mortalidade é maior em animais adultos em áreas de instabilidade enzoótica. Já Ribeiro e Reis (1981) afirmam que em áreas enzoóticas com elevadas populações de vetores, a primo-infecção por *A. marginale* ocorre em bezerros nos primeiros dias de vida quando apresentam alterações clínicas e hematológicas menos severas.

Ainda, sobre a maior resistência dos bezerros em relação aos animais adultos, Buening (1973), afirma que além da imunidade passiva os bezerros têm uma rápida resposta imunológica devido a imunidade celular decorrente da persistência do timo. Ristic et al. (1958) associam a isso a grande atividade eritropoiética da medula óssea nos animais jovens e Anderson et al. (1972) relatam uma possível ação protetora da hemoglobina fetal nesses animais.

Com relação ao sexo, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 2). Este achado pode ser justificado, em parte, por questões imunológicas relacionadas a hormônios, principalmente nas fazendas produtoras de leite em que a maioria dos animais está em lactação e nessa fase pode haver fatores hormonais que interfiram na resposta imune dos animais. Assim como, gestação e parto, podendo, esses fatores influenciarem os resultados obtidos.

Tabela 2 – Prevalência de bovinos sororeagentes para *Anaplasma marginale*, segundo sexo, nas regiões do Agreste, Leste e Sertão Alagoano, 2007

Região	Macho				Fêmea			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR
Agreste	21	27,27	56	72,73	17	4,06	402	95,94
Leste	08	21,05	30	78,95	93	31,31	204	68,69
Sertão	31	70,45	13	29,55	109	38,93	171	61,07

FA – frequência absoluta; FR - frequência relativa

Valor de $p < 0,001$ *

* $p < 0,05$

CONCLUSÃO

As soroprevalências registradas nas diferentes regiões de Alagoas indicam estado de instabilidade enzoótica para *Anaplasma marginale*, contudo, se faz necessário a realização de outros estudos para observar a dinâmica da doença e a variação da população de vetores que podem determinar o aumento do número de animais infectados.

REFERÊNCIAS

AMERGAULT, T. E.; ROBY, T. O. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 153, p. 1828-1834, 1968.

ANDERSON, I. L. et al. *Anaplasma marginale*: hemoglobin patterns in experimentally infected young calves. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 32, n. 2, p. 265-271, 1972.

ARAÚJO, F. R. et al. Frequência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 3, p. 243-246, 1998.

ARAÚJO, F. R. et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 765-769, 2005.

BUENING, G. M. Cell-mediated immune responses in calves with anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 34, n. 6, p. 757-763, 1973.

CENTRO PAN-AMERICANO DE ZOONOSES (Ramos Mejia, Argentina). **Procedimentos para estudos de prevalência por muestro**. Ramos Mejia: Centro Pan-Americano de Zoonoses, 1979. 35p. (Nota técnica 18. Rev. 1).

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264p.

DEAN, A. G. et al. Word processing, database and statistics program for epidemiology na microcomputers. Version 6.2. Atlanta: Centers of Disease Control, 1990.

FREY, A. et al. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**. v. 221, p. 35-41, 1998.

HUNGERFORD, L. L.; SMITH, R. D. Variations in seroprevalence and host factors for bovine anaplasmosis in Illinois. **Veterinary Research Community**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 9-18, 1997

IBGE. **Anuário estatístico**. Maceió, 2004. p. 262-266.

JAMES, M. A. et al. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. **Tropical Animal Health and Production**., v. 17, n. 1, p. 9-18, 1985.

KOCAN, K. M. Et al. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Clinical Microbiology Reiewes**, Montgomery St., v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.

LIMA, J. D. Premunção: uma alternativa para o controle da tristeza parasitária. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA,7., 1991. São Paulo, **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1991. p. 39-43.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 48, n. 5, p. 292-298, 1972.

MADRUGA, C. R. et al. Epidemiologia de anaplasnose e babesiose em bovinos da região de cerrado do Estado do Mato Grosso do Sul. I. Prevalência. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 35, p. 631-640, 1983.

MADRUGA, C. R. et al. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça nelore, ibagé e cruzamento de nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 1, p. 135-142, 1985.

McDOWELL, R. E. et al. Impact of anaplasmosis in a dairy herd. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 23, n. 1, p. 168-171, 1964.

MELO, V. S. P. et al. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy herds of the Metalúrgica Region, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 4, p. 146-150, 2001.

MELO, V. S. P. **Utilização das proteínas recombinantes MSP1a e MSP2 no diagnóstico da anaplasmoze bovina**. 2005. 90f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MOLLOY, J. B. et al. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. **Australian Veterinary Journal**, Brunswich, v. 77, n. 4 p. 245-249. 1999.

MONTENEGRO-JAMES, S. et al, M. Modified indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infections in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, p. 2401-2403, 1985.

NAKAMURA, Y. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using solubilized antigen for detection of antibody to *Anaplasma marginale*. **Tropical Animal Health and Production**, Montgomery St., v. 20, p. 259-266, 1988.

PAYNE, R. C.; OSORIO, O. Tick-borne diseases of cattle in Paraguai. I- Seroepidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis. **Tropical Animal Health and Production**, Montgomery St., v. 22, n. 1, p. 53-60, 1990.

OLIVEIRA, A. A. et al. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmosse no Estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 44, n. 5, p. 377-386, 1992.

RIBEIRO, M. F. B.; REIS, R. Prevalência da anaplasmosse em quatro regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 33, n. 1, p. 57-62, 1981.

RIBEIRO, M. F. B. et al. Epidemiologia da anaplasmosse bovina no Estado de Minas Gerais. I- Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 36, n. 4, p. 425-432, 1984.

RISTIC, M. A capillary tube agglutination test for anaplasmosis: a preliminary report. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 141, p. 588-594, 1962.

RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WEINMAN, D., RISTIC, M. **Infectious blood diseases of man and animals**. New York: Academic Press, 1968. p. 473-536.

RISTIC, M. et al. Effect of cortisone on the mechanism of *Anaplasma marginale* immunity of experimentally infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 19, n. 7, p. 37-43, 1958.

RODGERS, S. J. et al. The development of a semi-automated latex agglutination test for the detection of antibodies to *Anaplasma marginale* using a cell culture-derived antigen. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 29, p. 282-292, 1988.

SANTOS, H. Q. et al. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, pela reação de imunofluorescência indireta e ELISA. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 8, n. 1, p. 31-34, 2001.

SOUZA, J. C. P. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 97-101, 2000.

SOUZA, J. C. P. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na Mesorregião do Médio Paraíba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 2, p. 309-314, 2001.

THOEN, C. O. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in cattle in a herd in which anaplasmosis was diagnostic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, US, v. 11, n. 5, p. 499-502, 1980.

TODOROVIC, R. A. et al. Comparison of rapid card agglutination test with complement-fixation test for diagnosis of *Anaplasma marginale* infection in Colombian cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 2, p. 167-172, 1977.

VIDOTTO, O., et al. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 49, n. 5, p. 655-659, 1997.

YOSHIHARA, E., et al. Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in nelore cattle in the Umuarama municipality, Paraná State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro. v. 12, n. 1, p. 21-26, 2003.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados mostram diferenças no nível de enzootia da infecção por *Babesia* sp nas regiões do Estado, com isso, a adoção de medidas preventivas deve ser realizada nas áreas de instabilidade enzoótica nas criações de bovinos do Estado de Alagoas.
- As soroprevalências registradas nas diferentes regiões de Alagoas indicam estado de instabilidade enzoótica para a infecção por *Anaplasma marginale*, contudo, se faz necessário a realização de outros estudos para observar a dinâmica da doença e a variação da população de vetores que podem determinar o aumento do número de animais infectados.