



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PREVALÊNCIA E DINÂMICA DE
INFECÇÕES POR *Anaplasma marginale*, *Babesia*
***bovis* e *Babesia bigemina* EM BOVINOS NA**
REGIÃO SERRANA DE SANTA CATARINA

LUISA LEMOS VIEIRA

LAGES, 2014

LUIA LEMOS VIEIRA

PREVALÊNCIA E DINÂMICA DE INFECÇÕES POR *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* EM BOVINOS NA REGIÃO SERRANA DE SANTA CATARINA

Dissertação apresentada no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Concentração em Produção Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV - UDESC), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto

**LAGES
2014**

V658p

Vieira, Luisa Lemos

Prevalência e dinâmica de infecções por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos na região serrana de Santa Catarina / Luisa Lemos Vieira. - Lages, 2014.

87 p.: il.; 21 cm

Orientador: Luiz Claudio Milette

Bibliografia: 67-79p

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

1. Tristeza parasitária bovina. 2. *Babesia*. 3. *Anaplasma*. 4. Multiplex-PCR. 5. Prevalência. I. Vieira, Luisa Lemos. II. Milette, Luiz Claudio. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

CDD: 636.089696 - 20.ed.

LUISA LEMOS VIEIRA

**PREVALÊNCIA E DINÂMICA DE INFECÇÕES POR
Anaplasma marginale, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* EM
BOVINOS NA REGIÃO SERRANA DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada no Curso de Pós-Graduação em
Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da
Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV - UDESC), como
requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador: _____

Professor Dr. Luiz Claudio Miletti
Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UDESC

Membro: _____

Professor Dr. André Thaler Neto
Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UDESC

Membro _____

Professor Dr. Antonio Pereira de Souza
Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UDESC

Membro _____

Pesquisadora Dr^a Claudia Cristina Gulias Gomes
Empresa Brasileira de Pesquisa Veterinária - EMBRAPA

Lages, 11/02/2014

Dedico, com meu mais sincero amor, à minha filha, Ana Francisca, aos meus pais, Carlos e Iara, aos meus irmãos, Carla e Rafael e a meu avô José Virgílio (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Agradeço à minha família por todo apoio e principalmente a meus pais, Carlos e Iara, por me receberem de braços abertos em seu lar para realização desta etapa de minha formação profissional, a meus irmãos que mesmo de longe estavam sempre torcendo por cada etapa deste trabalho e a meus avós que sempre se mostraram interessados em ajudar de alguma forma, principalmente meu avô Juca, que compartilhou suas experiências enquanto estava em nosso convívio.

A meu orientador, professor, colega e amigo Dr. Luiz Claudio Miletti, por toda sua dedicação e compreensão. Agradeço por sempre se prontificar em compartilhar todo seu conhecimento para auxiliar no caminho de minha formação.

A professora Mere Saito, a mestranda Mirelly Medeiros e todos do Laboratório Clínico Veterinário CAV - UDESC que se comprometeram em realizar as análises hematológicas das amostras.

A Cristina Perito por ter auxiliado no contato com produtores, assim como aos colegas Veterinários da CIDASC. Agradeço a todos os produtores que abriram as portas de suas fazendas e se dispuseram a auxiliar na coleta de material e fornecer informações imprescindíveis ao trabalho.

Aos membros da banca, André Thaler Neto, Antonio Pereira de Souza e Claudia Cristina Gulias Gomes que disponibilizaram seu tempo e conhecimento para melhorar este trabalho. Aproveito para agradecer ao professor André Thaler e a colega Dileta Alessio que processaram as análises estatísticas deste trabalho.

À UDESC por proporcionar a possibilidade de realização do mestrado. Aos professores e coordenador do programa de Pós Graduação que contribuíram para minha formação. Às agências fomentadoras PROMOP e CAPES.

A todos os colegas de laboratório pelo companheirismo, auxílio e amizade, em especial à Mariana Feltrin Canever que possibilitou a agilidade na execução das técnicas realizando um teste piloto, além de ser minha fiel companheira de coletas de sangue, de baixo de chuva ou de sol. Assim como meu compadre Leonardo que esteve presente em praticamente todas as coletas. Agradeço o auxílio dos colegas de

laboratório e de pós-graduação Franciane Batista, Ediane Paludo, Paulo Weiss, Julio Moraes, Cícera Lazzarotto, Daniel Pereira, Maria Gabriela Dambrós, Michael Padilha, Aluisio Deola, Luigh Simioni, Mauricio Camera, Mauricio Zanette e professora Maria de Lourdes.

Aos colegas de mestrado pelo apoio e amizade nesta etapa que precisei contar com a ajuda de tantos de vocês. Não esquecerei os cuidados e carinho que ofereceram a mim e minha filha por todo esse tempo, em especial a Ju, Edi, Sheyla, Alais, Marcos, Rodrigo, Claudia, Patrícia, Fran, Leo e Elvis.

Por fim, não posso deixar de agradecer a Deus por permitir que momentos como esse possam ser possíveis. Foi através do dom da vida que Ele permitiu que eu realizasse este trabalho e ao mesmo tempo pudesse oferecer este dom a outro ser, gerando meu amor infinito em minha filha neste período que marcará minha vida para sempre, resultado de um esforço imensurável para dedicar meu tempo à criação dela e a concretização de minha formação profissional como mestre.

Obrigada de coração a todos!

RESUMO

VIEIRA, Luisa Lemos. **Prevalência e dinâmica de infecções por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos na região serrana de Santa Catarina**. 2014, 87p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

Anaplasma marginale (THEILER, 1910), *Babesia bovis* (BABES, 1888) e *B. bigemina* (SMITH & KILBORN, 1893) são microorganismos intra-eritrocitários obrigatórios responsáveis por causar prejuízos ligados a alta morbidade e mortalidade em várias regiões do Brasil. Com intuito de avaliar a dinâmica de infecção e prevalência desses parasitas em bovinos da região serrana de Santa Catarina, 257 amostras de sangue de animais com idade entre três meses e onze anos, foram coletadas entre março de 2012 e julho de 2013, em dezesseis municípios da região. As amostras foram divididas em cinco classes de acordo com a idade, onde o grupo (A) foi composto de animais de 4 a 6 meses, o grupo (B) animais entre 7 e 12 meses, o grupo (C) de 13 a 24 meses, o grupo (D) de 25 e 36 meses e no grupo (E) com mais de 36 meses. As amostras foram utilizadas para análises hematológicas, processadas no Laboratório Clínico Veterinário do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) e para pesquisa dos agentes parasitários pela Multiplex-PCR, no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores - LABHEV. Eritrograma e leucograma foram realizados em contador eletrônico (CELM CC-530) e contagem diferencial de leucócitos por análise citológica em microscopia óptica. A extração de DNA foi realizada pelo método de fenol e clorofórmio. Com o uso da técnica Multiplex-PCR, foram detectadas prevalência de *A. marginale* em 27,24% dos bovinos, *B. bovis* em 29,57% e *B. bigemina* em 16,73% dos animais. Através da análise estatística verificou-se associação entre presença dos microorganismos e as classes etárias. A alteração hematológica mais relevante encontrada foi na porção leucocitária, onde a leucocitose foi observada na média geral dos animais amostrados. Contudo, as infecções foram apresentadas em animais saudáveis, o que demonstra infecções sub-clínicas nos bovinos estudados. A região estudada foi caracterizada em estado de instabilidade enzoótica, já que a prevalência

dos microrganismos se deu em menos de 75% da população estudada, situação que requer cuidados no controle de vetor e parasitos por ser propícia à ocorrência de surtos da doença.

Palavras-chaves: Tristeza parasitária bovina; *Babesia*; *Anaplasma*; multiplex-PCR; prevalência.

ABSTRACT

VIEIRA, Luisa Lemos. **Prevalence and dynamic of infections by *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in bovines on the highlands region of Santa Catarina.** 2014, 87f. Dissertation (MSc in Animal Science - Area: Animal Production) - Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2014.

Anaplasma marginale (THEILER, 1910), *Babesia bovis* (BABES, 1888) and *B. bigemina* (SMITH & KILBORN, 1893) are obligatory intraerythrocytic microorganisms that are responsible for high mortality and morbidity rates in several regions of Brazil. The goal of this project was to investigate the infections dynamics and the pathogens prevalence in cattle located in the mountain region of Santa Catarina, Brazil. For this purpose, 257 blood samples from animals with age between four months and eleven years were collected from March 2012 to July 2013, in sixteen cities of the region. The samples were grouped in five classes according to age, Group A were compounds of the animals with six months or less; Group B animals from 7 to 12 months, Group C animals from 13 to 24 months, Group D animals from 25 to 36 months and Group E animals with more than 36 months. Blood samples were submitted to hematological analysis, conducted at Laboratório Clínico Veterinário – Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), and pathogen investigation was examined by Multiplex-PCR, in Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores – LABHEV (CAV). Erythrogram and WBC were performed on electronic counter (CELM CC-530), and differential leukocyte counts by cytological analysis in optical microscope. The DNA extraction was performed by the phenol-chloroform method. Using the Multiplex-PCR technique, we were able to detect *Anaplasma marginale* prevalence in about 27.24%, *B. bovis* in 29.57% and *B. bigemina* in 16.73% of the animals. Statistical analysis showed correlation between the presence of the microorganisms and the animals groups age. The hematological modifications most significant were found on WBC, where leukocytosis was founded in the overall average of animals. However, infections were delivered in healthy animals, which shows sub-clinical infections in animals studies.

The study area was characterized in enzootic instability, since the prevalence of microorganisms occurred in less than 75% of the population, situation that requires care in vector control and parasites to be conducive to outbreaks of disease.

Key-words: Tick born disease; *Babesia*; *Anaplasma*; Multiplex-PCR; prevalence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização da região abordada no experimento. Mesorregião Serrana de Santa Catarina, Brasil.....	38
Figura 2 – Animais de propriedade amostrada do município de Paineiras.....	40
Figura 3 – Coleta de sangue em vasos coccígeos, realizada em tubos à vácuo.	41
Figura 4 – Multiplex-PCR de controles positivos de <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i> , em imagem registrada por sistema documentador, em gel de agarose 0,8%.....	46
Figura 5 – Distribuição de <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i> em cada município da região serrana de Santa Catarina, representados por pontuação de zero (▲) a mais de 60% (●●●●) de prevalência.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de propriedades amostradas por município e o número de amostras recolhidas em cada propriedade.	39
Tabela 2 – Grupos por classes de idade dos bovinos amostrados (idade dos bovinos/ número de amostras por classe).	40
Tabela 3 – Eritrograma com valores de referência para bovinos	42
Tabela 4 – Leucograma com valores de referência	42
Tabela 5 – Sequência dos <i>primers</i> de <i>Anaplasma marginale</i> , de <i>Babesia bovis</i> e de <i>Babesia bigemina</i> , utilizados na reação de Multiplex- PCR, apresentando a sequência dos nucleotídeos, o tamanho do <i>amplicon</i> esperado e autor que descreveu o <i>primer</i>	44
Tabela 6 – Número de amostras positivas à Multiplex-PCR para <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i> e frequência para infecções isoladas e infecções concomitantes.....	47
Tabela 7 – Frequência de <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i> em cada classe de idade, sendo “n” o número total de animais por classe de idade e “%” o frequência de positivos em todas as amostras analisadas.	48
Tabela 8 – Frequência de <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i> em relação a variável estação do ano, onde “n” representa número de animais coletados em cada estação do ano, e “%” representa a frequência de animais positivos à m-PCR	49
Tabela 9 – Frequência de infecção por <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i> em relação a variável altitude das propriedades onde foram coletadas as amostras.	49
Tabela 10 – Prevalência de <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i> em cada município, onde (n) é o número de animais coletados no município e (%) é o percentual de positivos para cada município.	50
Tabela 11 – Resultados do hemograma para os grupos de idade e condição de infecção, apresentando contagem total de eritrócitos, volume globular (VG), concentração de hemoglobina (Hb), volume globular médio (VGM) e concentração média de hemoglobina (CHCM).	53
Tabela 12 – Resultados do leucograma para os grupos de idade e condição de infecção, apresentando contagem total de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos) e plaquetas.....	54

Tabela 13 – Contagem total de eritrócitos, volume globular (VG) e resultado da Multiplex-PCR para animais que apresentaram alterações fora dos padrões estabelecidos na contagem total de eritrócitos....	55
Tabela 14 – Médias de eritrócitos, volume globular médio, concentração média de hemoglobina, linfócitos e basófilos em cada classe de idade.....	56
Tabela 15 – Valores de média de eritrócitos, volume globular, hemoglobina, volume globular médio e concentração média de hemoglobina, para animais positivos e negativos à <i>Anaplasma marginale</i>	57
Tabela 16 – Valores de média de eritrócitos, volume globular, hemoglobina, volume globular médio e concentração média de hemoglobina, para animais positivos e negativos à <i>Babesia bovis</i>	58
Tabela 17 – Valores de média de eritrócitos, volume globular, hemoglobina, volume globular médio e concentração média de hemoglobina, para animais positivos e negativos à <i>Babesia bigemina</i> .	59
Tabela 18 – Leucograma dos animais positivos e negativos para <i>Anaplasma marginale</i> , apresentando valores absolutos de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e plaquetas.....	61
Tabela 19 – Leucograma dos animais positivos e negativos para <i>Babesia bovis</i> , apresentando valores absolutos de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e plaquetas.	62
Tabela 20 – Leucograma dos animais positivos e negativos para <i>Babesia bigemina</i> , apresentando valores absolutos de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e plaquetas.	63
Tabela 21 - Análise exploratória das variáveis: presença de carrapato em bovinos e uso de drogas para controle do carrapato, com relação à presença ou ausência de <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i> no bovinos amostrados.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mg – miligramas
g/dl – gramas por decilitro
µg – microgramas
µL – microlitros
% - Percentagem
°C – Graus Celsius
Bas - basófilos
CEPA – Centro de sócio economia e planejamento agrícola
DNA – ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic acid*)
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetra acetic acid*)
ELISA-I - Ensaio de Imunoadsorção Enzimática Indireta
Eos - eosinófilos
Hb - Hemoglobina
HI – Hospedeiro Intermediário
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Leuc - leucócitos
Mon - monócitos
M-PCR – Multiplex-PCR (*Multiplex Polymerase Chain Reaction*)
MSP – Proteína Maior de Superfície (*Major Surface Proteins*)
NaCl – cloreto de sódio
Neut - neutrófilos
PB – pares de base
PCR – reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)
Plaq - plaquetas
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)
TPB – Tristeza parasitária bovina
TRIS - tris-hidroximetilaminometano
US\$ - dólar norte americano
VG - Volume globular
VGM - Volume globular médio

SUMARIO

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>21</u>
<u>2</u>	<u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	<u>25</u>
2.1	COMPLEXO CARRAPATO / TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA .	25
2.2	BABESIOSE BOVINA	26
2.2.1	EPIDEMIOLOGIA, SINAIS CLÍNICOS E PATOGENIA DA BABESIOSE	28
2.2.2	TRATAMENTO.....	30
2.3	ANAPLASMOSE BOVINA	30
2.3.1	EPIDEMIOLOGIA, SINAIS CLÍNICOS E PATOGENIA DA ANAPLASMOSE ...	31
2.3.2	TRATAMENTO.....	33
2.4	PROFILAXIA DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA.....	33
2.4.1	CONTROLE DE VETORES.....	33
2.4.2	QUIMIOPROFILAXIA	34
2.4.3	IMUNOPROFILAXIA.....	34
<u>3</u>	<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>36</u>
<u>4</u>	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>37</u>
4.1	PROPRIEDADES E ANIMAIS.....	37
4.2	ANÁLISES HEMATOLÓGICAS	41
4.3	AQUISIÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS.....	42
4.4	EXTRAÇÃO DE DNA	43
4.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE-MUTIPLEX (MULTIPLEX-PCR)...	43
4.6	ESTATÍSTICA	45
<u>5</u>	<u>RESULTADOS</u>	<u>46</u>
5.1	FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO POR <i>ANAPLASMA MARGINALE</i> , <i>BABESIA BOVIS</i> E <i>BABESIA BIGEMINA</i> E SUAS INTERPRETAÇÕES.....	46

5.2	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	52
5.3	QUESTIONÁRIO E DADOS DE COLETA	64
<u>6</u>	<u>DISCUSSÃO</u>	<u>66</u>
<u>7</u>	<u>CONCLUSÃO</u>	<u>71</u>
<u>8</u>	<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>72</u>
<u>9</u>	<u>ANEXO A.....</u>	<u>85</u>
<u>10</u>	<u>ANEXO B</u>	<u>86</u>

1 INTRODUÇÃO

A pecuária no Brasil vem apresentando crescimento na representatividade econômica do País, sendo em 2011 o setor que mais cresceu, com 3,9% de aumento (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011; 2012). A cada ano, a participação brasileira no comércio internacional vem sendo incrementada, com destaque para a produção de carne bovina. Segundo o Ministério da Agricultura (2013), até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial. Essas estimativas indicam que o Brasil pode manter posição de primeiro exportador mundial de carnes bovina.

Além da exploração da pecuária de corte, o Brasil demonstra crescimento na cadeia produtiva do leite. Segundo dados da Pesquisa Pecuária Municipal, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2012, na região Sul do Brasil, foram produzidos 10,73 bilhões de litros de leite, o que representa 33,2% da produção nacional. Santa Catarina contribuiu com 8,4% da produção (LIMA FILHO, 2013), ocupando a quinta posição no ranking nacional (ZOCCAL, 2001).

Apesar de os indicadores econômicos serem favoráveis à produção pecuária no Brasil e em Santa Catarina, muitos desafios devem ser vencidos para que ocorra a maximização neste setor. Dentre estes, destaca-se a dificuldade no controle de algumas enfermidades, como as doenças parasitárias e infecciosas, sendo uma delas a popularmente conhecida Tristeza Parasitária Bovina (TPB).

A TPB é uma doença amplamente distribuída pelo País ocorrendo em bovinos de diversas raças e os agentes parasitários podem estar presentes em todas as idades, em forma de doença clínica ou subclínica. É causado pela infecção isolada ou concomitante dos protozoários *Babesia bovis* (Apicomplexa: Piroplasmorida) e *Babesia bigemina* (Apicomplexa: Piroplasmorida) e a rickettsia *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae).

Pesquisas demonstram que os gastos com a TPB no Brasil, podem chegar a US\$ 500 milhões anualmente, estimados em US\$ 2 bilhões por ano quando se trata do complexo carrapato/TPB (GRISI et al., 2002). Os prejuízos econômicos à exploração leiteira estão relacionados à alta mortalidade, redução da produção de leite, e conversão alimentar ruim (CAVALCANTE, 2007), além disso, redução no ganho de peso, infertilidade temporária, gastos com controle e

profilaxia e principalmente por mortes, afetam o gado de modo geral (GONÇALVES, 2000; BARROS et al., 2005).

A manifestação clínica da TPB é semelhante em infecção por algum dos três agentes. O primeiro sinal de doença é demonstrado quando o animal mantém-se afastado do restante do rebanho, apresentam sinais de apatia, hiporexia, que podem evoluir para febre, anemia, emagrecimento, queda na produção e morte. Fatores como, presença do vetor, o clima, manejo dos animais, condições fisiológicas do hospedeiro e também a raça estão relacionados à manifestação e evolução da doença (SOUZA et al., 2000b).

A babesiose é uma doença secular, descoberta em 1888, por Victor Babes, quando ainda era relacionada à hemoglobinúria enzoótica. Na América Latina, é causada pelos protozoários *B. bovis* e *B. bigemina*, onde o único vetor conhecido até hoje é o carrapato *Rhipicephalus microplus* (GUGLIELMONE et al., 1995). A doença clínica é relacionada a ciclos de invasão e multiplicação dos protozoários em eritrócitos do hospedeiro (RODRIGUES et al, 2005). Bracarense et al. (2001), relataram também a ocorrência de transmissão congênita de *B. bovis* em um bovino, no estado do Paraná. Já a anaplasmosse é causada pela rickettsia *A. marginale* (HORNOK et al., 2008), e pode ser transmitida mecanicamente por dípteros hematófagos e fômites contaminados ou, biologicamente, através do carrapato *R. microplus* (ARAÚJO et al., 1998). Em mamíferos, pode acontecer também a transmissão congênita ou transplacentária (RIBEIRO; LIMA & GUIMARÃES, 1995; KESSLER, 2001).

O diagnóstico baseado apenas nos sinais clínico pode ser impreciso devido à semelhança encontrada na manifestação da doença por algum um dos três agentes. O exame parasitológico direto, realizado em esfregaços sanguíneos de vasos periféricos, auxilia no diagnóstico clínico de rotina. Contudo apresenta a desvantagem de baixa sensibilidade em animais portadores, cuja doença crônica caracteriza-se por baixa parasitemia em vasos periféricos, permanecendo preferencialmente em vasos que irrigam órgãos centrais (de Vos; MOLLOY; JORJENSEN, 2000).

Em inquéritos epidemiológicos, as técnicas sorológicas são muito utilizadas, dentre elas destacam-se a reação de imunofluorescência indireta (RIF-I), fixação de complemento (FC) e imunoadsorção enzimática indireta (ELISA-I). O teste de ELISA-I foi um dos testes mais utilizados, e permite avaliar diversas amostras em curto espaço de tempo, utilizando leitura mecanizada e rápida

(TIZARD, 2002), porém não determina a presença do microrganismo no momento do exame. Já as metodologias baseadas na biologia molecular permitem a detecção de agentes parasitários em diversos estágios de infecção.

A aplicação das técnicas baseadas na PCR, em inquéritos epidemiológicos da TPB, vem crescendo no âmbito da pesquisa, e tem como principal vantagem a possibilidade de confirmar a presença e a discriminação dos parasitos quando em níveis muito baixos no sangue de animais portadores (ALMERIA et al., 2001), apesar de não ser quantitativa e ser propensa a contaminação do *amplicon*. Esta vantagem é de fundamental importância para a elaboração de programas de controle da doença. A alta especificidade e sensibilidade da PCR convencional, já foram verificadas por vários autores. Figueroa et al. (1992), constataram um limite de detecção por Multiplex-PCR, em amostras com infecções mistas, de 0,0001%, 0,00001% e 0,00001% para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Smeenk et al. (2000), detectaram o DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos e carrapatos, encontrando prevalência de 35% para *B. bigemina* e 47% para *B. bovis* nos animais estudados. Almeria et al. (2001), adotaram a PCR como ferramenta para investigação de prevalência de *Babesia* spp. em bovinos de Minorca, além disso, compararam a eficiência da técnica de PCR com a técnica de esfregaço sanguíneo, obtendo um valor significativamente maior na eficácia de detecção pela PCR.

A técnica modificada da PCR, conhecida como Multiplex-PCR, apresenta a vantagem de detectar diversos parasitos ao mesmo tempo em uma mesma amostra, diferente da PCR convencional, que detecta um único microrganismo por vez. Desta forma, para a investigação de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* e uma amostra, bastaria uma reação para confirmar a presença ou ausência destes.

Souza et al (2002), utilizando a técnica de imuno-fluorescência indireta, verificaram prevalência de 76,8% de *B. bovis*, e 84,5% de *B. bigemina* em bovinos leiteiros de cinco municípios do Planalto Catarinense. Canever et al (2013), utilizaram a técnica da Multiplex-PCR para diagnóstico da TPB pela primeira vez no estado de Santa Catarina, em um surto ocorrido no município de Ponte Alta, verificando o DNA de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* nas amostras de sangue dos bovinos na proporção de 18,2%, 63,3% e 60,6%, respectivamente.

Com relação à classificação epidemiológica para a babesiose bovina, descrita por Smith et al (2000), áreas de estabilidade enzoótica ocorrem quando a taxa de infecção (taxa de inoculação) de *Babesia* spp.

por carrapatos é suficiente para imunizar a maioria dos bovinos susceptíveis, antes que estes percam a resistência por conta da imunidade adquirida. Devido ao fato de *A. marginale* poder ser transmitida pelo mesmo vetor que a *Babesia* spp., a mesma classificação epidemiológica vem sendo atribuída a este parasito. Segundo Mahoney & Ross (1972), uma taxa de infecção a cima de 75% é preconizada para manter-se um situação de estabilidade enzoótica, e de 12 a 75% para áreas em instabilidade enzoótica. Porém outros fatores são levados em consideração, como a situação imunológica do hospedeiro, as condições de desenvolvimento do vetor no ambiente e raça dos bovinos.

O Brasil é considerado um país de característica enzoótica devido à constante transmissão dos agentes, porém existem algumas regiões como sertão e sul brasileiro, em que as condições climáticas não favorecem o desenvolvimento do vetor (GONZALES, 1995; LIMA et al., 1999). No sul do País, principalmente algumas regiões do Rio Grande do Sul, a doença causa prejuízos econômicos consideráveis em decorrência da alta mortalidade e morbidade, justamente por ser área de instabilidade enzoótica, devido à transmissão esporádica ou irregular dos agentes parasitários da TPB (BRASIL et al., 1982).

Diversas pesquisas demonstrando a prevalência de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* no País tem sido realizadas, objetivando classificar regiões de estabilidade ou instabilidade enzoótica. Entretanto, no estado de Santa Catarina, poucos municípios foram estudados até hoje, destacando os trabalhos de Dalagnol et al. (1999) e Souza et al. (2002) onde detectaram alta prevalência para as babesias, através de exames sorológicos.

Conhecer a dinâmica de infecção causada por esses agentes é necessário para adoção de medidas preventivas, pois visa reduzir gastos e perdas, e em consequência manter a produtividade dos rebanhos em níveis excelentes, em se tratando desta enfermidade. Para conhecer a prevalência e dinâmica de infecções por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* na região Serrana de Santa Catarina, procedeu-se este trabalho, utilizando técnica de Multiplex-PCR, exames hematológicos e dados obtidos por meio de entrevista com os produtores rurais da região.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPLEXO CARRAPATO / TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de doenças causado por infecções com *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, que apresentam como mais importante vetor o carrapato *R. microplus*. A relação entre presença da doença e do carrapato demonstra a importância do entendimento do ciclo de vida do vetor, que é principalmente afetado pelas variações climáticas.

O carrapato *R. microplus* tem maior importância em regiões tropicais e subtropicais (CANTÚ-MARTÍNEZ et al., 2008), apresentando condições apropriadas para sobrevivência, multiplicação e disseminação em algumas regiões entre os paralelos 32° norte e 32° sul (NUÑES, 1982). Contudo, variações climáticas sazonais afetam a situação epidemiológica para o carrapato (SANTOS JUNIOR; FURLONG; DAEMON, 2000) e, consequentemente para a TPB. Podem ocorrer ainda áreas livres para a doença, onde as condições são desfavoráveis ao aparecimento e desenvolvimento do carrapato. Em áreas de instabilidade enzoótica o desenvolvimento do carrapato ocorre, mas não é constante durante o ano. Quando as condições climáticas são favoráveis à presença e desenvolvimento do ciclo completo do carrapato durante o ano todo, gera-se uma situação de estabilidade enzoótica (MAHONEY & ROSS, 1972).

Com a localização tropical que encontramos em maior parte do território brasileiro e fatores climáticos que favorecem o desenvolvimento e a sobrevivência do *R. microplus* na maioria dos meses do ano (EVANS, 1992), a presença deste carrapato é praticamente constante no país. Hitchcock, 1955, verificou a temperatura do ar como principal fator climático influenciando na taxa e duração de oviposição sendo a temperatura ideal entre 26,7°C a 29,4°C e o limite mínimo de 15°C e o máximo de 40,6°C. A umidade do ar também é outro fator limitante para eclosão dos ovos, sendo que valores a baixo de 70%, com reduzido índices pluviométricos, tornam-se críticos para esta fase.

Em um levantamento realizado por Horn & Arteché (1985), englobando 75% do território brasileiro foi constatada a presença do *R. microplus* em 98% dos municípios, estando 66% presente durante os 12 meses do ano. Contudo, regiões como extremo Sul do Brasil, com

baixas temperaturas, região Norte, com excesso de chuva e umidade do solo, e regiões com baixa precipitação de chuvas, como no sertão Nordestino, as condições para sobrevivência do carrapato são desfavoráveis (HORN & ARTECHE, 1985).

O *R. microplus* é um parasito monoxeno, ou seja, depende apenas de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida, apresentando uma fase de vida livre e outra de vida parasitária. Na fase de vida livre, as teleóginas desprendem-se do hospedeiro e vão para o solo, onde farão oviposição precedida de um período de dois a três dias de pré-postura (GONZALES, 1974). Cada fêmea põe de 200 a 3000 ovos. O período entre a queda da fêmea ingurgitada até maturação das larvas infectantes pode durar em média 28 a 51 dias, se estendendo até 300 dias em condições ambientais desfavoráveis (GONZALES, 1974). Já a fase de vida parasitária dura cerca de 20 dias, iniciando com a fixação da larva no hospedeiro, onde ocorrem duas mudas, uma de larva para ninfa e outra de ninfa em adulto, macho ou fêmea. A fêmea adulta permanece fixada ao hospedeiro para cópula que ocorre a partir do 17º dia de fixação (LONDT, ARTHUR, 1975), e para alimentação, podendo aumentar em até 200 vezes seu peso, enquanto o macho pode realizar a cópula em mais de uma fêmea.

A transmissão de *B. bovis* ocorre no estágio larval do carrapato (FARIAS, 2007) e *B. bigemina* ocorre por ninfas e adultos (SOUZA et al., 2000a), ocorrendo a liberação destes através das glândulas salivares do carrapato (RIEK, 1964, 1966), assim como a infecção dos carrapatos ocorre no momento da alimentação em bovinos infectados com *Anaplasma* spp. ou *Babesia* spp. Admite-se a ocorrência de transmissão transtadial para *A. marginale*, que será abordada a diante.

Apesar de a TPB ser causada por agentes etiológicos distintos, apresenta sinais clínicos e epidemiológicos semelhantes. Quando são identificados sintomas mais específicos para algum dos agentes, podem ser chamados então de anaplasmose ou babesiose bovina.

2.2 BABESIOSE BOVINA

Os primeiros relatos de babesiose bovina datam de 1888, na Europa, quando o pesquisador Victor Babés reconheceu um microorganismo em bovinos e identificou como *Haematococcus bovis* (UILEMBERG, 2006). Nesta época, a doença era conhecida por hemoglobínúria enzoótica, devido aos sinais característicos apresentados pelos animais doentes. Já em 1893, os pesquisadores americanos Smith

e Kilborne demonstraram o microorganismo causador da “Febre do Texas” (babesiose – *B. bigemina*), a qual possuía sintomas semelhantes à hemoglobinúria enzoótica bovina e conseguiram caracterizar-lo como um protozoário, que foi denominado de *Pyrosoma bigeminum* (SMITH & KILBORN, 1893). No mesmo ano, Starcovici verificou a similaridade entre os organismos descritos por Babés na Romênia, e Smith e Kilborne nos Estados Unidos, e propôs a inclusão de ambos em um novo gênero chamado *Babesia* spp. (UILENBERG, 2006).

O gênero *Babesia* spp. pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, ordem Eucoccidiorida, subordem Piroplasmorina e família Babesiidae (LEVINE, 1988; ALLSOPP et al., 1994). Apresentam oito espécies que podem infectar os bovinos, sendo presente no Brasil e América Latina apenas *B. bovis* e *B. bigemina*. No Brasil a doença foi relatada pela primeira vez em 1901, em animais recém-importados e em fase de aclimação no Rio de Janeiro (FONSECA e BRAGA, 1924).

O ciclo de vida da *Babesia* spp. é formado por um estágio no vetor, o hospedeiro invertebrado, e um estágio no hospedeiro intermediário (HI). O ciclo se inicia pela inoculação de esporozoítos (forma infectante), presentes na glândula salivar dos carrapatos, no hospedeiro intermediário no ato do repasto sanguíneo, invadindo os eritrócitos (RIEK, 1964, 1966). A interação do esporozoíto com o eritrócito é extremamente específica, já que a *Babesia* spp. não invade outro tipo celular, isto implica que existem receptores no eritrócito que são reconhecidos por moléculas complementares no parasito, provavelmente presentes na membrana externa dos esporozoítos (BUSHELL, 1991).

Quando os esporozoítos estão na corrente sanguínea do HI, a multiplicação assexuada, que ocorre por fissão binária, dará origem aos merozoítos, de formato piriforme visível ao microscópio óptico, morfologia esta que caracteriza o gênero *Babesia* e suas diversas espécies. Com este processo, ocorre lise em eritrócitos inoculados, seguida de invasão de células vizinhas, causando diferentes graus de anemia e repetindo o fenômeno em várias células.

A infecção no carrapato ocorre quando ingere sangue do HI contaminado por *Babesia* spp., em fase de merozoítos. Alguns parasitos degenerados serão destruídos no intestino do vetor, contudo alguns estágios específicos (“pré-gametócitos”) sobrevivem e sofrem alterações morfofisiológicas adaptativas evoluindo para gametócitos, se preparando assim, para o início de um ciclo sexuado (CHAUVIN,

2009). Estes gametócitos se desenvolvem no intestino do carrapato formando os micro (masculino) e macrogametas (femininos), que se fundem para formar o zigoto móvel - ooquinetto (MEHLHORN e SCHEIN, 1984). O zigoto então penetra nas células do epitélio intestinal do carrapato, e se multiplica por esquizogonia, dando origem aos esporocinetos, maiores e em forma de arco, que são liberados na hemocele (MOSQUEDA, 2004).

Os esporocinetos invadem a hemolinfa do vetor, onde se iniciam ciclos de fissão múltipla nos diversos órgãos da fêmea ingurgitada, principalmente nas fibras musculares e células do ovário, resultando na infecção dos oócitos, caracterizando uma transmissão por via transovariana do *R. (B.) microplus* (MAHONEY e MIRRE, 1979; DA COSTA, 1997). Uma vez os ovos infectados, vários ciclos de esquizogonia ocorrem nos embriões e larvas, culminando com a presença de estágios multinucleados nas glândulas salivares dos carrapatos jovens, que irão se dividir para formar os esporozoítos (SACCO, 2002), sendo que esse desenvolvimento só inicia quando o carrapato infectado ataca o hospedeiro vertebrado.

No ciclo de *B. bigemina* ocorre algum desenvolvimento de esporozoítos na alimentação das larvas, mas os esporozoítos infectantes levam cerca de nove dias para aparecer, sendo então transmitida por ninfas e adultos de *R. (B.) microplus*, que mantém a infecção por várias gerações (BOCK, 2004). No caso da *B. bovis* a formação de esporozoítos infectantes ocorre geralmente dentro de dois a três dias após fixação do estágio larval, sendo transmitida somente nesse estágio, perdendo a infecção após a alimentação (RIEK, 1966). O período de incubação de *B. bovis* varia de 6 a 12 dias e de *B. bigemina* de 12 a 18 dias após a fixação dos carrapatos (BOCK, 2004).

2.2.1 Epidemiologia, Sinais clínicos e Patogenia da Babesiose

De acordo com a dinâmica das populações de carrapatos *B. microplus*, a babesiose pode ser caracterizada em situação de estabilidade ou de instabilidade endêmica. A situação de estabilidade endêmica é caracterizada pela frequente transmissão dos protozoários, de forma que a primo-infecção dos bovinos ocorre durante o período em que os animais jovens estão protegidos pela imunidade passiva e sob a ação da resistência inata. Essa situação é caracterizada pela ocorrência de muitos casos sub-clínicos e poucos casos clínicos da enfermidade

(GUGLIELMONE et al., 1995). Nos locais onde o desenvolvimento do *R. (B.) microplus* é limitado, surgem as regiões de instabilidade endêmica, em que podem ocorrer surtos isolados de babesiose (BARCI et al, 1994). Nesta situação, a frequência de anticorpos é inferior a 75% (MAHONEY & ROSS, 1972).

Em áreas endêmicas, os bezerros recebem proteção passiva de anticorpos presentes no colostro, aproximadamente até três meses de idade (JAMES et al., 1985), tornando-se resistentes a babesiose. Além da imunidade passiva, animais jovens apresentam maior resistência devido à maior atividade eritropoiética da medula óssea, à função protetora da hemoglobina fetal e à rápida atividade da imunidade inata (BOCK et al., 2004). A proteção pode persistir por até seis meses de idade para *B. bovis* e de três a quatro meses para *B. bigemina*. Após a primo-infecção, os animais permanecem sorologicamente positivos por um período de quatro anos para *B. bovis* e, pelo menos, dois anos para a *B. bigemina* (WRIGHT & GOODGER, 1990), mantendo-se com infecção sub clínica por *B. bovis*, persistentemente.

Animais que manifestam a doença clínica, inicialmente isolam-se do rebanho, apresentam depressão e prostração. A ação hemolítica decorrente da multiplicação assexuada das babesias leva a um quadro anêmico, sendo mais pronunciado nos casos de *B. bigemina* (ARAGON, 1976), mas ocorrem também com *B. bovis*. Febre, atonia ruminal, anorexia, bilirrubinemia, hemoglobinúria são sinais característicos da babesiose. Os primeiros sinais febris normalmente são decorrentes das infecções por *B. bigemina*, cuja parasitemia é maior e o pico febril próximo a 40°C (MASSARD & FURLONG, 1994). Já em infecções por *B. bovis* a parasitemia é menor, visto que esta espécie tem característica viscerotrópica, não havendo intensa hemoglobinememia e hemoglobinúria.

Infecções por *B. bovis* tem um início rápido e na primo-infecção em bovinos sensíveis podem ser fatais, ocasionadas por uma disfunção ou falha pulmonar, renal e cerebral (WRIGHT & GOODGER, 1988). Este tipo de disfunção ocorre devido à presença dos merozoítos em capilares, levando à vasodilatação, hipotensão arterial, aumento da permeabilidade capilar, edema, colapso vascular, distúrbios de coagulação, dano endotelial e estase circulatória (AHMED, 2002). Este quadro caracteriza a babesiose cerebral que leva a manifestações nervosas como incoordenação motora, andar cambaleante, movimentos de pedalagem, convulsão, agressividade, opstótono, coma e morte (RODRIGUES et al., 2005).

2.2.2 Tratamento

No tratamento para babesiose podem ser empregados dois tipos de fármacos específicos, como os derivados de diamidinas e os derivados de imidocarb. A dose terapêutica das diamidinas é de 3,5 mg/Kg de peso vivo (BOCK, 2004), em dose única via intramuscular. O dipropionato de imidocarb é indicado no tratamento profilático e preventivo da babesiose, sendo indicado para bovinos susceptíveis que serão introduzidos em áreas de conhecida incidência de babesiose, na dose de 1 a 2 mg/kg de peso vivo.

2.3 ANAPLASMOSE BOVINA

O histórico desta doença está entrelaçado ao histórico da babesiose, desde o início das pesquisas realizadas por Smith e Kilborne quando identificaram granulações em eritrócitos de bovinos doentes nos Estados Unidos. Mas foi Arnold Theiler, em 1910 quem citou o agente pela primeira vez, diferenciando os pontos marginais presentes nos eritrócitos dos bovinos, daquelas formas piriformes características de *Babesia* spp, que muitas vezes apareciam em esfregaços sanguíneos no mesmo animal (FONSECA & BRAGA, 1924).

Atualmente com base em análises genéticas dos genes 16S rRNA, groESL e de genes que codificam proteínas de superfície, a *A. marginale*, uma bactéria gram-negativa, foi classificada como um organismo pertencente ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae, sendo a espécie mais patogênica e de maior importância para os bovinos (DUMLER et al., 2001).

A transmissão biológica de *A. marginale* é feita por mais de 20 espécies de carrapatos em todo o mundo (KOCAN, 2004), sendo os gêneros de maior importância na transmissão desse agente nas Américas o *Dermacentor* sp. e o *Rhipicephalus* sp. Nestes vetores, a transmissão transtadial (que ocorre de estágio para estágio), e intraestadial (que ocorre dentro do mesmo estágio) pode ocorrer para *A. marginale*, sendo enfatizada a importância epidemiológica dos carrapatos machos, devido a sua grande mobilidade e longevidade (KESSLER, 2001). Já a transmissão transovariana não é totalmente aceita. Contudo, Moura et al. (2003), confirmaram a presença de DNA de *Anaplasma marginale* em progênes de teleógina positivas de *R. microplus* através da técnica de

Nested PCR (n-PCR) e também na progênie de teleógina negativas a n-PCR. A transmissão do parasita em hospedeiro vertebrado através da via transplacentária também é outra forma referida de ocorrência (GRAU, 2006; WANDERA & MUNYUA, 1971; BIRD, 1973).

O ciclo de vida desse parasito envolve uma série de etapas de desenvolvimento no hospedeiro intermediário. Os corpúsculos iniciais, adquiridos biologicamente ou mecanicamente pelo hospedeiro, atingem a corrente sanguínea e aderem-se aos eritrócitos por meio de moléculas adesivas de membrana (de La FUENTE et al., 2001), promovendo a invaginação da membrana eritrocítica até seu total englobamento, dando origem a um vacúolo. Em seguida, esses corpúsculos sofrem sucessivas fissões binárias até atingirem um número de quatro a oito novos corpúsculos iniciais, que se deslocam em direção a periferia do eritrócito, até a fusão do mesmo com a membrana celular. Esses corpúsculos deixam o eritrócito sem rompê-lo e invadem outras células vermelhas, dando continuidade ao ciclo (RISTIC e WATRACH, 1963; KOCAN et al., 2010). Em hospedeiros imunocompetentes, o parasita pode manter-se vivo e se multiplicando por até sete anos (KIESER et al., 1990). O carrapato se infecta durante o repasto sanguíneo, ingerindo os eritrócitos infectados do hospedeiro vertebrado, produzindo a infecção em células intestinais no carrapato. O desenvolvimento da rickettsia no vetor ocorre de forma semelhante ao que ocorre no hospedeiro intermediário, formando vacúolos na membrana das células dos vetores. A primeira forma vista na colônia é a reticulada, que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. Essa forma evolui para a forma denominada “corpos densos”, que é a forma infectante e é capaz de sobreviver por um curto período de tempo no meio extracelular (KOCAN et al., 2010). Após o desenvolvimento de *A. marginale* no intestino, muitos outros tecidos do carrapato são infectados, incluindo as glândulas salivares, a partir das quais a rickettsia é transmitida para os vertebrados durante a alimentação do carrapato (KOCAN et al., 2010).

2.3.1 Epidemiologia, Sinais clínicos e Patogenia da anaplasmosse

A distribuição da *A. marginale* ocorre de forma semelhante a das babesias, devido à presença ou ausência do vetor na região, portanto podem existir regiões livres da doença, devido à ausência do carrapato,

assim como áreas de instabilidade e outras de estabilidade enzoótica. Porém, em áreas livres do carrapato, ainda assim pode haver ocorrência de surtos, como acontece no sul da Argentina (GUGLIELMONE et al., 1995). No Brasil, onde o carrapato *R. microplus* ocorre de forma endêmica, as evidências epidemiológicas sugerem ser ele o principal vetor de *A. marginale* (GUGLIELMONE et al., 1995, KESSLER, 2001).

As manifestações clínicas em animais parasitados por *A. marginale* assemelham-se às infecções por babesias (TRUEBLOOD, MCGUIRE, 2001), fato que acaba dificultando o diagnóstico clínico. O período de incubação varia de 7 a 60 dias, com média de 28 dias (KOCAN, 2010). Nesta fase, onde ocorrem divisão e multiplicação do parasita, os eritrócitos vão sendo infectados de forma exponencial. No intuito de combater o microorganismo invasor, o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro se encarrega de fagocitar as células infectadas, o que resulta em anemia branda a severa, classificada em macrocítica e normocrômica (JATKAR, KREIER, 1967), e icterícia, sem hemoglobinúria e hemoglobinemia. Na anaplasmosse animais infectados podem também apresentar picos febris de mais de 40°C, queda na produção, fadiga, anorexia, micção freqüente, aborto e morte (VIDOTTO e MARANA, 2001).

Após infecções primárias, os parasitas persistem no organismo dos hospedeiros (KIESER, 1990), produzindo ciclos de rickettisemia ($10^{2,5}$ 10^7 eritrócitos infectados/mL de sangue,) a intervalos de aproximadamente cinco semanas (ERICKS, STILLER, PALMER, 1993), permanecendo como fonte de infecção para os vetores (GUGLIELMONE et al., 1995). Segundo Brayton et al (2005), a capacidade de se manter no hospedeiro, sem que haja destruição pelo sistema imunológico deste, se deve a variação antigênica de proteínas de superfície maior (*Major Surface Proteins* –MSP), presentes na *A. marginale*, denominadas MSP2 e MSP3.

Segundo Kocan et al. (2010), vacas em estado avançado de prenhes ou puerpério, que são persistentemente infectadas, podem reapresentar sinais da doença em forma de infecção aguda. Tais eventos estariam relacionados com a imunossupressão associada ao período periparto em vacas.

2.3.2 Tratamento

A droga de escolha no tratamento da anaplasmose são os derivados de tetraciclina. Oxitetraclinas de longa ação podem ser utilizadas na dose de 20 mg/kg, por via intramuscular, em duas doses com intervalo de 36 a 72 horas. Dipropionato de imidocarb é indicado

2.4 PROFILAXIA DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA

Os métodos de profilaxia adotados para a TPB hoje são o controle de vetores, a quimioprofilaxia e a imunoprofilaxia.

2.4.1 Controle de vetores

O controle de carrapatos como medida profilática para a TPB vem sendo usado desde a década de 50 através de acaricidas (PRUETT, 1999), como os do grupo das avermectinas, as formamidinas e os piretróides. Esses produtos químicos vêm sendo utilizados desde então por muitos produtores, sem que haja um controle mais regado de protocolo de aplicação, o que vem gerando resistência dos carrapatos, como citam diversos autores.

Gonçalves (2000) cita duas formas de controle do carrapato, uma envolve a busca pela erradicação do artrópode, como ocorreu nos Estados Unidos em 1906 e permanece na tentativa de controlar a disseminação até hoje pela vigilância sanitária (RISTIC & MONTENEGRO-JAMES, 1988), e a outra o controle estratégico deste, a exemplo do que acontece em algumas regiões no Brasil, porém de forma desorganizada e descontrolada devido ao uso indiscriminado de carrapaticidas. Melo & Carvalho (2009), recomendam o uso de banhos de imersão em bovinos da propriedade, controlando adequadamente dose e concentração dos produtos.

Adinda às dificuldades de erradicação de carrapatos no Brasil, recomenda-se um controle estratégico desses artrópodes, buscando um parasitismo durante o ano todo, porém com baixa infestação (GONÇALVES, 2000). O controle de moscas hematófagas não pode ser esquecido, devido à transmissão de *A. marginale* (GONÇALVES, 2000), principalmente em épocas com alto índice pluviométrico.

Os crescentes estudos em relação à interação hospedeiro-carrapato têm trazido uma discussão para encontrar vacinas eficientes no

combate ao carrapato. Estudos em bases moleculares e imunológicas envolvendo essa interação levaram ao desenvolvimento de vacinas baseadas em extratos de glândulas salivares de carrapatos, chamados antígenos expostos (BROWN, 1984), ou antígenos de outros tecidos, chamados antígenos ocultos (WILLADSEN, 1988; De La FUENTE, 1999). Contudo, a eficiência dessas vacinas ainda é bastante questionável, devido a alguns fatores limitantes como a escolha dos antígenos (GARCIA, 2009).

2.4.2 Quimioprofilaxia

O uso de algumas drogas no sentido de se obter a prevenção da anaplasmose e babesiose podem ser utilizadas em doses sub-terapêuticas. As tetraciclinas são exemplos de drogas utilizadas de maneira preventiva à anaplasmose. A dose recomendada da tetraciclina, como medida profilática é de 2-4 mg/kg/PV, em duas a quatro aplicações em intervalo de 21 dias. Esse tratamento pode ser iniciado em animais a partir de 30 dias de vida e a sub-dosagem permitirá ao animal adquirir a infecção, porém não apresentará sinais clínicos ou os sinais serão brandos (GONÇALVES, 2000). São recomendadas doses de 1-2 mg/kg/PV de imidocarb (KUTTLER & JOHNSON, 1986), principalmente para bezerros antes de serem postos a pasto, também em período que antecede transporte de animais. Em geral, esta medida preventiva tem por desvantagem o potencial em causar resistência aos antibióticos a outros microorganismos (HIRSH, 1974).

2.4.3 Imunoprofilaxia

A imunização dos animais associada ao controle dos vetores representa uma medida apropriada de profilaxia de Hemoparasitoses em áreas de instabilidade enzoótica (GONÇALVES, 2000).

No controle da TPB, a premunição é um método bastante antigo, mas muito utilizado até hoje e consiste na exposição dos animais aos agentes, por inoculação de sangue de bovinos portadores em susceptíveis, seguido do uso de drogas de tratamento específico para cada agente (MELO, 2009; GONÇALVES, 2000). Porém este é um método que envolve riscos no que diz respeito a infecções concomitantes que possam ser transmitidas do portador para o receptor

do sangue, como a leucose bovina, a rinotraqueíte infecciosa bovina, a diarreia viral bovina, tuberculose e leptospirose (KESSLER, 2002).

A premunição emprega a utilização de inócuos de cada agente, em geral congelados em nitrogênio líquido, para prover imunidade aos bovinos. No Brasil, algumas vacinas foram produzidas a partir da década de 1990, mas não existem exemplares no mercado atualmente.

Com os avanços de pesquisas em biologia molecular, novas estratégias de obtenção e produção de antígenos, para estimular o sistema imune de hospedeiros, vêm sendo estudadas e aprimoradas por diversos pesquisadores. A tecnologia do DNA recombinante representa um dos maiores avanços para produção de vacinas e oferecem uma série de vantagens frente às vacinas clássicas, desde o custo que é menor quando comparado às vacinas de proteína recombinante e peptídeos sintéticos, até a comercialização, pois não necessitam de refrigeração (WAINE, McMANUS, 1995).

Vacinas de DNA contra *Anaplasma marginale* tem sido investigada com diferentes proteínas de superfície (MSPs). Genes que codificam as proteínas MSP1a e MSP1b vêm sendo inseridos em vetores de células de mamíferos e testadas com inoculações em cobaias e bovinos por Kano, com resultados variados (KANO, VIDOTTO, VIDOTTO, 2007). Timms et al (1988), realizaram o primeiro estudo com a tecnologia do DNA recombinante para *B. bovis*, demonstrando pequena proteção contra desafio com cepas heterólogas.

3 OBJETIVOS

Avaliar a prevalência e dinâmica de infecções por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina* em bovinos de municípios da serra Catarinense.

Aprimorar o conhecimento da dinâmica de infecções dos agentes causadores da TPB na região serrana de Santa Catarina, baseado em correlação com dados hematológicos, idade, métodos de prevenção, controle e tratamento do complexo parasitário adotados pelos produtores da região e a presença do carrapato.

Promover difusão de conhecimento sobre a temática carrapato e TPB junto aos produtores participantes do projeto.

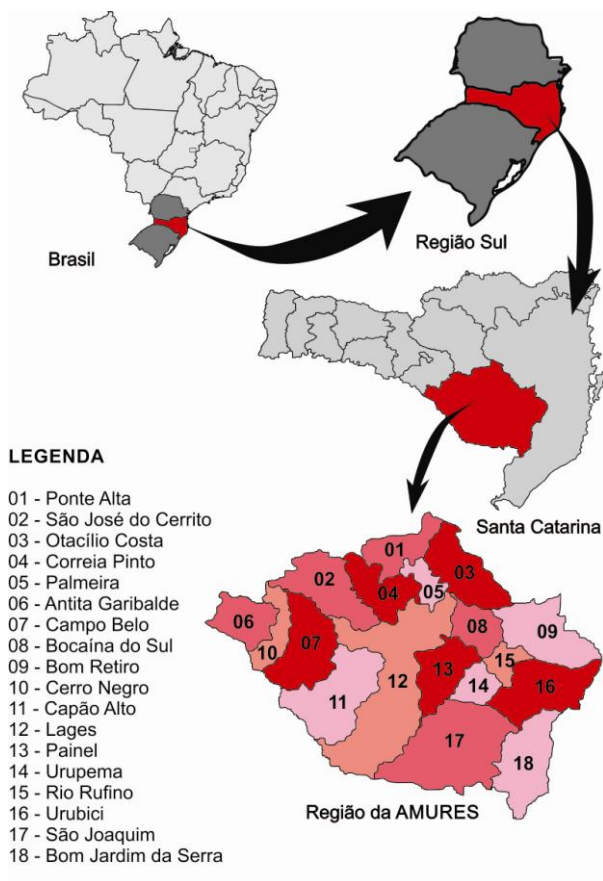
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROPRIEDADES E ANIMAIS

A pesquisa foi conduzida na mesorregião Serrana de Santa Catarina, Brasil, composta por dezoito municípios, distribuídos em 16.085,41m², equivalente a 17% do território estadual. A maior parte desta região está situada entre 850 e 900 metros de altitude, compondo um efetivo bovino de 745.507 cabeças (IBGE, 2011), distribuídos em mais de 10 mil estabelecimentos rurais (CEPA, 2003). O mapa da região é ilustrado na Figura 1.

As coletas foram realizadas no período de março de 2012 a julho de 2013, em dezesseis municípios da região Serrana, excluindo apenas Urubici e Cerro Negro. As propriedades rurais e os animais foram selecionados de maneira não probabilística, conforme conveniência de acessibilidade, contabilizando um total de 21 propriedades e o mínimo de 1% do rebanho total destas, o que permitiu a coleta de 257 amostras (Tabela 1). O número amostral foi determinado com base na equação: $n = Z^2 \times p \times q / E^2$, onde n é o número amostral, Z é o valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado (95%), p é a proporção populacional de indivíduos positivos (admitido 85%), q é a proporção populacional de indivíduos que são negativos (15%) e E é o erro máximo de estimativa.

Figura 1 – Localização da região abordada no experimento. Mesorregião Serrana de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: adaptação feita por Rafael Lemos Vieira.

Tabela 1 – Número de propriedades amostradas por município e o número de amostras recolhidas em cada propriedade.

MUNICÍPIO	Número de propriedades amostradas	Número de amostras por propriedade	Ano	Estação
Anita Garibaldi	1	10	2013	Verão
Bocaina do Sul	1	6	2013	Outono
Bom Jardim da Serra	1	16	2013	Outono
Bom Retiro	1	10	2013	Inverno
Campo Belo	1	11	2013	Inverno
Capão Alto	1	11	2013	Inverno
Correia Pinto	1	13	2013	Outono
Lages	3	12; 10; 15	2012	Outono e verão
Otacílio Costa	1	6	2013	Outono
Painel	2	19; 4	2012	Verão
Palmeira	1	4	2013	Outono
Ponte Alta	1	10	2013	Verão
Rio Rufino	1	10	2013	Verão
São Joaquim	2	15; 32	2012	Outono
São José do Cerrito	1	15	2012	Verão
Urupema	2	20; 8	2012	Primavera
TOTAL	21	257	-	-

Fonte: Luisa Lemos Vieira

As amostras foram distribuídas em cinco grupos, conforme idade, onde o grupo (A) era composto por animais com idade ≥ 3 e ≤ 6 meses; grupo (B) > 6 meses e ≤ 12 meses; grupo (C), > 12 e ≤ 24 ; grupo (D) > 24 e ≤ 36 ; e grupo (E) > 36 meses (Tabela 2). Nesta classificação 12 amostras não entraram nas análises, pois não foi possível registrar com precisão a idade dos animais referentes a estas. Raça e sexo dos animais não foram avaliados, porém foi perceptível que grande parte dos animais apresentava características de cruzamentos entre *Bos taurus* e *Bos indicus* (ver Figura 2). Em apenas três propriedades os animais

eram de aptidão para leite, sendo duas das propriedades com bovinos da raça Jersey e em outra da raça Holandesa.

Tabela 2 – Grupos por classes de idade dos bovinos amostrados (idade dos bovinos/ número de amostras por classe).

IDADE BOVINOS	Nº DE AMOSTRAS
$\geq 3; \leq 6$	27
$> 6; \leq 12$	70
$> 12; \leq 24$	71
$> 24; \leq 36$	39
> 36	38
TOTAL	245

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Figura 2 – Animais de propriedade amostrada do município de Painel.



Fonte: Luisa Lemos Vieira.

As 257 amostras de sangue foram coletadas por punção de veia jugular ou de vasos coccígeos (Figura 3), em tubos a vácuo contendo ácido etileno diamino tetra-acético -EDTA. Os tubos eram armazenados sob-refrigeração em caixas isotérmicas e transportados para o Laboratório Clínico Veterinário do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-UDESC), Lages, onde cada amostra era dividida em dois micro tubos, devidamente identificada. Um dos tubos era usado para realizar exames hematológicos e outro para realizar processamento molecular, no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores (LABHEV, CAV-UDESC). Durante as coletas, um questionário (Anexo A) era aplicado aos produtores, visando conhecer o manejo sanitário utilizado na propriedade.

Figura 3 – Coleta de sangue em vasos coccígeos, realizada em tubos à vácuo.



Fonte: Luisa Lemos Vieira.

4.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

A contagem total de células (eritrócitos e leucócitos) e dosagem de hemoglobina foi realizada em contador eletrônico (CELM CC-530®). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos, corados pela técnica de Romanowsky e visualizados pela análise citológica em microscopia óptica.

Proteína plasmática total foi mensurada por meio de refratômetro e expresso em g/dL. Além disso, foram determinados volume globular (VG) e volume globular médio (VGM). Os valores de

referência foram baseados em dados citados por Jain (1993), que estão representados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Eritrograma com valores de referência para bovinos

Espécie	Eritrócitos (X 10⁶/μL)	Hb (g/dL)	VG (%)	VGM (fl)	CHCM (%)
Bovino	5,0-10,0	8-15	24-46	40-60	30-36

Fonte: JAIN (1993)

Tabela 4 – Leucograma com valores de referência

Espécie	Valores absolutos (/μL)					
	Leucócito (x10³/μL)	Bastonetes	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
Bovino	4 – 12	0-120	600-4000	2500-7500	25-840	0-2400

Fonte: JAIN (1993)

4.3 AQUISIÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS

Cepa pura de *A. marginale* (cepa PR1, Londrina) e cepas puras de *B. bigemina* e *B. bovis* (provenientes de estoques da Dr^a Rosângela, Jaboticabal, UNESP), foram cedidas pelo professor Dr. Odilon Vidotto, da Universidade Estadual de Londrina. Com estas cepas, foi realizada a extração de DNA, pelo método fenol: clorofórmio, e os primeiros testes para aperfeiçoamento da técnica de Multiplex-PCR, técnica a ser utilizada na confirmação das amostras de campo.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA genômico total das amostras, 200µL de sangue foram suspensas em tampão de lise (Tris 10mM pH 7,4, NaCl 10mM, EDTA 25mM e SDS 1%) e Proteinase K (100ug/mL) e incubados a 42°C em banho-maria por 12 horas. Após incubação, eram realizadas três etapas para purificar o DNA, sendo na primeira etapa acrescido fenol, seguido de fenol-clorofórmio (1:1) e por último uma etapa com apenas clorofórmio. No intervalo de cada etapa de purificação, centrifugava-se a 14000g por 10 minutos e o sobrenadante era recuperado para realizar a próxima parte da purificação.

Após esta sequência do protocolo, o DNA previamente purificado era precipitado com isopropanol (60% da solução) e então lavado com etanol 70%. O álcool era evaporado em Concentrador Plus (Eppendorf), a 45°C por 10 minutos e o DNA resultante eluído em 50µL de água ultra pura livre de DNase. Após extração, o DNA era mensurado através de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific) e diluído para manter-se uma concentração mínima de 20 ng/µL.

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE-MUTIPLEX (MULTIPLEX-PCR)

Para amplificação do DNA genômico extraído das amostras de sangue e controles positivos, foram realizadas a Multiplex-PCR em micro tubos de 0,2mL, ao qual era adicionado um volume final de 25 µL de solução, contendo 1U de enzima Taq Polimerase GoTaq® Hot Start Polymerase, (Promega); 8,5 pmoles de cada par de *primer* (Tabela 5); 0,2mM de nucleotídeos (dNTPs); 3,25mM de cloreto de magnésio; 5µL de tampão 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 3µL de DNA (concentração entre 20 e 100ng/µL) e água ultra pura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes.

Um controle negativo foi utilizado para garantir a qualidade e especificidade da técnica, abordando os mesmos parâmetros citados anteriormente, substituindo apenas o uso de DNA genômico por água ultra pura, livre de DNase.

Tabela 5 – Sequência dos *primers* de *Anaplasma marginale*, de *Babesia bovis* e de *Babesia bigemina*, utilizados na reação de Multiplex-PCR, apresentando a sequência dos nucleotídeos, o tamanho do *amplicon* esperado e autor que descreveu o *primer*.

ALVO DO AMPLICON	SEQUÊNCIA E NOME DO PRIMER	TAMANHO AMPLICON	AUTOR
<i>Babesia bovis</i>	BoF 5' CAC GAG GAA GGA ACT ACC 3' BoR 5' CCA AGG AGC TTC AAC GTA 3'	356pb	SUAREZ (1991)
<i>Babesia bigemina</i>	BiIA 5' CAT CTA ATT TCT CTC CAT 3' BiIB 5' CCT CGG CTT CAA CTC TGA 3'	278pb	FIGUEROA (1992)
<i>Anaplasma marginale</i>	1773F 5' TGT GCT TAT GGC AGA CAT TTC C 3' 2957R 5' AAA CCT TGT AGC CCC AAC TTA TCC 3'	1000pb	LEW (2002)

Fonte: Luisa Lemos Vieira

As condições de temperatura aplicadas no termociclador (Biocycler) envolveram a desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 73°C por 1 minuto, e ainda uma extensão final a 73°C por 7 minutos.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 0,8%. A cada produto foi adicionado 1µL de corante Gel Red™ (Biotium) e 1µL de tampão de amostra (azul de bromofenol e glicerol). Na primeira lacuna do gel foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb (Ludwig) como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da

fonte elétrica eram de 90 Volts por 01h30min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta.

4.6 ESTATÍSTICA

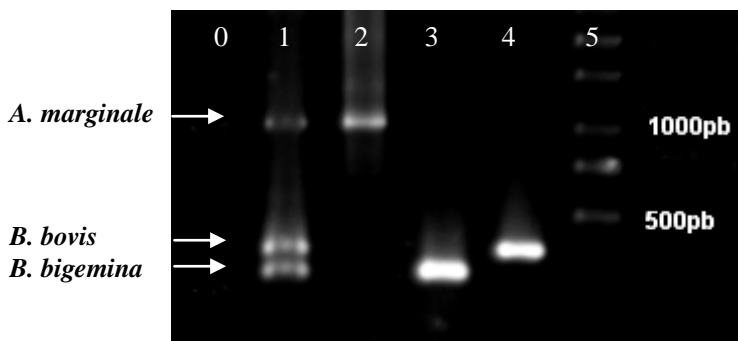
O modelo estatístico foi composto por análise de regressão logística, modelo linear generalizado, com distribuição binomial, utilizando procedimento GENMOD do pacote estatístico SAS, para as variáveis idade dos animais, estação do ano em que as amostras foram coletadas as amostras e altitude dos municípios que compuseram a amostra. Além disso, análise de variância, pelo procedimento MIXED, foi aplicada às variáveis hematológicas. Aos demais componentes da entrevista não foram aplicados testes estatísticos, apenas a análise exploratória dos dados foi realizada.

5 RESULTADOS

5.1 FREQUÊNCIA DE INFECÇÃO POR *ANAPLASMA MARGINALE*, *BABESIA BOVIS* E *BABESIA BIGEMINA* E SUAS INTERPRETAÇÕES

O resultado da PCR individual e Multiplex-PCR para os controles positivos, foi obtido com sucesso, amplificando um seguimento de 278pb, outro de 356pb e um de 1000pb, referentes a amplicons de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, respectivamente (Figura 4). A partir da técnica utilizada para realização da Multiplex-PCR dos controles positivos, prosseguiram-se as realizações da técnica com as amostras de campo.

Figura 4 – Multiplex-PCR de controles positivos de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, em imagem registrada por sistema documentador, em gel de agarose 0,8%.



Fonte: Luisa Lemos Vieira

Legenda: (0) Controle negativo da Multiplex-PCR; (1) Controle positivo de Multiplex-PCR (*Anaplasma marginale* 1000pb, *Babesia bovis* 356pb, *Babesia bigemina* 278pb); (2) PCR individual de *Anaplasma marginale*; (3) PCR individual de *Babesia bigemina*; (4) PCR individual de *Babesia bovis*; (5) marcador de 1kb.

Em 257 amostras de sangue de bovinos, analisadas pela técnica de Multiplex-PCR, 27,24% (70) foram positivas para *A. marginale*, 29,57% (76) para *B. bovis* e 16,73% (43) para *B. bigemina*, na avaliação geral dos resultados. Já as mesmas amostras demonstradas em infecções individuais representam 36,28% do total de infecções, contra 17,5% de amostras de sangue infectado por dois ou três agentes (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de amostras positivas à Multiplex-PCR para *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e frequência para infecções isoladas e infecções concomitantes.

Agentes	n	%
<i>Anaplasma marginale</i>	42	16,34
<i>Babesia bovis</i>	37	14,39
<i>Babesia bigemina</i>	14	5,55
<i>Anaplasma marginale</i> e <i>Babesia bovis</i>	16	6,22
<i>Anaplasma marginale</i> e <i>Babesia bigemina</i>	6	2,33
<i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i>	6	2,33
<i>Babesia bovis</i> e <i>Babesia bigemina</i>	17	6,61

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Análise estatística dos dados obtidos por entrevista e de dados geográficos e climáticos dos locais de coleta, foi realizada com base em três variáveis: idade dos animais, altitude das propriedades onde foram coletadas as amostras e estação do ano em que a coleta foi realizada. Apenas 245 amostras foram submetidas à análise estatística pois doze animais estavam sem identificação ou sem registro no órgão fiscalizador estadual responsável, impossibilitando identificação exata de idade.

Houve diferença significativa nos grupos de idade em relação a *A. marginale* ($p < 0,05$), onde menor tendência à infecção na idade entre 24 e 36 meses foi demonstrada (Tabela 7). Entretanto, a variável idade não apresentou diferença significativa referente à *B. bigemina* e *B. bovis*. A taxa de infecção em bovinos em todas as idades foi inferior a 75%, indicando animais em área de instabilidade enzoótica.

Tabela 7 – Frequência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em cada classe de idade, sendo “n” o número total de animais por classe de idade e “%” o frequência de positivos em todas as amostras analisadas.

Idade (meses)	Total de bovinos	<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia bigemina</i>
	N	%	%	%
≥3 ≤6	27	33,33 a	29,63	14,81
> 6 ≤12	70	28,57 a	30,00	18,57
> 12 ≤24	71	26,76 a	35,21	19,72
> 24 ≤36	39	7,69 b	20,51	12,82
> 36	38	31,58 a	28,95	10,53
<i>p</i>	-	0,0378	0,6082	0,6838

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Legenda: as letras minúsculas representam existência de diferença comprovada estatisticamente.

A variável estação do ano está representada na Tabela 8, onde observa-se diferença estatística relacionada à presença de *B. bigemina*, em que apenas 3,13% dos animais estavam infectados pelo agente no inverno, contrastando com prevalências superiores à 15% na primavera, verão e outono. Já *B. bovis* e *A. marginale* não apresentaram diferenças referente a estação.

Tabela 8 – Frequência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em relação a variável estação do ano, onde “n” representa número de animais coletados em cada estação do ano, e “%” representa a frequência de animais positivos à m-PCR

Parâmetros	Animais coletados	<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia bigemina</i>
	N	%	%	%
Verão	90	23,33	23,33	15,56 a
Outono	107	24,30	33,64	20,56 a
Inverno	32	28,13	28,13	3,13 b
Primavera	28	50,00	35,71	21,43 a
<i>p</i>	-	0,0793	0,0920	0,0404

Fonte: Luisa Lemos Vieira

A variável altitude média das propriedades apresentou diferença significativa para *B. bovis*, onde o maior percentual de animais positivos encontravam-se nas propriedades localizadas a altitudes entre 901 e 1199 metros (Tabela 9). Para *A. marginale* e *B. bigemina*, não houve diferença significativa, mas observa-se maior frequência dos agentes em altitudes entre 901 e 1199 metros.

Tabela 9 – Frequência de infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em relação a variável altitude das propriedades onde foram coletadas as amostras.

Parâmetros	Animais coletados	<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia bigemina</i>
Altitude (metros)	N	%	%	%
1200 a 1400	48	31,25	22,92 b	14,58
901 a 1199	92	31,52	45,65 a	23,91
800 a 900	117	22,22	19,66 b	11,97
<i>p</i>	-	0,0793	<0,0001	0,1143

Fonte: Luisa Lemos Vieira

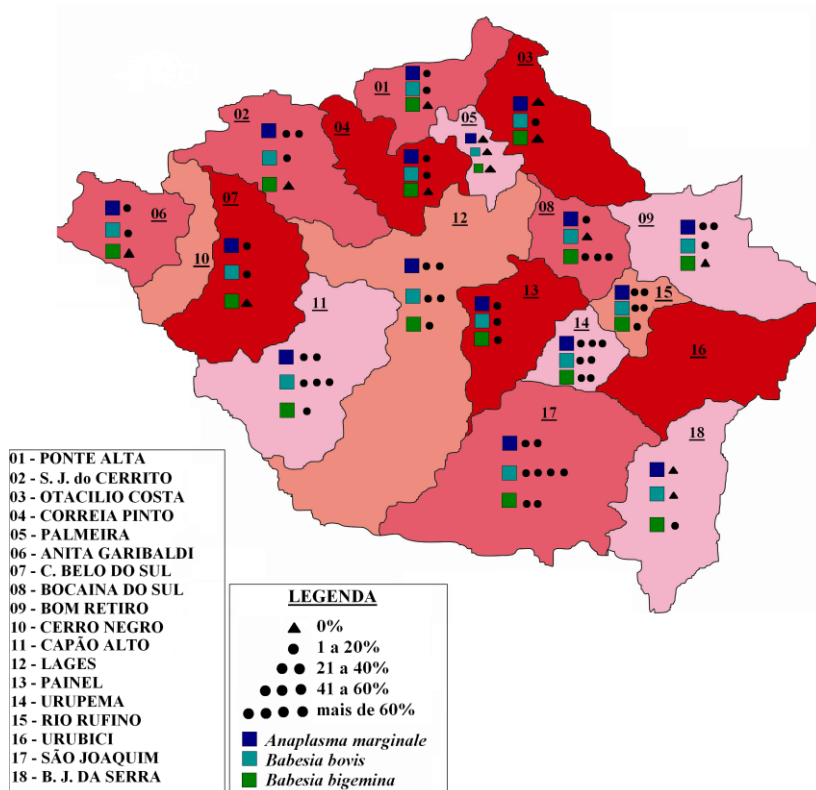
A prevalência dos microrganismos em cada município é apresentada na Tabela 10, onde pode ser observada uma distribuição bastante variável dos agentes nos municípios, ora havendo a presença dos três agentes em altos percentuais, como ocorre em São Joaquim, Lages, Paineira e Urupema, ora ocorrendo a ausência dos três hemoparasitas, como em Palmeira. A distribuição dos microrganismos em cada município está ilustrada na figura 6.

Tabela 10 – Prevalência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em cada município, onde (n) é o número de animais coletados no município e (%) é o percentual de positivos para cada município.

Município		AM	BO	BI
	N	%	%	%
Anita Garibaldi	10	10	10	0
Bocaina do Sul	4	10	0	50
Bom Jardim S.	16	0	0	6,25
Bom Retiro	10	40	10	0
Campo Belo	11	18	18	0
Capão Alto	11	27,3	54,5	9,1
Correia Pinto	13	7,7	7,7	0
Lages	37	43,2	32,4	18,9
Otacílio Costa	6	0	16,6	0
Paineira	23	17,4	13	17,4
Palmeira	4	0	0	0
Ponte Alta	10	20	20	30
Rio Rufino	10	20	40	10
São J. do Cerrito	15	33,3	13,3	0
São Joaquim	47	32	62	34
Urupema	30	46,6	40	26,6

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Figura 5 – Distribuição de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em cada município da região serrana de Santa Catarina, representados por pontuação de zero (▲) a mais de 60% (●●●●) de prevalência.



Fonte: Luisa Lemos Vieira

5.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Foram analisadas 187 amostras sanguíneas de um total de 257, número que foi reduzido devido às condições inapropriadas para análise hematológica de algumas amostras. Três condições distintas foram estudadas através da análise de variância, sendo a primeira a relação entre hemograma e idade, a segunda o hemograma e a condição em ser positivo ou negativo a algum dos três microrganismos responsáveis por causar a TPB, e a terceira condição avaliou a associação entre hemograma, condição em ser negativo ou positivo e as idades.

A análise de variância, aplicada à hemograma, revelou associação ($p < 0,05$) apenas para valores de VGM e neutrófilos. A média de VGM foi maior em animais com idade superior a 36 meses, porém não diferiu entre positivos e negativos da mesma faixa etária. Em contrapartida, na classe de idade >24 e ≤ 36 meses, a média do VGM em animais positivos foi inferior a média em animais negativos. Nas classes de idade inferior a 24 meses, não houve diferença em relação à condição de infecção, apenas em relação às idades, tendendo a apresentarem VGM inferiores aos animais com idade igual ou superior a 24 meses (Tabela 11).

Houve associação em relação à média de neutrófilos, sendo a maior média apresentada em animais negativos da classe de idade >12 e ≤ 24 meses, diferenciada de animais positivos da mesma classe de idade, e das classes $>6 \leq 12$ e da classe >36 meses (Tabela 12). Com exceção da classe >12 e ≤ 24 meses, os animais positivos à infecção por *Babesia* spp. ou *Anaplasma* sp. apresentaram médias superiores aos negativos para neutrófilos e eosinófilos. Leucocitose foi observada na média de todas as classes de idade, tanto para animais positivos quanto para negativos, com exceção da média dos animais positivos das classes $>12 \leq 24$ e $>24 \leq 36$ meses.

Tabela 11 – Resultados do hemograma para os grupos de idade e condição de infecção, apresentando contagem total de eritrócitos, volume globular (VG), concentração de hemoglobina (Hb), volume globular médio (VGM) e concentração média de hemoglobina (CHCM).

Parâmetro	Idade	$\geq 3 \leq 6$	$> 6 \leq 12$	$> 12 \leq 24$
	Condição	$\bar{x} \pm EP$		
Eritrócitos	Negativo	8,07 \pm 0,35	8,21 \pm 0,25	7,71 \pm 0,27
	Positivo	7,86 \pm 0,36	8,21 \pm 0,23	7,64 \pm 0,26
VG	Negativo	35,3 \pm 1,42	35,6 \pm 1,04	35,7 \pm 1,12
	Positivo	36,5 \pm 1,48	35,3 \pm 0,93	35,4 \pm 1,09
Hb	Negativo	11,3 \pm 0,46	11,6 \pm 0,34	11,7 \pm 0,36
	Positivo	12,0 \pm 0,48	11,4 \pm 0,30	12,2 \pm 0,35
VGM	Negativo	44,03 \pm 1,14 bcd	43,58 \pm 0,84 cd	46,59 \pm 0,89 b
	Positivo	46,67 \pm 1,18 b	43,41 \pm 0,85 d	45,93 \pm 0,89 bc
CHCM	Negativo	32,27 \pm 0,56	32,82 \pm 0,41	33,0 \pm 0,44
	Positivo	32,92 \pm 0,59	32,59 \pm 0,37	34,62 \pm 0,43

Parâmetro	Idade	$> 24 \leq 36$	> 36	<i>p</i>
	Condição	$\bar{x} \pm EP$		
Eritrócitos	Negativo	6,80 \pm 0,28	6,62 \pm 0,36	0,7190
	Positivo	7,46 \pm 0,39	6,46 \pm 0,26	
VG	Negativo	34,6 \pm 1,15	34,1 \pm 1,48	0,9254
	Positivo	34,8 \pm 1,62	32,7 \pm 1,07	
Hb	Negativo	11,1 \pm 0,37	11,1 \pm 0,48	0,6695
	Positivo	11,3 \pm 0,53	10,8 \pm 0,35	
VGM	Negativo	51,22 \pm 0,92 a	51,97 \pm 1,18 a	0,0507
	Positivo	46,83 \pm 1,30 b	51,25 \pm 0,87 a	
CHCM	Negativo	32,23 \pm 0,45	32,73 \pm 0,59	0,2906
	Positivo	32,66 \pm 0,64	33,04 \pm 0,42	

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Tabela 12 – Resultados do leucograma para os grupos de idade e condição de infecção, apresentando contagem total de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos) e plaquetas.

Parâmetros	Idade	$\geq 3 \leq 6$	$> 6 \leq 12$	$> 12 \leq 24$
	Condição	x \pm EP		
Leucócitos	Negativo	14669 \pm 1491	15050 \pm 1097	15031 \pm 1173
	Positivo	13529 \pm 1552	14165 \pm 981	10266 \pm 1146
Neutrófilo (/ μ L)	Negativo	2892 \pm 449 b	2911 \pm 345 b	4098 \pm 353 a
	Positivo	3073 \pm 468 ab	2964 \pm 306 b	2441 \pm 345 b
Linfócitos (/ μ L)	Negativo	10675 \pm 1050	10256 \pm 772	9439 \pm 826
	Positivo	9584 \pm 1093	9958 \pm 703	6786 \pm 807
Eosinófilos (/ μ L)	Negativo	2892 \pm 491	3208 \pm 369	4098 \pm 387
	Positivo	3073 \pm 511	3215 \pm 329	2441 \pm 378
Monócito (/ μ L)	Negativo	558 \pm 106	435 \pm 81	529 \pm 83
	Positivo	577 \pm 110	535 \pm 71	566 \pm 81
Plaquetas	Negativo	358 \pm 44	409 \pm 32	362 \pm 35
	Positivo	446 \pm 46	427 \pm 29	464 \pm 34

Parâmetros	Idade	$> 24 \leq 36$	> 36	<i>p</i>
	Condição	x \pm EP		
Leucócitos	Negativo	12638 \pm 1202	13425 \pm 1552	0,4006
	Positivo	11945 \pm 170	12064 \pm 1121	
Neutrófilo (/ μ L)	Negativo	2830 \pm 362 b	2980 \pm 468 ab	0,0400
	Positivo	3153 \pm 512 ab	3132 \pm 338 b	
Linfócitos (/ μ L)	Negativo	8280 \pm 846	8358 \pm 1093	0,6645
	Positivo	7439 \pm 1197	7150 \pm 789	
Eosinófilos (/ μ L)	Negativo	2830 \pm 396	2980 \pm 511	0,0806
	Positivo	3153 \pm 560	3132 \pm 369	
Monócito (/ μ L)	Negativo	481 \pm 85	684 \pm 110	0,7727
	Positivo	450 \pm 121	558 \pm 80	
Plaquetas	Negativo	372 \pm 36	484 \pm 46	0,2493
	Positivo	369 \pm 50	429 \pm 34	

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Apenas seis animais apresentavam níveis inferiores ao limite para contagem total de eritrócitos, apesar de o volume globular estar dentro dos limites esperados (Tabela 13). Destas seis, três eram negativas a M-PCR e três eram positivas.

Tabela 13 – Contagem total de eritrócitos, volume globular (VG) e resultado da Multiplex-PCR para animais que apresentaram alterações fora dos padrões estabelecidos na contagem total de eritrócitos.

Identificação amostra	Eritrócitos (X 10⁶/μL)	VG (%)	MULTIPLEX-PCR
183	4,71	27	<i>Babesia bovis</i>
184	4,75	26	Negativo
185	4,95	26	<i>Babesia bovis</i>
249	4,83	26	Negativo
264	4,99	24	Negativo
267	4,45	24	<i>Anaplasma marginale</i>

Fonte: Luisa Lemos Vieira

O resultado do hemograma em relação às classes de idade, independente de apresentar animais positivos ou negativos, revelou associação de idade ($p < 0,05$) à contagem total de eritrócitos, ao VGM, ao CHCM, aos linfócitos e basófilos (Tabela 14). Animais mais jovens, entre 3 e 12 meses, apresentaram média de eritrócitos e linfócitos superior a animais com mais de 12 meses de idade, ao contrário do que ocorre com VGM, onde animais jovens apresentavam menor média, demonstrando uma razão inversamente proporcional de eritrócitos e VGM, em relação a idade. A média de CHCM foi maior nas classes >12 e ≤ 24 meses e > 36 meses e a média de basófilos apresentou menor valor na classe >12 e ≤ 24 meses.

Tabela 14 – Médias de eritrócitos, volume globular médio, concentração média de hemoglobina, linfócitos e basófilos em cada classe de idade.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS/IDADE (x ± EP)			
Idade	Eritrócitos (x 10⁶/μl)	VGM (fl)	CHCM (%)
≥3 ≤ 6	7,97 ± 0,25 ab	45,35 ± 0,82 cd	32,59 ± 0,1 b
> 6 ≤12	8,21 ± 0,17 a	43,50 ± 0,56 d	32,70 ± 0,28 b
>12 ≤24	7,68 ± 0,19 bc	46,26 ± 0,63 c	33,81 ± 0,31 a
>24 ≤36	7,13 ± 0,24 cd	49,02 ± 0,79 b	32,45 ± 0,39 b
> 36	6,54 ± 0,22 d	51,61 ± 0,73 a	32,88 ± 0,36 ab
p	<.0001	<.0001	0,0331

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (x ± EP)		
Idade	Linfócitos (/μl)	Basófilos (/μl)
≥3 ≤ 6	10130 ± 754 a	47,27 ± 20,21 ab
> 6 ≤12	10107 ± 522 a	72,89 ± 13,93 a
>12 ≤24	8112 ± 577 b	12,52 ± 15,40 b
>24 ≤36	7859 ± 733 b	76,81 ± 19,55 a
> 36	7754 ± 674 b	60,27 ± 17,97 a
p	0,0066	0,0339

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Análise estatística revelou que não houve associação dos valores de Eritrócitos, VG, Hb, VGM e CHCM com a presença de *A. marginale* no sangue (Tabela 15), já para *B. bigemina* houve associação da variável Eritrócito com a presença do microrganismo, onde animais positivos apresentavam média superior aos negativos (Tabela 16). Associação com CHCM, para *B. bovis* foi observada, revelando média superior em animais positivos (Tabela 17).

Tabela 15 – Valores de média de eritrócitos, volume globular, hemoglobina, volume globular médio e concentração média de hemoglobina, para animais positivos e negativos à *Anaplasma marginale*.

<i>Anaplasma marginale</i>			
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (x ± EP)			
Condição de infecção	Eritrócitos (x 10 ⁶ /μl)	VG (%)	Hb (g/dl)
Negativo	7,60 ± 0,14	35,13 ± 0,60	11,56 ± 0,19
Positivo	7,78 ± 0,20	35,82 ± 0,83	11,68 ± 0,27
<i>p</i>	0,3978	0,4197	0,6787
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (x ± EP)			
Condição de infecção	VGM (fl)	CHCM (%)	
Negativo	46,37 ± 0,68	32,98 ± 0,23	
Positivo	46,62 ± 0,95	32,60 ± 0,33	
<i>p</i>	0,7992	0,2728	

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Tabela 16 – Valores de média de eritrócitos, volume globular, hemoglobina, volume globular médio e concentração média de hemoglobina, para animais positivos e negativos à *Babesia bovis*.

<i>Babesia bovis</i>			
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ($\bar{x} \pm EP$)			
Condição de infecção	Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	VG (%)	Hb (g/dl)
Negativo	$7,74 \pm 0,16$ a	$35,70 \pm 0,69$	$11,51 \pm 0,22$
Positivo	$7,63 \pm 0,18$ b	$35,25 \pm 0,76$	$11,73 \pm 0,25$
<i>p</i>	0,5998	0,6044	0,4275
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ($\bar{x} \pm EP$)			
Condição de infecção	VGM (fl)	CHCM (%)	
Negativo	$46,92 \pm 0,78$	$32,27 \pm 0,27$	
Positivo	$46,07 \pm 0,87$	$33,32 \pm 0,30$	
<i>p</i>	0,3898	0,0025	

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Tabela 17 – Valores de média de eritrócitos, volume globular, hemoglobina, volume globular médio e concentração média de hemoglobina, para animais positivos e negativos à *Babesia bigemina*.

<i>Babesia bigemina</i>			
Condição de infecção	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ($\bar{x} \pm EP$)		
	Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	VG (%)	Hb (g/dl)
Negativo	$7,42 \pm 0,12$	$34,87 \pm 0,51$	$11,53 \pm 0,16$
Positivo	$7,96 \pm 0,25$	$36,08 \pm 1,03$	$11,71 \pm 0,33$
<i>p</i>	0,0550	0,2846	0,6175

Condição de infecção	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ($\bar{x} \pm EP$)	
	VGM (fl)	CHCM (%)
Negativo	$47,11 \pm 0,58$	$33,11 \pm 0,20$
Positivo	$45,88 \pm 1,17$	$32,47 \pm 0,41$
<i>p</i>	0,3416	0,1544

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Trombocitose foi apresentada em seis animais e destes, três foram positivos para algum dos agentes relacionados à TPB. Um destes apresentou também leucocitose, com neutrofilia, eosinofilia, basofilia e linfocitose, mas não apresentava infecção por *Anaplasma* sp. ou *Babesia* spp. Seis animais apresentaram discreta anisocitose e policromatofilia.

A média geral do leucograma dos bovinos envolvidos no experimento ficou em 13323/mL, demonstrando um valor à cima da medida de referência para a espécie. Análise estatística das variáveis do leucograma revelou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para nenhum dos micro-organismos em relação a condição de infecção (positivo ou negativo) e os valores apresentados pela análise hematológica no leucograma. Uma diferença facilmente visualizada, nas Tabelas 18 e 19, é que naqueles animais que foram negativos para *A. marginale* e *B. bovis*, os valores de contagem total de Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos e Eosinófilos, foram superiores aos valores de animais positivos. Já para Monócitos e Plaquetas, em relação à *A. marginale*, animais positivos apresentaram média superior aos animais negativos, apesar de não demonstrar diferença estatisticamente (Tabela 18). O mesmo ocorre em relação a contagem de Plaquetas para *B. bovis* (Tabela 19). Quando trata-se da variável *B. bigemina*, os animais positivos foram os que apresentaram médias de Leucócitos, Neutrófilo, Monócito e Plaquetas superiores aos apresentados por animais negativos (Tabela 20), e Linfócitos e Eosinófilos apresentaram médias superiores em animais negativos.

Tabela 18 – Leucograma dos animais positivos e negativos para *Anaplasma marginale*, apresentando valores absolutos de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e plaquetas.

<i>Anaplasma marginale</i>			
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ($\bar{x} \pm EP$)			
Condição de infecção	Leucócitos (/mL)	Neutrófilos (μ L)	Linfócitos (μ L)
Negativo	13553 \pm 641	3226 \pm 230	8887 \pm 448
Positivo	2040 \pm 888	2952 \pm 320	7824 \pm 623
<i>p</i>	0,1000	0,4094	0,1010
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ($\bar{x} \pm EP$)			
Condição de infecção	Eosinófilos (μ L)	Monócitos(μ L)	Plaquetas
Negativo	785,31 \pm 61,48	578.98 \pm 49.17	412 \pm 18,90
Positivo	763,29 \pm 51,04	598.57 \pm 68.35	462 \pm 26,36
<i>p</i>	0,4094	0,7817	0,0700

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Tabela 19 – Leucograma dos animais positivos e negativos para *Babesia bovis*, apresentando valores absolutos de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e plaquetas.

<i>Babesia bovis</i>			
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ($\bar{x} \pm EP$)			
Condição	Leucócitos (/mL)	Neutrófilos (/μL)	Linfócitos (/μL)
Negativo	13175 ± 735	3143 ± 264	8549 ± 515
Positivo	12418 ± 813	3035 ± 291	8162 ± 568
<i>p</i>	0,4106	0,7449	0,5480
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ($\bar{x} \pm EP$)			
Condição	Eosinófilos (/μL)	Monócitos (/μL)	Plaquetas
Negativo	853,60 ± 65,15	627,66 ± 56,50	414 ± 21,68
Positivo	601,00 ± 36,32	549,89 ± 62,31	459 ± 24,21
<i>p</i>	0,7449	0,2709	0,1020

Fonte: Luisa Lemos Vieira

Tabela 20 – Leucograma dos animais positivos e negativos para *Babesia bigemina*, apresentando valores absolutos de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e plaquetas.

<i>Babesia bigemina</i>			
Condição de infecção	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ($\bar{x} \pm EP$)		
	Leucócitos(/mL)	Neutrófilos (/μL)	Linfócitos (/μL)
Negativo	12700 ± 545	3024 ± 196	8481 ± 382
Positivo	12892 ± 1100	3153 ± 394	8230 ± 769
<i>p</i>	0,8736	0,7655	0,7668

Condição de infecção	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ($\bar{x} \pm EP$)		
	Eosinófilos (/μL)	Monócitos (/μL)	Plaquetas
Negativo	789,38 ± 61,28	515,90 ± 41,91	430 ± 16,31
Positivo	716,90 ± 39,50	661,65 ± 84,28	443 ± 32,43
<i>p</i>	0,7655	0,1162	0,7177

Fonte: Luisa Lemos Vieira

5.3 QUESTIONÁRIO E DADOS DE COLETA

As propriedades onde foram coletadas as amostras tinham em média 113 animais, onde 18 destas eram destinadas a pecuária de corte e três eram de gado leiteiro. Em apenas duas destas propriedades não houve relato de casos anteriores de babesiose ou anaplasmoses.

Análise exploratória dos dados revela a situação de manejo e controle de carrapatos e da babesiose e anaplasmoses, adotados por aqueles produtores rurais abordados no experimento. Quanto ao conhecimento do produtor, em relação ao tratamento específico para anaplasmoses e babesiose, dois produtores conheciam apenas drogas utilizadas no tratamento da babesiose, um não conhecia o tratamento para nenhuma das enfermidades, e os demais proprietários conheciam e usavam medicamentos específicos para tratamento da babesiose e anaplasmoses, quando suspeitavam de casos em seu rebanho.

A percepção da presença do vetor no rebanho, por parte dos produtores rurais, variou entre os entrevistados. Foi relatado que em 7 propriedades a presença de carrapatos era nula durante todo o ano, em 3 a presença era constante, em 1 o carrapato estava presente na primavera e verão, em 9 apenas no verão e em uma no verão e no outono (Tabela 22). O uso de algum tipo de carrapaticida no rebanho ocorria em todas as propriedades, sendo que em 71% das propriedades se fazia uso exclusivo ou adicional de produtos à base de derivados do grupo das avermectinas. Percebe-se que mesmo naquelas propriedades em que foi relatada a inexistência de carrapatos no rebanho, haviam animais infectados por *A. marginale*, *B. bovis* e/ou *B. bigemina*.

Tabela 21 - Análise exploratória das variáveis: presença de carrapato em bovinos e uso de drogas para controle do carrapato, com relação à presença ou ausência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no bovinos amostrados.

Variável	Propriedades	Variável	<i>Anaplasma marginale</i>		<i>Babesia bovis</i>		<i>Babesia bigemina</i>	
Presença carrapato	N	Uso de avermectinas	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Nunca	7	Avermectina e outras bases	7	26	9	24	4	29
		Avermectinas	3	26	9	19	8	21
		Outras bases	12	8	5	15	4	16
Verão	9	Avermectina e outras bases	25	54	35	44	13	69
		Avermectinas	10	18	9	19	4	21
		Outras bases	0	16	0	16	1	15
Verão e outono	1	Avermectina e outras bases	3	16	2	17	4	15
Primavera e verão	1	Outras bases	0	6	1	5	0	6
Constante	3	Avermectina e outras bases	1	3	0	4	2	2
		Outras bases	9	14	6	17	3	20

Fonte: Luisa Lemos Vieira

6 DISCUSSÃO

Ferramentas moleculares nas investigações epidemiológicas de parasitos estão se tornando cada vez mais presentes na pesquisa. No âmbito da genética molecular, novas técnicas surgem com uma velocidade muitas vezes inalcançável. Contudo, as ferramentas básicas nessa área continuam auxiliando pesquisadores com fidelidade, como ocorre neste trabalho. O uso dessas técnicas, como a PCR, na investigação da *Babesia* spp. e *A. marginale*, tem sido promissor, não apenas por ser uma técnica específica e de alta sensibilidade (SAIKI, 1988), mas também por evidenciar a presença dos agentes naqueles animais portadores assintomáticos (ALMERIA, 2001).

Técnicas modificadas da PCR, como a M-PCR, podem ser de maior utilidade do que a técnica simples, por acelerar o processo quando trata-se de um grande número de amostras, porém a reação deve ser otimizada para seu bom funcionamento. Para que o ensaio de Multiplex-PCR ocorra com sucesso, as condições de reação e especificidade de cada conjunto de primer devem ser cuidadosamente avaliados (BILGIC et al., 2013).

Figuerola et al (1993) publicaram um dos primeiros trabalhos utilizando a Multiplex-PCR para detecção simultânea dos hemoparasitos *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* em animais portadores, resultando em uma análise sensível. Contudo, pode ainda haver a possibilidade de identificar falsos positivos (HUSEYIN, 2012). O desenvolvimento da Multiplex-PCR neste trabalho baseou-se inicialmente na técnica descrita por Figuerola et al (1993), porém *A. marginale* não apresentou *amplicon* em amostra previamente identificadas como positiva. Portanto, outros *primers* foram testados para a amplificação do controle positivo deste agente, até que o uso do conjunto de *primers* descrito por Lew (2002), baseados no gene que codifica proteínas Msp1a de *A. marginale*, isolado da Florida (ALLRED, 1990), amplificou um segmento de cerca de 1000 pares de bases, compatível ao *amplicon* esperado para a espécie. Já os *primers* BoF/R e BiIA/IB derivaram de seqüências de DNA de *B. bovis* (SUAREZ, 1991) e *B. bigemina* (FIGUEROA, 1992), respectivamente, os quais foram utilizados por Figuerola et al (1993) para realizar a Multiplex-PCR.

Com a Multiplex-PCR, foi possível determinar que a prevalência de *B. bovis* (29,57%) foi maior do que de *B. bigemina* (16,73%), resultado semelhante ao que foi demonstrado em estudo retrospectivo por Almeida et al (2006), no Rio Grande do Sul, onde foi

revelada a presença de 41% de *B. bovis*, enquanto apenas 4,9% dos casos foram de *B. bigemina*. Souza et al (2013), identificaram na região Nordeste do Brasil, prevalência de 52,5% de *B. bigemina* por sorologia e 52% por PCR, e 68,8% de *B. bovis* por sorologia e 33,2% por PCR. Contrastando com estes resultados, Souza et al (2002) relataram a prevalência de anticorpos anti-babesia em bovinos com aptidão leiteira no Planalto Norte Catarinense maior para *B. bigemina* (84,5%) do que para *B. bovis* (76,8%), assim como Dalagnol et al (1999), que realizaram pesquisa nos municípios de Lages, Bom Jardim da Serra, Mafra e Água Doce, resultando em prevalência de anticorpos variando de 84 a 100% para *B. bovis* e de 95 a 100% para *B. bigemina*. Esta variação dentro de um mesmo Estado pode ser relacionada a condições que influenciam a estabilidade do vetor na região, principalmente por variações climáticas individuais, mas também pelo controle adotado por produtores de cada estabelecimento investigado. Como a região serrana apresenta temperaturas médias muitas vezes a baixo de 15° C, isso pode dificultar o desenvolvimento do carrapato em épocas de frio intenso.

A prevalência de *A. marginale* foi de 27,24%, resultado bastante inferior ao encontrado por Souza et al (2013), no Nordeste brasileiro, que constatou por PCR a prevalência de infecção em 76,2% dos bovinos. No estado da Bahia foi encontrada prevalência de 94,8 e 97%, utilizando dois sistemas de ELISA (BARROS, 2005), no Norte do Rio de Janeiro apresentou 91,16% de soroprevalência (SOUZA, 2000a), e Yoshihara et al. (2003) encontraram 76,10% de bovinos reagentes ao ELISA por competição, em rebanhos de corte da região de Umuarama, região Noroeste do Paraná.

A baixa taxa de infecção pelos agentes da TPB, permite considerar que a região estudada caracteriza-se em área de instabilidade enzoótica para Anaplasmosse e Babesiose bovina. Esta classificação pode ser baseada em trabalhos de Smith (2000), onde se admite que áreas de instabilidade enzoótica sejam aquelas cuja taxa de infecção dos agentes da TPB seja inferior a 75% no rebanho. Também podemos consideradas áreas de instabilidade enzoótica para a TPB, quando a presença do carrapato não é constante durante o ano.

Segundo Mahoney et al (1981), para considerar uma região como de estabilidade enzoótica para a babesiose deve-se manter uma taxa de inoculação de 0,01 protozoário por dia. Essa taxa garantirá que animais até nove meses de idade sejam inoculados, permitindo situação epidemiológica de estabilidade para este agente, devido à resistência imunológica que animais até esta faixa etária podem apresentar pela

persistência de anticorpos colostrais (MAHONEY, 1973). Esta classificação será estendida à *A. marginale*, já que o principal vetor é o mesmo de *Babesia* spp. A taxa de infecção por *B. bovis* (31,25%), *B. bigemina* (12,5%) e *A. marginale* (33,3%) em animais até nove meses de idade foram menor que 75% nos bovinos, o que indica uma baixa taxa de infecção em animais jovens, aumentando os riscos de animais à cima de nove meses desenvolverem a doença, devido à queda na proteção adquirida.

Apesar do baixo percentual dos agentes em animais até nove meses, resultados demonstram uma tendência de maior infecção por *A. marginale* até os seis meses de idade. Esta tendência pode ser explicada pela possibilidade de ocorrência de infecção transplacentária na anaplasmose (RIBEIRO, 1995; KESSLER, 2001), visto que uma vez infectados por *A. marginale*, os animais tornam-se portadores assintomáticos. Animais na faixa etária de 12 a 24 meses apresentaram percentual de infecção por *Babesia* spp. maior do que nas demais faixas. Este aumento gradual de infecção em animais mais velhos pode ser explicado pelo fato da maior exposição ao carrapato ao longo da vida dos animais, além disso, Mahoney et al (1981) constataram que o parasitismo do carrapato em bezerros corresponde a apenas 25% do total de carrapatos dentro de uma propriedade. Assim como Utech et al (1978) verificaram a menor susceptibilidade de bezerros jovens em albergar carrapatos quando comparado a animais mais velhos.

Infecções concomitantes com dois ou três agentes são demonstradas em 17,5% dos animais, enquanto 35,8% são em infecções individuais. Bilgic et al (2013) demonstrou a co-infecção de *Theileria annulata* com *Anaplasma marginale* e/ou *B. bovis* em 22% das amostras de bovino, na Turquia. No Egito, Adhan et al (2009), encontraram 12% de infecção concomitante de *B. bovis* e *B. bigemina* em carrapatos da espécie *Boophilus annulatus*. Halos et al (2005) evidenciaram a possibilidade de Ixodídeos carregarem diversos patógenos simultaneamente e revelaram a co-existência de *Bartonella* sp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato e *Babesia* sp em um mesmo carrapato.

Através do questionário foi possível avaliar o nível de conhecimento e de informação dos produtores sobre a doença e foi possível realizar um boletim técnico para repassar aos produtores participantes do trabalho (Anexo B). Além dos nomes popularmente conhecidos para o complexo, como Tristeza Parasitária Bovina, mal triste, pindura, piropiasmose, amarelão ou ainda mal-da-ponta, ela também foi denominada por dois produtores da região como “Peste

Velha”, nome influenciado pelos sintomas quando os animais apresentam apatia e fraqueza.

A característica do desenvolvimento do carrapato na região é um importante fator que influencia a taxa de inoculação de *Babesia* sp e *A. marginale* nesses rebanhos. Os anos de coleta foram marcados por período de seca prolongado, da primavera ao verão em 2012, e por um inverno rigoroso, em 2013. As baixas frequências de infecção nesta região podem ter sido influenciadas pelas adversidades climáticas ocorrida nestes anos, o que prejudicaria o desenvolvimento do vetor. Em 12 propriedades, os proprietários relatam que a presença do vetor em seus rebanhos, ocorre principalmente na primavera e verão, em seis delas a presença é praticamente nula e em três a presença do carrapato é constante. Nas propriedades em que o carrapato seria ausente, segundo produtor, três delas apresentam percentual de animais positivos superior ao percentual de negativos.

A criação na maioria das propriedades abordadas se faz de modo extensivo, a campo, o que dificulta a visualização da presença de ectoparasitas nos bovinos. Muitas vezes os proprietários examinam o rebanho apenas em época de desverminação ou vacinação e acabam não realizando um exame mais aprofundado em cada animal. Este fato sugere que a percepção do produtor frente a presença do carrapato nem sempre condiz com a realidade, já que existe a infecção nos animais destes rebanhos.

O desenvolvimento dos carrapatos ocorre, não somente pela variação climática, mas principalmente pelo manejo de controle de carrapatos adotado por cada produtor. Outro fator que pode ter apresentado influência na transmissão através do vetor, foi a altitude em que se localizavam as propriedades, visto que maiores frequências de infecções foram observadas em altitudes entre 901 e 1199 metros.

A resistência do *R. microplus* a algumas drogas carrapaticidas vem sendo confirmada por diversos pesquisadores em diferentes regiões (LEITE, 1995; CAMPOS Junior, 2005; CAMILLO, 2009). A resistência ao amitraz, ao cymizol e ao chlorometiuron foi confirmada na Austrália por Nolan (1981). Em propriedades que não faziam uso de avermectina e optavam por drogas a base de derivados piretróides, organofosforados e/ou pirazóis, não apresentaram diferença estatística em relação à presença dos hemoparasitas, mas o percentual de animais positivos foi inferior aos negativos, o que leva a crer que o uso desses carrapaticidas pode ser eficiente no controle de carrapatos na região.

Os parâmetros hematológicos dos animais apresentaram alterações relevantes apenas em relação às médias gerais no leucograma, as quais estavam elevadas (13202/mL), contudo, este é um indicador bastante variável por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, não podendo ser associada a apenas uma variável. As demais alterações hematológicas não foram relevantes. Não foram encontrados animais infectados anêmicos através do eritrograma, fato que pode estar relacionado aos baixos índices de infecção nos bovinos, visto que a anemia se dá principalmente pelo elevado número de eritrócitos infectados. Esta situação revela que os animais do experimento apresentavam infecções sub-clínicas, sem alterações hematológicas

7 CONCLUSÃO

A região da serra catarinense pode ser considerada área de instabilidade enzoótica para a Tristeza Parasitária Bovina, pois a frequência de infecção em animais com idade até nove meses foi menor que 75%.

A infecção está ocorrendo desde bezerros até animais adultos pelo três agentes causadores da TPB, com uma tendência a ser maior em animais até 6 meses de idade em infecções por *A. marginale*.

Os agentes mais frequentes nesta região são *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*.

A infecção sub-clínica por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, não alteram parâmetros hematológicos como: volume globular médio, volume globular, concentração de hemoglobina, plaquetas e todos os parâmetros leucocitários.

8 REFERÊNCIAS

- AHMED, J. S. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. **Parasitology Research**, 88, 48–50, 2002. Supplement.
- ALLSOPP, M. T. E. P. et al. Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, 108, 147-152, 1994
- ALMERIA, S. et al. Bovine piroplasma in Minorca (Balearic Islands Spain): A comparison of PCR-based and light microscopy detection. **Veterinary Parasitology**, 99, 249-259, 2001.
- ALMEIDA, M. B. et al. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 26, 4, 237-242, 2006.
- ANTUNES, G. M. **Hemoparasitoses em bovinos de carne**. 2008. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- ARAGON, R. S. Bovine babesiosis: a review. **Veterinary Bulletin**, 46, 903-917, 1976.
- ARAÚJO, F. R. et al. Frequência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 50, 3, 243-246, 1998.
- BABES, V. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences**, 107, 692-694, 1888.
- BARCI, L. A. G. et al. Epidemiologia da babesiose bovina no Estado de São Paulo: I. Estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do município de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 3, 79-82, 1994.
- BARROS, S. L. et al. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from semi-arid

region of state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100, 6, 513-517, 2005.

BILGIC, H. B et al. Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. **Experimental Parasitology**. 133, 222–229, 2013.

BIRD, J. E. Neonatal anaplasmosis in calf. **Journal of South Africa Veterinary Association**, 44, 69-70, 1973.

BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, 129, 5, 247-269, 2004.

BRACARENSE, A. P. F. L.; VIDOTTO, O.; CRUZ, G. D. Transmissão congênita de *Babesia bovis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 53 (4), 1-3, 2001.

BRASIL, A.G. *et al.* Premunicação contra a tristeza parasitária em bovinos a campo. **A Hora Veterinária**, ano 2, n.10, p.4-8, 1982.

BRAYTON, K.A. et al. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102: 844-849, 2005.

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

BROWN, S. J.; SHAPIRO, S. Z.; ASKENASE, P. W. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. **Journal immunology**, 133, 6, 3319-3325, 1984.

BUSHELL, G. et al. *Babesia bovis* host cell recognition proteins. **International Journal Parasitology**, 21,5, 609-611, 1991.

CAMILLO, G. et al. Eficiência *in vitro* de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, 39, 2, 490-495, 2009

CAMPOS JUNIOR, D.A.; OLIVEIRA, P.R. Avaliação in vitro da eficiência de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Ciência Rural**, 35, 1386-1392, 2005.

CANEVER, M. F. et al. L. Diagnóstico Molecular de Tristeza Parasitária Bovina no Planalto Catarinense, e Desenvolvimento de Multiplex PCR para Detecção de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*. In.: **Seminário de iniciação científica universidade do estado de Santa Catarina**, 23, 2013. **Anais de evento**, Lages. 2013. Disponível em: < <http://www.udesc.br/?id=1559>>. Acesso em 15 de outubro de 2013.

CANTÚ-MARTÍNEZ, M. A. et al. Prevalence of antibodies against *Babesia bigemina* and *B. bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) in farms of northeastern Mexico. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 7, 2, 121-123, 2008.

CARELLI, G. et al. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, 124, 1-2, 107-114, 2007.

CAVALCANTE, G. G. **Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por Babesia bovis, Babesia bigemina e Anaplasma marginale em bezerros da raça Nelore no Estado de São Paulo. 2007.** 123p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Área de Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu.

CENTRO DE SOCIEDADE E PLANEJAMENTO AGRÍCOLA – CEPA. **Levantamento agropecuário de Santa Catarina.** 2003. Disponível em < <http://cepa.epagri.sc.gov.br/>> Acesso em 13 outubro de 2011.

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

CLARK, I.A., JACOBSEN, L.S.. Do babesiosis and malaria share a common disease process? **Annals of Tropical Medicine Parasitology**. 92, 483–488, 1998.

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

DALAGNOL, A. A; MARTINS, E.; MADRUGA, C. R. Prevalência de agentes da tristeza parasitária bovina em bovinos de corte na região de clima cfb – SC. **Agropecuária Catarinense**, 12. 3, 46-47, 1999.

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

DE LA FUENTE, J. et al. Vaccinations against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Anal...** 15, 143-8. 1999.

De VOS A. J.; MOLLOY, J. B.; JORJENSEN, W. K. Bovine babesiosis. In: **Office International des Epizooties. Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products**, 1, 412-422, 2000.

DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*... **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, 2145-2165, 2001.

ERIKS IS, STILLER D, PALMER GH. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **Journal Clinical Microbiology**, 31, 8, 2091-6, 1993.

EVANS, D. E. Tick infestation of livestock and tick control methods in Brazil: a situation report. **Insect science Applic.** 13, 629-643, 1992.

FARIAS, N.A. Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. V.1, cap.7, p.524-532.

FIGUEROA, J. V. et al. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **Journal Clinical Microbiology**. 30,10, 2576-82, 1992

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

FIGUEROA, J. V. et al. Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. **Annals N. Y. Academy Science**, 23, 791, 117-27, 1996.

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

GARCIA, G. R. **Identificação de antígenos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por soros de bovinos geneticamente resistentes e susceptíveis ao parasita**. 2009, 105f. Dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

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

GONZALES, J. C. O carrapato do boi: vida, resistência e controle. São Paulo: **Mestre Journal**, 101p., 1974.

GONZALES, J. C. O ecossistema do carrapato do boi. In: _____. **O controle do carrapato**. Porto Alegre: Sulina, 2 edição do autor, 1995. cap. 5, p. 35-77.

GRAU, H. E. G. **Transmissão transplacentária de *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) em bovinos do sul do Rio Grande do**

Sul. 2006, 54f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Parasitologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

GUGLIELMONE, A. A. et al. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, 57, 1-3, 109–119, 1995.

HIRSH, D. C.; BURTON, G. C.; BLENDEN, D. C. The effect of tetracycline upon establishment of *Escherichia coli* of bovine origin in the enteric tract of man. **Journal Application Bacteriology**. 37, 3, 327-333, 1974.

HITCHCOCK, L. F. Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (AcarinaL Ixodidae) Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (AcarinaL Ixodidae). **Australian Journal of Zoology** 3(3) 295 – 311, 1955.

HORN, S. C.; ARTECHE, C. C. P. Situação parasitária da Pecuária Brasileira. **Revista Hora Veterinária**, 14, 23, 12-32, 1985.

HORNOK, S. et al. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. 154, 354-359, 2008.

HUSEYIN, B. B. et al. Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovie* and *Anaplasmas marginale* in cattle. **Experimental Parasitology**, 133, 222-229, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Perfil da pecuária municipal**.2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_zip_municipios_xls.shtm. Acesso em 10 de janeiro de 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Sala de imprensa, comunicação social**. 2012. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2093>> acesso em 05 de novembro de 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores IBGE**. Contas nacionais trimestrais: Indicadores de volume e valores correntes. 2013. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Contas_Nacionais/Contas_Nacionais_Trimestrais/Fasciculo_Indicadores_IBGE/pib-vol-val_201302caderno.pdf> acesso em 05 de novembro de 2013.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. 1. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.

JAKTAR, P. R.; KREIER, J. P. Pathogenesis of anemia in *Anaplasma* infection. **The Indian Veterinary Journal**, 44, 5, 393-399, 1967.

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

JONGEJAN, F., UILENBERG, G., Ticks and control methods. **Revue Scientifique at Technique**, 13, 1201–1226, 1994.

KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na Medicina Humana e Veterinária. **SEMINA: Ciências Agrárias**. 28, 4, 709-726, 2007

KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 21, 4, 177-9, 2001.

KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R. Tristeza parasitária dos bovinos: quando vacinar é preciso. EMBRAPA, 2002. Documentos 131. Disponível em <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc131/index.html>>. Acesso em: 20 de novembro de 2013.

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

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

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

LEW, A. E. et al. A mspla polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. **Veterinary Microbiology** 86, 325-335. 2002.

LIMA FILHO, R. R. **Como e onde tem crescimento na pecuária leiteira na região sul do Brasil**. 2013. Disponível em <<http://www.scotconsultoria.com.br/imprimir/noticias/32526>> acesso em 5 novembro 2013.

LIMA, F. V. A. et al. Exames soro epidemiológicos da babesiose bovina (*Babesia bovis*) através de um teste ELISA indireto no Estado do Pará. **Revista de Ciências Agrárias** (Belém), 32, 55-64, 1999.

LONDT, J. G. H.; ARTHUR, D. R. The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrine, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). **Journal Entomological Society South Africa**, 38, 321-40, 1975.

MAHONEY, D.H. et al. The transmission of *Babesia bovis* in herds of European and Zebu x European cattle infested with the tick *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, 57, 10, 461-9, 1981

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

MAHONEY, D. F.; WRIGHT, I. G. MIRRI, G. B. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*

in calves (*Bos taurus*) after naturally acquire infection. **Annual Tropical Medicine Parasitology**, 67, 192-203, 1973.

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

MAHONEY, D.F. et al. The transmission of *Babesia bovis* in herds of European and Zebu x European cattle infested with the tick *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, 57, 10, 461-9, 1981

MASSARD, C. A.; FURLONG, J. Controle da tristeza parasitária dos bovinos . In.: FURLONG , J. **Manejo sanitário, prevenção e controle de parasitoses e mamite em rebanhos de leite**. EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco – MG, 49-59, 1994.

McCOSKER, P. J.. The global importance of babesiosis. In: **Babesiosis**. Edited by Ristic, M. and Kreier, J.P. New York: Academic Press, 1981. pp. 1-24.

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

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Exportação. 2013. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>> acesso em 13 de Dezembro de 2013.

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

MOURA, A. B. et al. Studies on the *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 infection in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) using Nested-PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 12, 1, 27-32, 2003.

NUÑES, J. L.; COBENNS, M. E. M.; MOLTEDO, H. L. “*Boophilus microplus*” La garrapata comum del Ganado Vacuno. **Buenos Aires: Hemisfério Sur**, 1982. 19p

PRUETT, J. H. Immunological control of arthropods ectoparasites – a review. **International Journal Parasitology**, 29, 25-32, 1999.

RIBEIRO, M.F.B., LIMA, J.D., GUIMARÃES, A.M. et al. Transmissão congênita da anaplasmoze bovina. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, 47, 297- 304, 1995.

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

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

RISTIC, M.; MONTENEGRO-JAMES, S. Immunization against *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. New York: CRC, 1988. 131-142.

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

RODRIGUES, A. et al. Cerebral babesiosis in cattle: 20 cases. **Ciência Rural**, Santa Maria, 35, 1, 2005.

SACCO, A. M. S.; BENAVIDES, M. V. **Curso de atualização sobre Tristeza Parasitária Bovina**. 1 ed. Bagé: CPPSul, 2002.

SANTOS JUNIOR, J. de C. B.; FURLONG, J.; DAEMON, E. Controle do carrapato *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) em sistemas de produção de leite da microrregião fisiográfica fluminense do grande Rio - Rio de Janeiro. **Revista Rural**, 30, 2, 305-311, 2000.

SANTOS, T. R. B. et al. Transmissão transovariana de *Babesia bigemina*, (SMITH & KILBORNE, 1893) por partenóginas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 7, 1, 7-10, 1998.

SMEENK, I. et al. Babesia bovis and Babesia bigemina DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, 71, 1, 21-4, 2000.

SMITH, T., KILBORNE, F.L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. **US Department of Agriculture Bur Animal Industry Bulletin**, 1, 7-269, 1893.

SMITH, R.D. et al. Babesiosis (*Babesia bovis*): Stability in unstable environments. In: HOUSE, J.A.; KOCAN, K.M.; GIBBS, E.P.J. **Tropical Veterinary diseases: control and prevention in the context of the new world order**. New York: Annals of the New York Academy of Sciences, 916, 510-520, 2000.

SOUZA, A.P. et al. Prevalência de anticorpos anti-Babesia em bovinos no planalto norte de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 1, 1, 6-10, 2002.

SOUZA, F. de A. L. et al. Babesiose e anaplasmosse em bovinos leiteiros no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33, 9, 2013.

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

SOUZA, J. C. P. et al. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 20, 1, 26-30, 2000b.

THEILER, A. Gallsickness of imported cattle and protection against the disease. **Agriculture Journal United American South Africa**, 3, 1, 1910.

TIMMS, P. et al. Failure of a recombinant *Babesia bovis* antigen to protect cattle against heterologous strain challenge. **Research Veterinary Science** 45, 267-269, 1988.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6ª edição. ROCA, São Paulo, 2002, 548p.

TRUEBLOOD, E.S., MCGUIRE, T.C., PALMER, G.H. Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal Clinical Microbiology**. 29, 7, 1542-4, 2001.

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

UTECH, K.B.W; SEIFERT, G.W; WHARTON, R.H. Breeding Australian illawarra shorthorn cattle for resistance to *Boophilus microplus*. I. Factors affecting resistance. **Australian Journal of Agriculture Research**, 29, 411-22, 1978.

VIDOTTO, O; MARANA, E. R. M. Diagnóstico de anaplasmoses bovina. **Ciência Rural**. 31, 361-368, 2001.

WAINE, G. J., McMANUS, D. P. Nucleic Acids: Vaccines of the future. *Parasitology Today*, Califórnia, 11, 3, 113-116, 1995.

WANDERA, J.G.; MUNYUA, W.K.. Severe anaplasmosis in a 4-Day-Old calf. **Bulletin of Epizootic Diseases of Africa**, 19, 219-221, 1971.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. **Parasitology Today**, 4, 7, 196-8. 1988.

WRIGHT, I.G. et al. The development of a recombinant *Babesia* vaccine. **Veterinary Parasitology**. 44, 3-13, 1992.

WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. Pathogenesis of babesiosis. In: Ristic, M. (Ed.), **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. CRC Press, Boca Raton, pp. 99-118. 1988

ZOCCAL, R. O. Brasil produziu 30 bilhões de litros de leite em 2010. **Panorama do leite**. Centro de inteligência do leite, 62, 6, 2012.

ZAUGG, J. L. et al. Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. **Journal of Wildlife Diseases**, 32, 63–66, 1996.

9 ANEXO A

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
LABORATÓRIO DE HEMOPARASITAS E VETORES – LABHEV

FORMULÁRIO

Identificação do produtor:

Endereço: _____

Número de animais na propriedade:

Há registros de caso de Tristeza Parasitária Bovina na
propriedade? () Sim () Não
Se houve registro, quando ocorreu?

Quantos casos ocorreram?

Qual o tratamento utilizado quando há casos de TPB?

Qual o tipo de produção?

Qual a ocorrência de carrapatos nos rebanhos da propriedade
(em estações definidas/ nunca/ constantemente)?

É utilizado carrapaticida? () Sim () Não
Se a resposta foi sim, quando e qual carrapaticida
utilizado? _____

OBS.: EM CASO DE COLETA DE ANIMAIS SUSPEITOS
RECOLHER DADOS DO ANIMAL

Brinco do animal doente:

Idade: _____

Recebeu tratamento anterior a coleta? () sim () não

10 ANEXO B

COMUNICAÇÃO TÉCNICA

MÉDICA VETERINÁRIA LUISA LEMOS VIEIRA

Caros pecuaristas e produtores rurais,

Venho por meio deste, comunicar os resultados obtidos no projeto intitulado PREVALÊNCIA E DINÂMICA DE INFECÇÕES POR *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* EM BOVINOS DA REGIÃO SERRANA DE SANTA CATARINA, do qual sua propriedade foi selecionada para participação.

Para melhor entendimento da importância dos microorganismos citados no título, trago uma breve introdução sobre a doença causada por estes, conhecida popularmente por Tristeza Parasitária Bovina (TPB). A transmissão da doença ocorre pelo carrapato dos bovinos e é causada por dois parasitos diferente, conhecidos como *Babesia* e *Anaplasma*. A única forma de transmissão da *Babesia* é através do contato direto de bovinos com carrapatos. Já a *Anaplasma* pode ainda ser transmitida pelo uso de instrumentos contaminados com sangue, como agulhas, instrumentos cirurgicos e ferro de marcação, além de moscas sugadoras de sangue. Portanto, propriedades livres de carrapato podem ainda apresentar sintomas da Tristeza Parasitária Bovina, devido a infecção por *Anaplasma*.

A transmissão ocorre quando um carrapato contaminado com os parasitos causadores da TPB, entra em contato com o bovino. Dessa forma, os parasitos entrarão em contato com o sangue do bovino, fato que irá produzir a multiplicação dos micorganismos, ocasionando a doença. Os animais doentes irão apresentar um quadro de anemia, depressão, febre, redução de peso e de produção. Os animais doentes acabam afastando-se do rebanho e procuram locais com água, devido à febre ocasionada no decorrer da doença.

Na região serrana o carrapato do bovino não se desenvolve durante todos os meses do ano, na maioria das propriedades, fato que gera uma situação de risco pois, quando os bovinos entram em contato com o carrapato, poderão apresentar baixa imunidade à Tristeza Parasitária Bovina, levando a apresentação de sinais clínicos.

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se perceber que a região serrana de Santa Catarina encontra-se em situação de risco, podendo ser alvo de surtos em grande quantidade de propriedades. Os

parasitos causadores da TPB foram encontrados em 57% do rebanho estudado, contra 43% de animais não infectados. Além disso, animais com idade inferior a 9 meses, apresentam taxa de infecção muito baixa, quando se prima que a infecção ocorra em até 75% do rebanho desta faixa etária, para que o rebanho esteja em baixo risco de surto da doença. Apesar de essa situação ser preocupante, todos os animais que participaram do experimento apresentaram infecções sub-clínicas, sem alterações hematológicas, ou seja, estavam todos saudáveis, o que demonstra que os animais estavam em situação de equilíbrio entre imunidade e infecção.

Medidas de prevenção podem ser adotadas, estipulando programas eficazes de controle. Uma prática recomendada é a realização da quimioprofilaxia naqueles animais que serão transportados de região livre de carrapato, para região com presença deste. O medicamento recomendado para quimioprofilaxia da TPB são os derivados de imidocarb, na dose de 1 a 2 mg/kg de peso vivo (2,5ml para cada 100 kg de peso vivo). Associada a esta prática, recomenda-se carapatear terneiros na primavera e bovinos que sairão de área livre da doença para área de risco, dessa forma os animais desenvolveram proteção contra a TPB ao mesmo tempo em que serão tratadas, evitando o risco de desenvolver a doença mais tarde.

À disposição para maiores informações e interessados no trabalho completo:

Luisa Lemos Vieira (luisa.lv14@gmail.com)

Lages, 11/02/2014