



**UNIVERSIDADE FEDERAL VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Grace Barbosa dos Santos

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA TRISTEZA PARASITÁRIA  
BOVINA EM REBANHOS DOS MUNICÍPIOS DE PETROLINA  
E OURICURI, ESTADO DE PERNAMBUCO**

Petrolina - PE  
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Grace Barbosa dos Santos

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA TRISTEZA PARASITÁRIA  
BOVINA EM REBANHOS DOS MUNICÍPIOS DE PETROLINA  
E OURICURI, ESTADO DE PERNAMBUCO**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito da obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Claudio Horta

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Coutinho Antonelli

Petrolina, PE  
2013

S237e

Santos, Grace Barbosa dos.

Estudo epidemiológico da Tristeza Parasitária Bovina em rebanhos dos municípios de Petrolina e Ouricuri, estado de Pernambuco./ Grace Barbosa dos Santos. - - Petrolina, 2013.

91f.: il.: 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Claudio Horta

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Coutinho Antonelli

#### Referências

1. Bovinos – Doença – *Babesia*. 2. Carrapato Bovino. Parasitologia Veterinária. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 636.2089

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Grace Barbosa dos Santos

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA EM  
REBANHOS DOS MUNICÍPIOS DE PETROLINA E OURICURI, ESTADO DE  
PERNAMBUCO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em  
Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

---

Prof. Dr. Mauricio Claudio Horta, UNIVASF  
Orientador

---

Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite, UFMG  
Examinador

---

Prof. Dr. Alexandre Coutinho Antonelli, UNIVASF  
Examinador

Petrolina, 28 de junho de 2013

*À minha família, especialmente a minha mãe Ana Rita,*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de todas as coisas, agradeço ao meu Deus, pelo grande amor com que sempre me amparou, pela Tua graça e misericórdia, ainda que eu não mereça;

A minha mãe Ana Rita, não existem palavras que possam expressar a minha gratidão, confiança, respeito, admiração e amor, tudo que faço é por ti;

Aos meus queridos irmãos Bruno, Laila, Meire, Juliana e Jussara por terem me proporcionado os momentos mais felizes da minha vida e contribuído para que eu me tornasse a pessoa que hoje sou, feliz e realizada, que posso olhar para trás e rir de contentação e saudades;

Ao meu pai Dias e minha irmã mais maluquinha Daiane, vocês foram uma adorável descoberta;

A minha querida vó Nevinha, obrigada por todo denço e carinho;

Ao meu marido e amigo Luís Fernando, obrigada pela paciência e incentivo sempre, meu fã número um, grande felicidade é ter você ao meu lado;

A toda minha família, meu grande tesouro e força sempre;

Aos meus melhores amigos: Sofia, Puca, Nanda, Cherry e Aquiles, os cães mais amados do mundo;

Aos meus amigos que conquistei durante toda a minha vida, que sempre estiveram ao meu lado, às vezes mesmo de longe, mas mesmo assim sei que sempre torceram por mim e que posso contar sempre;

Ao meu orientador Maurício Claudio Horta pela confiança mesmo desconfiando ao perguntar mil vezes se era realmente isso que eu queria, será que se convenceu? Por ter me concedido direcionamento na minha vida profissional, pelos conselhos e críticas construtivas mesmo quando te achava um chato, pela dedicação durante

todas as etapas do nosso trabalho, desde o rodeio com os animais no momento das coletas, não foi fácil, até os ensinamentos no laboratório. Agradeço pelo respeito, amizade e orientação, espero ter feito a minha parte como aluna e um dia poder retribuir o teu empenho;

Ao meu co-orientador Alexandre Coutinho Antonelli pela contribuição empregada neste trabalho;

A todos do “Grupo de estudos em Zoonoses do Vale do São Francisco” (NEZOON) por todo aprendizado, minhas queridas amigas Andreína, Anne e Maíra, especialmente ao grupo TPB por todo apoio nos momentos mais trabalhosos, porém divertidos, serão momentos inesquecíveis: Larissa, Eline, Dália, Thalita, Bruno, Iara, Davi, Bianca e Juliana, espero ter contribuído de alguma forma também com vocês;

Ao pessoal do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais pela grande colaboração prestada, às minhas gatas Paula Pimentel e Bruna Slivestre, e especialmente a amável Júlia Silveira pela dedicação ao meu trabalho;

Ao professor Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, um profissional de grande referência que com humildade admirável sentou ao meu lado e me ajudou no meu experimento, muito obrigada pela disponibilidade e atenção;

Ao professor Sérgio Santos de Azevedo pela grande colaboração prestada neste trabalho;

Ao professor Ricardo Augusto Dias pela contribuição prestada;

A Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária (ADAGRO) de Petrolina-PE, especialmente a senhora Maria do Carmo e Luciano Valença pela contribuição;

A todos do laboratório de Microbiologia animal da UNIVASF pelo apoio direto e indiretamente;

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), pelos ensinamentos prestados. Aos funcionários do campus de Ciências Agrárias da UNIVASF, pela assistência e em especial à minha querida amiga e secretária mais eficiente Rosângela;

Ao órgão de fomento de financiamento a pesquisa FACEPE pela concessão da bolsa e pelo financiamento deste projeto;

Aos criadores de bovinos de Petrolina e Ouricuri que colaboraram com esta pesquisa;

Agradeço especialmente aos animais, pela cumplicidade em todos os momentos a nós seres humanos, imerecidamente;

A UNIVASF, pela oportunidade de realizar mais um sonho;

Obrigada a todos que participaram direta ou indiretamente da realização deste objetivo.

*Muito obrigada!*

*“Aquele que se ajoelha perante  
Deus, não se curva diante de  
nenhuma dificuldade...”*

*Bíblia Sagrada*

**SANTOS, G.B. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA EM REBANHOS DOS MUNICÍPIOS DE PETROLINA E OURICURI, ESTADO DE PERNAMBUCO. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina. Orientador: Maurício Claudio Horta**

## **RESUMO**

As doenças parasitárias representam uma preocupação na prática veterinária em animais de produção, sendo que os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, assim como a riquetsia *Anaplasma marginale* são agentes etiológicos da Tristeza Parasitária Bovina (TPB), doença de grande impacto econômico para a bovinocultura. O objetivo deste trabalho consistiu em determinar a prevalência da TPB em bovinos de Petrolina e Ouricuri, PE, como também definir os possíveis fatores de risco para a ocorrência da doença nestes municípios. Foram colhidas amostras de sangue total para realização de exame sorológico através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e sangue periférico para pesquisa parasitológica. Foram aplicados junto aos produtores questionários sanitários envolvendo aspectos epidemiológicos objetivando identificar possíveis fatores de risco para TPB. Carrapatos foram coletados e identificados visando o diagnóstico da infecção por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* através da detecção de DNA pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). O estudo foi conduzido com 861 bovinos, sendo 468 de Petrolina e 393 de Ouricuri. A visualização de merozoítos e corpúsculos intraeritrocitários pela pesquisa parasitológica foram demonstrados em 3% (14/468) e 1% (4/393) dos bovinos para *Babesia* spp. e de *A. marginale* em 2,3% (11/468) e 1,2% (5/393) dos animais de Petrolina e Ouricuri, respectivamente. A soroprevalência de *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em Petrolina foi de 35,04% (164/468), 35,89% (168/468) e 32,26% (151/468), respectivamente, observando-se co-infecção destes patógenos em 31,62% (148/468) dos animais. Em Ouricuri, 45,54% (179/393) dos animais foram positivos para *A. marginale*, 38,6% (152/393) para *B. bigemina* e 54,9% (216/393) para *B. bovis*, sendo que 32,06% (126/393) das amostras foram reativas para *Babesia* spp. e *A. marginale*, demonstrando co-infecção também nessa região. Pela PCR, foi possível detectar infecção por *Babesia* spp. em 5,8% (8/137) das amostras de carrapatos, das quais, em 62,5% (5/8) posteriormente detectou-se infecção por *B. bovis*; e por *A. marginale* em 23%

(32/137) das amostras. A presença de carrapatos, o uso de carrapaticida, a idade, a raça, assim como o município de residência dos animais foram identificados como fatores de risco para TPB pela análise univariável e multivariável. Este estudo permitiu caracterizar os municípios estudados como de instabilidade enzoótica para esses hemoparasitos, e conseqüentemente, alertar para adoção de medidas adequadas de controle e realização de novos estudos.

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

**SANTOS, G.B. EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF TICK FEVER IN CATTLE FROM COUNTIES OF PETROLINA AND OURICURI, STATE OF PERNAMBUCO. In 2013. 91 f. Dissertation (Master of Animal Science), Federal University of São Francisco Valley, Petrolina. Supervisor: Mauricio Claudio Horta**

### **ABSTRACT**

Parasitic diseases are a constant concern in veterinary practice in farm animals, and protozoa *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, as well as rickettsia *Anaplasma marginale* are etiological agents of tick-borne disease in cattle (TBD), a disease of great economic impact on the cattle. The aim of this study was to determine the prevalence of TPB in cattle from Ouricuri and Petrolina, PE, as well as define the possible risk factors for the occurrence of the disease in these counties. Were collected blood samples for serologic testing by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) and peripheral blood for parasitological research. Were applied to the producers involving sanitary epidemiological questionnaires aiming to identify possible risk factors for BPD. Ticks were collected and identified for the diagnosis of infection by *A. marginale*, *B. bovis* and *B. bigemina* detecting DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR). The study was conducted with 861 cattle, being 468 in Petrolina city and 393 in Ouricuri city. By parasitological examination, the visualization of corpuscles and intraerythrocytic merozoites were shown in 3% (14/468) and 1% (04/393) for *Babesia* spp. of cattle. and *A. marginale* 2.3% (11/468) and 1.2% (05/393) of animals from Petrolina and Ouricuri, respectively. The seroprevalence of *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis* in Petrolina was of 35.04% (164/468), 35.89% (168/468) and 32.26% (151/468), respectively, observing co-infection of these pathogens in 31.62% (148 / 468) animals. In Ouricuri, 45.54% (179/393) of the animals were positive for *A. marginale*, 38.6% (152/393) for *B. bigemina* and 54.9% (216/393) for *B. bovis*, and 32.06% (126/393) samples were reactive for *Babesia* spp. and *A. marginale*, demonstrating coinfection also in this region. Through PCR, it was possible to detect *Babesia* spp. in 5.8% (8/137) of samples of ticks, which 62.5% (5/8) was detected later infection with *B. bovis*; and *A. marginale* in 23% (32/137) of the samples. The presence of ticks, the use of acaricide, age, race, and county of residence of the animals were identified as risk factors for TBD by univariate analysis and multivariate. This study allowed

characterization of the municipalities studied as enzootic instability for these hemoparasitic, and consequently alert for adoption of adequate control measures and new studies.

**Keywords:** *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale*; epidemiology.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Mapa do estado de Pernambuco, adaptado.....52
- FIGURA 2.** Mapas com a localização das propriedades visitadas nos municípios de Ouricuri (A) e Petrolina (B), PE.....53
- FIGURA 3.** Amplificação por PCR de DNA de *B. bovis* em amostras de carrapatos. 1 e 13: marcador de peso molecular 100 pares de base (Ludwig biotecnologia); 2: controle positivo para *B. bovis*; 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10: amostras negativas; 4: amostra positiva; 11 e 12: controles negativos.....64
- FIGURA 4.** Amplificação por PCR de DNA de *A. marginale* em amostras de carrapatos. 1 e 11: marcador de peso molecular 100 pares de base (Ludwig biotecnologia); 2: controle positivo para *A. marginale*; 3, 5, 6 e 8: amostras negativas; 4 e 7: amostras positivas; 9 e 10: controles negativos.....65
- FIGURA 5.** Propriedade com sistema de criação semi-intensivo, com coleção de água e presença de carrapatos, Petrolina, PE.....85
- FIGURA 6.** Propriedade com sistema de criação semi-intensivo, com coleção de água e presença de carrapatos, Petrolina, PE.....85
- FIGURA 7.** Propriedade com sistema de criação semi-intensivo, com coleção de água e presença de carrapatos, Petrolina, PE.....86
- FIGURA 8.** Propriedade com sistema de criação intensivo, sem a presença de carrapatos, Petrolina, PE.....86
- FIGURA 9.** Bovino da raça Holandês apresentando infestação por carrapatos (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*).....87
- FIGURA 10.** A - Trofozoíto de *B. bigemina* em eritrócito observado em esfregaço de sangue periférico de bovino naturalmente infectado. B - Corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* observados em esfregaço de sangue periférico de bovino naturalmente infectado. Panótico. Aumento: 100X.....87
- FIGURA 11.** Reação de imunofluorescência indireta. Formas de *B. bovis* (A), *B. bigemina* (B) e *A. marginale* (C) marcadas por isotiocianato de fluoresceína, demonstrando reatividade 1:40. Reação negativa de imunofluorescência indireta (D). Aumento: 20X.....88

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Sequência de iniciadores utilizados para identificação dos hemoparasitas.....57
- TABELA 2.** Número e frequência de anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em bovinos dos municípios de Petrolina e Ouricuri-PE utilizando a RIFI.....59
- TABELA 3.** Número e frequência de anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em bovinos de diferentes propriedades do município de Petrolina-PE utilizando a RIFI.....60
- TABELA 4.** Número e frequência de anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em bovinos de diferentes propriedades do município de Ouricuri-PE utilizando a RIFI.....61
- TABELA 5.** Número e frequência de anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em amostras de soro sanguíneo de bovinos de Petrolina e Ouricuri-PE, de diferentes faixas etárias, sexo e raças.....62
- TABELA 6.** Relação entre a presença de ectoparasitas e presença de área irrigada nas propriedades visitadas em Petrolina e Ouricuri-PE.....63
- TABELA 7.** Detecção da infecção por hemoparasitas em carrapatos coletados de animais de Petrolina e Ouricuri, PE através da PCR.....64
- TABELA 8.** Caracterização das propriedades de Petrolina e Ouricuri, PE, através das informações obtidas pelo questionário.....66
- TABELA 9.** Análise univariada das propriedades com a distribuição das variáveis associadas à babesiose e anaplasiose em Petrolina e Ouricuri, no período de 2011/2012.....67
- TABELA 10.** Análise univariada dos animais com a distribuição das variáveis associadas à babesiose e anaplasiose em Petrolina e Ouricuri, no período de 2011/2012.....69
- TABELA 11.** Fatores de risco para babesiose e anaplasiose em propriedades de Petrolina e Ouricuri, PE.....71
- TABELA 12.** Fatores de risco para infecção por *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* em animais de Petrolina e Ouricuri, PE.....71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleosideo trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
et al.	E colaboradores
FC	Fixação do Complemento
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
MgCL <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min.	Minuto
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
RIFI	Reação de imunofluorencência indireta
seg.	Segundo
SRD	Sem Raça Definida
Taq	Enzima termoestável recombinante da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TPB	Tristeza Parasitária Bovina

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
X	Vezes
kg	Quilograma
km	Quilômetro
km <sup>2</sup>	Quilômetro quadrado
mL	Mililitros
mm	Milímetro
N <sup>o</sup>	Número
rpm	Rotações por minuto
V	Volts
µL	Microlitro
µm	Micrometro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1 ETIOLOGIA E TAXONOMIA.....	25
2.1.1 <i>Babesia bovis</i> (Babes, 1888) e <i>B. bigemina</i> (Smith e Kilborne, 1893).....	20
2.1.2 <i>Anaplasma marginale</i> (Theiler, 1910).....	21
2.2 TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA.....	21
2.2.1 Babesiose.....	21
2.2.2 Anaplasmose.....	23
2.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	24
2.4 SINAIS CLÍNICOS.....	25
2.4.1 <i>Babesia bovis</i> .....	26
2.4.2 <i>Babesia bigemina</i> .....	27
2.4.3 <i>A. marginale</i> .....	27
2.5 PATOGENIA.....	27
2.6 PATOLOGIA.....	28
2.7 DIAGNÓSTICO.....	29
2.7.1 Exame parasitológico ou direto.....	29
2.7.2 Diagnóstico sorológico.....	30
2.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
2.7.4 Diagnóstico diferencial.....	31
2.8 CONTROLE.....	33
2.9 TRATAMENTO.....	36
2.10 REFERÊNCIAS.....	38
<b>3 ARTIGO 1. BABESIOSE E ANAPLASMOSE EM REBANHOS BOVINOS DE PETROLINA E OURICURI, ESTADO DE PERNAMBUCO.....</b>	<b>47</b>

## APÊNDICE

## 1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro está em plena evolução, com melhoria contínua dos seus índices zootécnicos, se tornando cada dia mais produtivo e eficiente. Com aproximadamente 209 milhões de bovinos, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), o Brasil tem o maior rebanho comercial do mundo. Sua produção, tanto de leite quanto de carne é uma das fontes extras de renda das propriedades rurais, principalmente em pequenas propriedades. O estado de Pernambuco possui o décimo sexto maior rebanho bovino do país, o qual é formado por aproximadamente 2,4 milhões de cabeças.

Mais da metade do estado de Pernambuco é localizado no semiárido, que se caracteriza pela escassez de chuvas. Boa parte está no Bioma Caatinga, com período chuvoso restrito a cerca de quatro meses por ano. Possui 185 municípios, dentre os quais, os municípios de Petrolina e Ouricuri, que se destacam como importantes cidades do interior do estado.

Visando melhorar o desenvolvimento da pecuária de forma sustentável e conseqüentemente obter um maior aproveitamento econômico da cadeia produtiva da bovinocultura, é indispensável minimizar os efeitos de doenças que geralmente acometem os animais de produção. Nesse contexto, a sanidade animal exerce um papel fundamental, pois a presença de enfermidades pode comprometer a lucratividade ou até mesmo inviabilizar a atividade. Algumas enfermidades parasitárias constituem-se em fatores limitantes ao desenvolvimento da atividade pecuária bovina em áreas de clima tropical, subtropical e equatorial úmido, entre as quais se destacam as hemoparasitoses. Dentre as enfermidades parasitárias que acometem os animais de produção, destaca-se a Tristeza Parasitária Bovina (TPB).

A TPB é um complexo que compreende duas enfermidades bem conhecidas: a Babesiose, causada por um dos protozoários do gênero *Babesia* (*Babesia bigemina* ou *Babesia bovis*), e a Anaplasmosose causada pela riquetsia *Anaplasma marginale* (ALMEIDA et al., 2006). Infecções mistas ou isoladas podem originar doença com sinais clínicos como febre, anemia, icterícia, hemoglobinúria e perda de apetite, com a presença do agente no sangue do animal (KESSLER & SCHENK, 1998). É responsável por causar grandes perdas econômicas, decorrentes da mortalidade

dos animais do rebanho, queda na produção de leite, diminuição do ganho de peso, além de gastos com controle e profilaxia (BARROS et al., 2005).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o principal vetor para os três agentes, tendo seu desenvolvimento favorecido por condições climáticas tropicais e subtropicais (BARCI et al., 1994). Os prejuízos determinados pelo parasitismo pelo carrapato à pecuária bovina brasileira são classificados em dois grupos principais. No primeiro grupo se enquadram os danos decorrentes da ação direta, caracterizados por espoliação sangüínea e suas consequências, como anemia, prurido, irritação, quedas no peso e na produção dos animais, predisposição à instalação de miíases e desvalorização dos couros. Em um segundo grupo são compreendidos os transtornos ocasionados pela ação indireta, constituídos, essencialmente, pela transmissão de agentes causadores de doenças, como a TPB e pelos gastos com a aquisição de medicamentos e de mão-de-obra especializada para o tratamento dos animais, além das perdas com os bovinos que vão a óbito, quando não adequadamente tratados (FURLONG et al., 2003).

O conhecimento do comportamento da doença em cada região geográfica é indispensável para o desenvolvimento e aplicação de medidas de controle que possam interromper a cadeia epidemiológica de modo a reduzir os prejuízos causados à pecuária (JONSSON et al., 2008). Dados sobre essa enfermidade e métodos de diagnóstico são escassos na região, levando grande parte dos Médicos Veterinários a diagnosticar essa doença baseados apenas nos achados clínicos, o que torna difícil um diagnóstico eficaz, uma vez que, os sinais clínicos apresentados pelos animais podem ser comuns a várias enfermidades. Dessa forma, torna-se evidente a importância do estudo epidemiológico dessa enfermidade no semiárido pernambucano, possibilitando, se necessário, a adoção de medidas profiláticas e terapêuticas adequadas.

Diante do exposto, o presente estudo objetivou verificar os aspectos epidemiológicos da babesiose e anaplasmose bovina, referente à infecção nos animais e carrapatos; como também definir os possíveis fatores de risco para a ocorrência dessas doenças em municípios localizados no semiárido pernambucano.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ETIOLOGIA E TAXONOMIA

#### 2.1.1 *Babesia bovis* (Babés, 1888) e *B. bigemina* (Smith e Kilborne, 1893)

Em 1888, na Romênia, Babés e sua equipe descreveram pela primeira vez a babesiose, quando começaram a investigar surtos de uma enfermidade caracterizada por um quadro de anemia hemolítica que acometia bovinos na Europa, a qual foi chamada na época de hemoglobinúria enzoótica bovina. Os animais enfermos apresentavam microorganismos no interior de eritrócitos, e acreditava-se tratar de uma bactéria, e a nomearam de *Haematococcus bovis* (ANGUS, 1996; BOCK et al., 2004).

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

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

O gênero *Babesia* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiorida, subordem Piroplasmorina e família Babesiidae (LEVINE, 1988; ALLSOPP et al., 1994). São parasitas intraeritrocitários, os quais possuem mais de 100 espécies, que infectam uma ampla variedade de animais domésticos, incluindo bovinos, caninos, felinos, eqüinos, suínos, ovinos, caprinos e roedores, bem como animais silvestres e ocasionalmente, o homem (BOCK et al., 2004; COOKE et al., 2005; CANTU et al., 2007; HUNFELD; HILDEBRANDT; GRAY, 2008). No Brasil, o primeiro relato dessa enfermidade data de 1901, em animais recém-importados e em fase de aclimação no Rio de Janeiro (FONSECA; BRAGA, 1924).

### 2.1.2 *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910)

Arnold Theiler, em 1910 citou pela primeira vez o gênero *Anaplasma* como agente causador de doença específica ao reconhecer “pontos marginais” em eritrócitos de bovinos doentes. Nesse mesmo ano, na África do Sul foi descrito uma nova espécie na tentativa de descrever ser um novo protozoário, denominado de *Anaplasma marginale*. Inclusões localizadas marginalmente em eritrócitos tinham sido observadas frequentemente em bovinos anêmicos (KOCAN et al., 2010). Anteriormente, por engano haviam concluído que os “pontos marginais” faziam parte do ciclo de vida da *B. bigemina*, no entanto, Theiler (1910) determinou que babesiose e anaplasmosose eram doenças distintas, que poderiam co-existir no mesmo animal, o que foi provado pela separação dos dois agentes e produção de uma “infecção pura” com *A. marginale* (FONSECA; BRAGA, 1924).

*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). *Anaplasma* sp. pode infectar ainda, humanos, caninos, bovinos, equídeos, pequenos ruminantes, além de uma variedade de ruminantes silvestres (ZAUGG et al., 1996; MELO et al., 2001).

## 2.2 TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA

### 2.2.1 Babesiose

Biologicamente, a babesiose é transmitida somente pelos carrapatos, e a transmissão mecânica pode ocorrer por meio de transfusão sanguínea. Para entender a transmissão da babesiose pelo carrapato, torna-se necessário conhecer de forma resumida, o ciclo de vida destes parasitos, nos carrapatos e nos bovinos.

O ciclo de vida da babesiose envolve estágios no hospedeiro vertebrado (bovino) e estágios no vetor invertebrado (carrapato). Após a inoculação pelo carrapato, a *Babesia* entra na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado sob a

forma de esporozoítos (forma infectante no hospedeiro definitivo) e invade os eritrócitos. O parasita multiplica-se assexuadamente por fissão binária e em seguida surgem as formas tipicamente piriformes, os merozoítos, que são as formas observáveis ao microscópio óptico e cuja morfologia é condizente com a caracterização de várias espécies de *Babesia* no que diz respeito ao tamanho, forma, agrupamento, dentre outras. Por consequência da multiplicação do parasita, ocorre lise dos eritrócitos inoculados seguida da invasão de outros eritrócitos ainda não infectados. Esse fenômeno repete-se provocando diferentes graus de anemia e outros efeitos resultantes da hemoglobina livre circulante (HOWARD et al., 2001).

Algumas formas piroplasmáticas evoluem para as formas sexuadas do parasita, os gametócitos, que são as formas infectantes para o carrapato ao realizar a hematofagia em um bovino parasitado. No intestino do carrapato os gametócitos formam macro e microgametas, os quais originam os zigotos que penetram nas células epiteliais onde iniciam a divisão, por esporogonia, dando origem aos esporozoítos (merozoítos) que invadem a hemolinfa, e iniciam ciclos de fissão múltipla nos diversos órgãos da fêmea ingurgitada, como as glândulas salivares e ovários.

Nos ovários infectam parte dos oocistos (infecção transovariana) transmitindo o parasita as suas novas formas larvares, que quando começam a se alimentar no bovino, há continuidade da multiplicação nas células epiteliais das glândulas salivares, e os esporozoítos gerados são transmitidos aos seguintes estágios de seu desenvolvimento (infecção transtadial) e inoculados através da saliva nos bovinos, daí por diante, o parasito multiplica-se por fissão binária dentro dos eritrócitos, onde se transformam em trofozoítos que por fissão binária dão origem a dois merozoítos que rompem a célula hospedeira e cada um invade outro eritrócito, originando dois novos merozoítos (KESSLER et al, 1998).

A transmissão de *B. bovis* pelo carrapato ocorre apenas pelas formas larvares, uma vez que o ciclo dessa espécie no carrapato termina no final da fase de larva (MAHONEY & MIRRE, 1979). No entanto, o ciclo de *B. bigemina* é mais prolongado, podendo esta espécie ser transmitida desde o estágio de ninfa até parte do estágio adulto (CALLOW & HOYTE, 1961). O macho adulto é o principal transmissor da doença por possuir maior mobilidade e tempo de vida mais prolongado quando

comparado com as fêmeas ou as formas larvares do carrapato (URQUHART et al., 1998).

A transmissão do bovino para o carrapato se dá na fase final do ingurgitamento. A babesiose apresenta um período de incubação que varia entre 7 a 14 dias, o que pode variar dependendo da taxa de inoculação e da sensibilidade do hospedeiro, podendo então ser mais curto ou mais extenso (KESSLER et al, 1998).

### 2.2.2 Anaplasmosose

Os carrapatos são considerados os principais transmissores da anaplasmosose, porém esta também pode ser realizada por moscas, mosquitos e outros insetos picadores, como os Tabanídeos (mutuca) e os *Stomoxys calcitrans* (mosca do estábulo). A transmissão do *Anaplasma* por insetos hematófagos se faz de forma mecânica, mediante a transferência de hemácias infectadas a um animal susceptível, sendo realizada em poucos minutos, enquanto o sangue permanece fresco no aparelho bucal do inseto (ARTECHE et.al., 1992; MARQUES, 2003).

No entanto, a transmissão biológica feita por carrapatos é pelo menos duas vezes mais eficiente que a transmissão mecânica feita pela mosca de estábulo (SCOLES et al. 2005). *A. marginale*, é uma riquetsia que se multiplica nas células do epitélio intestinal do carrapato e este pode infectar-se em qualquer estágio. A transmissão para o bovino ocorre de estágio para estágio e os carrapatos machos, por sua maior longevidade e mobilidade, são considerados mais importantes na transmissão da anaplasmosose. Após inoculação do agente nos bovinos, os corpúsculos iniciais aderem à superfície dos eritrócitos e entram por invaginação da membrana citoplasmática, com subsequente formação de um vacúolo parasitóforo, onde multiplicam-se por fissão binária originando um corpo de inclusão com 4 a 8 corpúsculos iniciais que irão invadir outros eritrócitos (KESSLER et al, 1998).

Nas regiões onde o inverno e/ou seca são mais rigorosos ocorre uma redução na população de vetores. Sendo assim, 70% dos animais nascidos no período da seca adquirem a infecção por *A. marginale* somente na época chuvosa, devido à baixa população de vetores na época de seca (MELO et. al., 2001).

*A. marginale* infecta de 10 a 90% das hemácias dos bovinos (KIESER et al., 1990). A incubação ou período pré-patente pode variar de 7 a 60 dias, com uma média de 28 dias. Após a infecção eritrocitária é detectado um aumento no número de hemácias parasitadas (KOCAN et al., 2010), essas hemácias são posteriormente fagocitadas por células do sistema reticuloendotelial, resultando em desenvolvimento de anemia e icterícia, sem que apresente hemoglobinemia ou hemoglobinúria (KOCAN et al., 2010).

### 2.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A difusão dos patógenos associados à TPB está diretamente ligada à distribuição do seu vetor biológico, que precisa de fatores ambientais favoráveis para completar seu ciclo biológico, de acordo com Madruga et al (1993) e Sacco (2002) pode apresentar-se da seguinte forma:

Áreas livres, onde o carrapato não ocorre devido a condições climáticas que impedem o desenvolvimento do parasito. No entanto, os bovinos não desenvolvem imunidade natural e a doença poderá ocorrer caso haja entrada acidental de carrapatos infectados em períodos favoráveis, ou quando os bovinos infectados forem introduzidos nessa região;

Áreas de instabilidade enzoótica, onde a ocorrência de uma estação seca ou fria impede o desenvolvimento da fase de vida livre do carrapato durante parte do ano. Assim, os bovinos passam uma época do ano sem ter contato com o parasita ou com poucos carrapatos, com isso não desenvolvem imunidade duradoura contra a doença. Nessa situação existe a possibilidade de ocorrência de um grande número de casos clínicos, geralmente de curso agudo e com alta taxa de mortalidade devido à presença de suficiente número de animais susceptíveis que não foram infectados até os 7-10 meses de idade (UILEMBERG, 1995). Uma região é considerada de instabilidade enzoótica, quando o percentual de animais sorologicamente positivos para essa enfermidade estiver entre 20% e 75% (MAHONEY e ROSS 1972; ARAÚJO et al., 1997; GUIMARÃES et al., 2011).

Áreas de estabilidade enzoótica, a presença do carrapato ocorre onde o durante todo o ano, de maneira que até os 7-10 meses de idade os bovinos são

expostos a carrapatos infectados, devido à queda de anticorpos maternos e durante o resto da vida, permanecendo imunizados. Nesses rebanhos, são raros os casos de doença clínica, não são esperados surtos e nem mortalidade de animais adultos, pois eles já são portadores. (MADRUGA et al 1993, SACCO, 2002).

O desenvolvimento de *R. (B.) microplus* é favorecido por condições climáticas tropicais e subtropicais que conferem à babesiose características de estabilidade endêmica (BARCI et al., 1994). Nestas situações o carrapato encontra condições favoráveis ao seu desenvolvimento, incidindo em todo o território com intensidade de parasitismo, variando em função das condições climáticas, do manejo de rebanhos e pastagens e da raça dos bovinos explorados (GOMES, 1998), podendo completar até cinco gerações por ano, dependendo das temperaturas médias anuais, que devem está em torno de 27°C com precipitações pluviométricas adequadas e umidade relativa de aproximadamente 70% (BARROS et al., 2006).

Nos locais onde o clima limita o desenvolvimento do carrapato vetor, são criadas situações de instabilidade endêmica, devido a transmissão irregular dos agentes, podendo ocorrer surtos de babesiose (BARCI et al., 1994). Um importante fator responsável pela formação de áreas de instabilidade enzoótica consiste no controle intensivo de carrapatos em determinadas regiões (VIEIRA et al., 2002). Tem-se observado condições de estabilidade enzoótica para anaplasmose em regiões onde o carrapato *R. (B.) microplus* não encontra condições adequadas para o seu desenvolvimento durante todo o ano, isso pode ser explicado pela influência dos dípteros hematófagos na manutenção dessa situação epidemiológica (BARROS et al., 2005).

## 2.4 SINAIS CLÍNICOS

A doença clínica está relacionada a ciclos repetidos de invasão e de multiplicação dos protozoários em eritrócitos do hospedeiro, seguidos de lise eritrocitária e invasão de outros eritrócitos. Os sinais clínicos iniciam 2 a 3 semanas após a inoculação do agente pelo carrapato. As infecções por *Babesia* spp. em bovinos caracterizam-se por febre (41°C a 41,5°C), anemia, apatia, ataxia, palidez de mucosas, icterícia, taquipnéia, prostração e inapetência, desidratação, tremores

musculares, ranger de dentes, hemoglobinemia, hemoglobinúria e em muitos casos, morte (SOUZA et al. 2000; KOCAN et al. 2004; RODRIGUES et al., 2005; DREHER et al. 2005; ALMEIDA et al., 2006; SINGH et al., 2009).

#### **2.4.1 *Babesia bovis***

*Babesia bovis* possui tropismo por capilares de órgãos centrais como meninges e cerebelo, além de órgãos viscerais como rins, baço, pulmões e coração, apresentando uma característica viscerotrópica aglutinante com bloqueio de vasos, que por essa característica não se observa uma intensa hemoglobinemia, hemoglobinúria, e a febre geralmente é menos elevada do que a ocorrida na infecção por *B. bigemina*.

Eritrócitos parasitados tendem a ser sequestrados nos capilares da substância cinzenta do encéfalo, onde se acumulam provocando anóxia em diferentes áreas e conseqüentemente provocando eventos químicos e imunológicos que induzem uma manifestação clínica distinta, podendo produzir sintomatologia neurológica, caracterizando um quadro conhecido como babesiose cerebral, que frequentemente tende a ser confundida com outras doenças do sistema nervoso central de bovinos (SEQUEIRA E AMARANTE, 2002; BARROS, 2006).

Na babesiose cerebral são observados sinais neurológicos como incoordenação motora, hiperexcitabilidade, opistótono, cegueira, tremores musculares, paralisia dos membros pélvicos, movimentos de pedalagem, andar em círculos, agressividade e coma (RODRIGUES et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006). Os casos neurológicos em geral são fatais, ocorrendo após um curso clínico agudo ou superagudo que dura alguns minutos até 24-36 horas (BARROS et al., 2006).

Infecções por este parasito geralmente promovem níveis baixos de parasitemia periférica e como os eritrócitos infectados são sequestrados pelo sistema de defesa para o endotélio capilar, os resultados consistem em reações alérgicas, danos a órgãos, edema pulmonar e disfunção cerebral. *B. bovis* é o agente mais frequentemente envolvido em casos de babesiose e responsável por causar mortalidade em mais da metade de bovinos infectados, sendo considerado o

parasito mais virulento dentre os três agentes responsáveis por causar a TPB (ZINTL et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006).

#### **2.4.2 *Babesia bigemina***

Em decorrência da intensa hemólise intravascular a infecção por *B. bigemina* é marcada por uma forte hemoglobinúria, provocando uma anemia hemolítica progressiva, necessitando de um maior período para levar o animal à morte, sendo considerada a espécie menos patogênica (FARIAS, 1995).

#### **2.4.3 *A. marginale***

Os sinais clínicos observados nos animais doentes são anemia hemolítica, icterícia, dispnéia, taquicardia, febre, fadiga, lacrimejamento, sialorreia, diarreia, micção frequente e anorexia, levando a morte do animal (VIDOTTO; MARANA, 2001; ARAÚJO et al., 2003).

Na anaplasmose os sinais clínicos agudos são mais comumente encontrados em bovinos com idade superior a um ano, sendo que os principais prejuízos estão ligados ao sistema reprodutivo, a animais de raça e a vacas com alta produção de leite. Vacas em estado avançado de prenhez e/ou lactação podem ter recaídas e desenvolver sinais de infecção aguda. Tais eventos estariam relacionados com a imunossupressão associada ao período peri-parto. As vacas em lactação apresentam diminuição na produção de leite e a febre apresentada durante a alta parasitemia pode gerar abortamentos, bem como, levar a redução da fertilidade em touros, que podem ainda desenvolver infertilidade temporária (BOCK et al., 2004; KOCAN et al., 2010).

## 2.4 PATOGENIA

A integração entre o agente da doença, o vetor e o hospedeiro determina a dinâmica da infecção (SILVA et al., 2007). A presença de citocinas e outros compostos farmacologicamente ativos têm uma função importante na resposta imune contra a *Babesia* spp. e o excesso de produção do agente infeccioso contribui para o progresso da doença causando vasodilatação, hipotensão, aumento da permeabilidade capilar, edema, colapso vascular, distúrbios de coagulação, lesão endotelial e estase circulatória (BOCK et al., 2004).

A *B. bigemina* parasita com mais frequência as hemácias da circulação periférica, enquanto a *B. bovis* é encontrada em capilares de órgãos centrais como cérebro, cerebelo, meninges, e nas vísceras como rins, baço, fígado, coração e pulmões, e apresenta um curso de três a sete dias para a forma aguda da doença (MASSARD; FREIRE, 1985). *B. bigemina* é capaz de desencadear um mecanismo que provoca danos celulares e tissulares, envolvendo inicialmente uma hemólise intravascular, de forma que os animais infectados por este agente tendem a apresentar hemoglobinúria mais cedo e de forma mais consistente, determinando anóxia e secundariamente lesões em vários órgãos, principalmente, rins e fígado (MENDONÇA et al., 2002).

## 2.6 PATOLOGIA

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

edema perirenal, devidos à nefrose hemoglobinúrica (BOCK et al., 2004; FARIAS, 2007).

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

Antoniassi et al. (2009) descreveram um surto de mortalidade de bovinos por *B. bovis* no Município de Picada Café-RS, onde após 20 dias do ingresso de 55 novilhas na propriedade, 28 morreram em cinco dias, provavelmente devido à falta de imunidade contra o parasito. Os sinais clínicos incluíram febre, incoordenação, agressividade, anemia, petéquias nas mucosas e morte após um a dois dias. Nos animais necropsiados foi possível constatar algumas das lesões descritas. Foram observadas mucosas pálidas e com petéquias, esplenomegalia acentuada, fígado aumentado com bordos arredondados e amarelado, vesícula biliar com parede edemaciada e repleta com bile grumosa. Os rins estavam vermelho-escuros e a bexiga continha urina cor de vinho tinto. No encéfalo, observou-se alteração da coloração, a qual apresentava-se róseo-cereja no córtex telencefálico, cerebelar e corpo estriado, contrastando com a substância branca. Em esfregaços teciduais do córtex encefálico, havia capilares repletos de hemácias, contendo estruturas basofílicas, solitárias ou pareadas, de aproximadamente 2µm de diâmetro, compatíveis com *B. bovis*.

## 2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da TPB deve considerar os dados epidemiológicos, sinais clínicos, lesões observadas à necropsia e principalmente exames laboratoriais. O diagnóstico clínico nos casos de suspeita de TPB torna-se de suposição uma vez que os sinais clínicos podem ser confundidos com os de outras doenças (FARIAS, 2007).

### 2.7.1 Exame parasitológico ou direto

O exame direto consiste em uma ferramenta importante para confirmação do diagnóstico clínico, sendo um dos principais métodos de diagnóstico empregado nesta situação, pois além da praticidade na realização ainda apresenta um custo reduzido (BÖSE et al., 1995). Este é realizado por meio de esfregaços sanguíneos colhidos de sangue de animais na fase aguda com parasitemia elevada, corados com corantes do tipo Giemsa, Leishman, Wright e Panótico. Para uma melhor realização do exame, deve-se preparar a lâmina a partir de sangue coletado dos capilares periféricos, como da região marginal da orelha ou ponta da cauda no caso de *B. bovis*, pois a circulação sanguínea geral possui 20 vezes menos desse parasito do que no sangue periférico (BOCK et al., 2004; KOCAN et al., 2010); para *B. bigemina* pode-se utilizar até mesmo, sangue coagulado por haver uma quantidade maior desse protozoário no sangue circulante. Entretanto quando a parasitemia se apresenta muito baixa, como é o caso das infecções subagudas, é difícil a demonstração do agente (MARTINS et al., 1996; VIDOTTO; MARANA, 2001). Em estudos epidemiológicos a aplicação dessa técnica é limitada em decorrência da baixa sensibilidade em detectar animais cronicamente infectados convertidos ao estado de portador (BÖSE et al., 1995; COSTA JUNIOR et al., 2006).

### 2.7.2 Diagnóstico sorológico

Técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos específicos são ferramentas imprescindíveis em estudos epidemiológicos da babesiose e anaplasmoze, sendo possível definir a situação epidemiológica das diferentes regiões de ocorrência dessas enfermidades baseando-se no *status* imunológico dos animais, funcionando como indicador indireto da presença do agente (MAHONEY; WRIGHT; MIRRE, 1973; BARROS et al., 2005).

Embora muitos testes sorológicos tenham sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos anti-*Babesia* spp. e anti-*A. marginale* as técnicas mais rotineiramente empregadas são: Reação de Fixação do Complemento (FC), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoadsorção Enzimática Indireta

(ELISA) (McGUIRE et al., 1991; BÖSE et al., 1995). Apesar de apresentarem elevada sensibilidade e especificidade, uma das principais limitações dos métodos sorológicos é que eles apenas indicam a exposição ao agente infeccioso, não informando sobre o curso da infecção (WAGNER et al., 1992).

A Reação de Fixação de Complemento é primariamente utilizado para detecção de anticorpos (IgM), ou seja, os animais recentemente infectados (BÖSE et al., 1995). A sensibilidade do teste diminui com o curso da infecção e sua utilização é limitada em áreas de endemia estável para *Babesia* spp e *A. marginale*. (REITER; WEILAND, 1989).

A RIFI é amplamente utilizada para diagnosticar *Babesia* spp., porém a desvantagem desta técnica é sua limitação pelo número de amostras realizadas por dia por ser extenuante ao leitor (BÖSE et al., 1995). O teste de ELISA é considerado um avanço em termos de sensibilidade, especificidade, padronização e reprodutibilidade para a detecção de anticorpos específicos na babesiose bovina (MACHADO et al., 1997), além de ser o método mais apropriado para se trabalhar com grande número de amostras devido a utilização de um leitor específico (ARAÚJO et al., 1998).

### **2.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Avanços recentes no campo da biologia molecular tornaram possível o uso de técnicas de amplificação do DNA dos agentes causais das patologias parasitárias e infecciosas que acometem os animais. Atualmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem sido bastante utilizada na investigação desses parasitas, uma vez que apresenta sensibilidade cerca de 100 vezes maior que a técnica de esfregaço sanguíneo (BÖSE et al., 1995). Esses testes baseados na PCR são feitos de maneira relativamente rápida e apresentam alta sensibilidade e especificidade tornando possível a verificação da presença de agentes patogênicos, mesmo em animais assintomáticos. A PCR tem sido muito utilizada em estudos epidemiológicos das hemoparasitoses bovina, pois apresenta a possibilidade de discriminar animais soronegativos infectados, como por exemplo, animais em fases iniciais da infecção (COSSÍO-BAYÚGAR et al., 1997) e distinguir animais soropositivos infectados de

animais vacinados (GALE et al., 1996). Essas técnicas permitem ainda a confirmação da presença e a discriminação dos parasitos quando em níveis muito baixos no sangue de animais portadores sadios, sendo fundamental para a elaboração de programas de controle da doença (ALMERIA et al., 2001).

#### 2.7.4 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da TPB compreende enfermidades que também cursam com o histórico de hemólise (HOWARD et al., 2001), dentre estas estão incluídas:

- Clostridiose por *Clostridium hemolyticum*, agente que após algum dano local no fígado, como a migração de alguns parasitos (ex: *Fasciola hepatica*) pode contaminá-lo causando um quadro clínico-patológico semelhante à TPB, devido à observação de infartos característicos no fígado durante a necropsia, além de hemólise com hemoglobinúria;
- Teileriose, causada por *Theileria* spp. É uma doença hemolítica muito semelhante à Babesiose e cuja sintomatologia pode induzir o clínico em erro. Em zonas endêmicas infecções mistas podem ser comuns;
- Leptospirose, a liberação de toxinas pela bactéria ocasiona hemólise com consequente hemoglobinúria e insuficiência hepática;
- Intoxicação por fedegoso (*Senna occidentalis*), onde a mioglobínúria é um achado clínico e patológico frequente, que pode ser confundido, em condições de campo, com hemoglobinúria. Entretanto, esta intoxicação produz lesões musculares macro e microscópicas características, não observadas na TPB;
- Intoxicação por samambaia (*Pteridium aquilinum*), pode provocar hemangiomas na bexiga os quais levam à hematúria (hematúria enzoótica). O diagnóstico diferencial pode ser realizado pelo exame de sedimentação de urina, onde na hemoglobinúria a coloração vermelha permanece, na

hematúria as hemácias vão para o fundo e a urina adquire novamente coloração normal;

- Intoxicação por plantas do gênero *Brachiaria* (*Brachiaria decumbens* e *B. radicans*), podem produzir icterícia e/ou hemoglobinúria, quase que invariavelmente associada à fotossensibilização hepatógena, a qual não ocorre na babesiose. O diagnóstico deve ser confirmado pelo histórico de pastejo contínuo dos animais em pastagens formadas exclusivamente pela planta e exclusão de outras possíveis causas de hemoglobinúria;
- Hemoglobinúria pós-parto, geralmente ocasionada pela deficiência de fósforo;
- Perturbações hepáticas ou hematológicas podem ser confundidas com casos de Anaplasmosose, devido a sinais de icterícia e anemia.

Doenças que cursam com sinais nervosos podem ser confundidos com babesiose cerebral, dentre elas estão incluídas a raiva, intoxicação por plantas, encefalopatia hepática geralmente decorrente de doença hepática severa, dentre outras (HOWARD et al., 2001). Para o diagnóstico diferencial, recomenda-se o uso de provas laboratoriais, sendo o esfregaço sanguíneo uma prova de alta praticidade e baixo custo (IICA, 1987), podendo ser realizada a campo a partir da colheita de sangue periférico do animal suspeito e exame direto de lâminas após coloração em microscópio óptico (FARIAS, 1995).

## 2.8 CONTROLE

Os métodos de controle modificam-se entre diferentes regiões geográficas, e incluem o controle de vetores, através da aplicação de acaricidas, administração profilática de quimioterápicos e vacinação (BOCK et al., 2004; KOCAN et al., 2010).

No que diz respeito ao controle de vetores, especialmente de *R. (B.) microplus*, este é realizado através da aplicação de produtos carrapaticidas, o que demanda altos investimentos e pode ainda implicar na aquisição de resistência dos carrapatos aos princípios ativos utilizados em caso de uso prolongado, e principalmente devido

ao uso indiscriminado, tornando os animais susceptíveis à infecção (GOMES, 1998). A estratégia a ser escolhida apresenta relação direta com a situação epidemiológica da região, e dessa forma pode ser realizado através da erradicação ou do controle estratégico desses vetores (GONÇALVES, 2000).

A erradicação do carrapato é maléfica quanto a imunidade para os agentes da TPB, de forma que ele deve ser controlado, mantendo infestações baixas nos animais, permitindo assim doses infectantes adequadas de *Babesia* spp. e *A. marginale* (GONÇALVES, 2000). Para Smith et al. (2000) o controle estratégico pode causar uma sensível diminuição na população de carrapatos por um longo período de tempo, acarretando uma situação de instabilidade à babesiose, e sugerem que qualquer estratégia de controle usada para os carrapatos, deve preservar ou manter a estabilidade enzoótica para a babesiose por meio da exposição natural ao vetor durante todo o ano com infestações controladas, ou, se necessário, pela implantação de programas de imunização.

A imunização natural ocorre pela inoculação dos hemoparasitos nos bovinos a campo, através do carrapato, de forma que o gado convive normalmente com o carrapato tornando os animais adultos imunes ou resistentes. Os bezerros nascem de mães imunes e, por meio do colostro, adquirem anticorpos específicos que lhes garantem uma imunidade passiva durante os primeiros meses de sua vida, além de serem, nesta fase, naturalmente mais resistentes aos hemoparasitos (SACCO, 2002b).

Em áreas endêmicas, a superinfestação por carrapatos deve ser evitada, por meio de um manejo eficaz, como por exemplo, a aplicação de banhos estratégicos (BOCK et al., 2004). Caso não seja realizado um bom controle do carrapato na propriedade, é possível que os bezerros ainda muito jovens sejam altamente parasitados, recebam uma inoculação muito grande de hemoparasitos e, mesmo sendo naturalmente mais resistentes, não tenham condições de reagir a este desafio e adoeçam, sendo necessário tratamento específico nos doentes e tratamento profilático no resto do grupo para que não adoeçam. No entanto, se há um controle muito rigoroso de carrapatos, é possível que estes bezerros passem a fase de amamentação e de maior resistência natural sem adquirir carrapatos e, conseqüentemente, sem desenvolver imunidade própria, o que significa que se tornarão adultos sensíveis, o que é altamente indesejável (SACCO, 2002b).

O controle torna-se mais difícil em áreas de instabilidade enzoótica, o conhecimento do estado imunológico do rebanho é muito importante para tomada de decisões nestas regiões (GONÇALVES, 2000). De acordo com Sacco (2002b), nessa situação, geralmente há a necessidade de utilização de alguma prática que permita o desenvolvimento da imunidade nos animais, como premunicação, vacinação ou quimioprofilaxia.

A premunicação consiste na inoculação de sangue infectado com os agentes da TPB apresentando sua virulência natural de campo, coletado de um bovino portador, nos animais a serem imunizados. São realizadas duas ou três inoculações, e o desafio é controlado por meio de larvas de carrapato. Conseqüentemente, a premunicação pode levar a um processo de infecção clínica que necessite tratamento específico, por isso é considerada uma técnica de alto risco, além de contribuir para a disseminação de qualquer outra infecção presente no bovino doador, e por este motivo é fundamental o monitoramento sorológico periódico dos doadores (SACCO, 2002b).

Nas áreas livres deve-se evitar a entrada de vetores, uma vez que podem provocar surtos, bem como os animais destas áreas, devem ser protegidos antes de serem transportados para regiões endêmicas (VANZINI; RAMIREZ, 1995).

Em se tratando da anaplasmosose, o controle de carrapatos, protege apenas parcialmente o animal, em decorrência da transmissão mecânica, por isso, deve-se manter o controle de moscas na propriedade, principalmente nas estações chuvosas, quando a população de dípteros hematófagos é maior, como também deve-se adotar medidas de higienização de instrumentos cirúrgicos, controlando assim a ocorrência de infecção por *A. marginale*, (GONÇALVES, 2000).

A quimioprofilaxia fundamenta-se na utilização de produtos específicos contra os agentes causadores da doença que busca-se controlar. Para TPB utiliza-se o dipropionato de imidocarb, e para anaplasmosose faz-se uso das tetraciclinas (KOCAN et al., 2010). O dipropionato de imidocarb deve ser utilizado na dose recomendada pelo fabricante como quimioprofilático, e os animais devem ser em seguida expostos à infestação pelo carrapato, constantemente, por pelo menos 30 dias. Posteriormente a aplicação da droga, o princípio ativo atinge altas concentrações sanguíneas, o que protege os bovinos dos hemoparasitos que estão sendo inoculados. O nível sanguíneo da droga começa a cair gradualmente, o que permite

um aumento também gradual de sobrevivência dos hemoparasitos nos bovinos, levando ao desenvolvimento da resposta imune sem provocar a doença clínica nos animais que estão sendo desafiados, estabelecendo a estes o estado de portador (GONÇALVES, 2000; SACCO, 2002b).

Diversos métodos de vacinação têm sido desenvolvidos e estudados como medidas imunoproláticas contra a babesiose e anaplasnose bovina. Comumente utiliza-se como vacina para babesiose sangue infectado de animais geralmente esplenectomizados, contendo formas vivas atenuadas ou inativadas e com o aparecimento da tecnologia do DNA recombinante também surgiram vacinas recombinantes (GUGLIELMONE, 1995).

No caso da anaplasnose, atualmente existem três tipos de vacinas, a vacina atenuada, a vacina viva e a vacina que utiliza *A. centrale*. A vacina atenuada utiliza amostra de *A. marginale*, a qual é submetida à indução de mutação, pela exposição à radiação e seleção após duas passagens seriadas em cervídeos e ovelhas. Após aplicação, os animais desenvolvem resposta imunológica humoral e celular, sendo a proteção fornecida por essa vacina pouco confiável (KOCAN et al., 2003). A vacina viva envolve a infecção de bovinos via inoculação com eritrócitos parasitados com um isolado menos patogênico de *A. marginale* ou *A. centrale*, porém, apresenta custo elevado e pouca praticidade ao se tratar de um grande número de animais (KOCAN et al. 2000; KOCAN et al. 2003). Já a vacina utilizando a espécie *A. centrale*, apresenta uma menor patogenicidade, promovendo uma infecção branda no animal e induzindo uma imunidade parcial pelo *A. marginale*, amenizando a severidade da infecção (KESSLER et al., 1991).

## 2.9 TRATAMENTO

Existem várias formas de tratamento dos animais infectados por agentes da TPB, em que as chances de recuperação são ao redor de 100%, desde que estes animais sejam tratados logo no início da doença, após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos. Em caso de babesiose, o uso dos derivados do Imidocab, como o Imizol e o Diminazeno, são alternativas quimioterápicas disponíveis para o controle da enfermidade. Existem vários produtos comerciais que possuem o diminazeno em

sua formulação, e o Diaceturato de Diminazeno<sup>1</sup> tem sido historicamente o medicamento mais empregado no controle dessa enfermidade. Além disso, o acréscimo de um antitérmico e vitamina B12 na composição tradicional<sup>2</sup> proporciona uma melhora rápida no quadro (FURLONG et al., 2005).

Nos casos de anaplasmosose, medicamentos à base de Tetraciclina<sup>3</sup>, constituem-se nas drogas de escolha preferencial, e as tetraciclinas de liberação lenta<sup>4</sup>, em vista de dispensarem a repetição diária de tratamentos até a recuperação plena dos animais, tem sido utilizadas mais comumente. Muitas vezes, em casos de dúvida, preconiza-se a administração de um babesicida juntamente com um anaplasmicida, sendo uma prática bastante comum. Estão disponíveis no mercado formulações<sup>5</sup> que contêm os princípios ativos de ambas as drogas (FURLONG et al., 2005).

O Dipropionato de imidocarb é a substância mais utilizada atualmente para tratamento das infestações simultâneas por *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. não só em bovinos como também em outras espécies animais. É empregado no tratamento de casos agudos, mas também é indicado como método profilático. No entanto, deve-se atentar que o dipropionato de imidocarb não é uma vacina, portanto quando usado na quimioprofilaxia, o estabelecimento de imunidade dependerá da exposição ao agente causador da doença. As dosagens aconselhadas para bovinos são 1mL/100kg pela via subcutânea nos casos de infecção simples por *Babesia* ou 1mL/40kg também pela via subcutânea em infecções mistas (MSD SAÚDE ANIMAL, 2012a).

Visando acelerar a condição orgânica do animal, recomenda-se a aplicação de um hepatoprotetor e estimulante hepático, devido à sobrecarga hepática, causada pelo excesso de hemoglobina a ser metabolizada, visando aumentar a recuperação hepática e, conseqüentemente, a restauração das hemácias. Não se recomenda o uso de substâncias à base de ferro como terapia suplementar na TPB, pois a anemia

---

<sup>1</sup> Ganaseg® 7% (1mL/20kg, via intramuscular)

<sup>2</sup> Ganaseg Plus® (1mL/10kg, via intramuscular)

<sup>3</sup> Talcin® (1g/100kg, via intramuscular ou endovenosa)

<sup>4</sup> Oxivet LA® (1mL/10kg, via intramuscular)

<sup>5</sup> Ganatet®/Revetet®

presente nesta doença não é do tipo ferropriva, o que invalida a presença deste microelemento mineral no tratamento desta doença (MSD SAÚDE ANIMAL, 2012b).

Em casos mais graves é necessário realizar a transfusão de sangue em animais acometidos, todavia, o animal doador de sangue, mesmo aparentemente saudável, pode ter sido contaminado pelo parasita causador da doença, o que fará com que o receptor desta transfusão tenha seu quadro clínico agravado. Lopes et al. (2011) conseguiram resultados com esta forma de transfusão ao realizar o tratamento do sangue parasitado por *A. marginale* com riboflavina associada à radiação ultravioleta, verificando redução da carga parasitária no esfregaço sanguíneo corado, ausência de sinais clínicos da enfermidade nos bezerros tratados, diagnóstico negativo por meio da RIFI e detecção do DNA do parasita em níveis muito baixos no sangue por meio da PCR quantitativa.

Em síntese, o sucesso do tratamento depende de se realizar um diagnóstico precoce, eliminar o agente, manter o animal sob condições favoráveis, com mínimo de movimentação, sombra, água e alimentos de boa qualidade à disposição.

## REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v.59, p.115-129, 1961.
- ARTECHE, C.C.P. Imunoprofilaxia Parasitária Bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas de *Babesia* spp. e cepa heteróloga de *Anaplasma*. **A Hora Veterinária**, v.11, p.39-42, 1992.
- ALLSOPP, M. T., CAVALIER-SMITH, T., DE WAAL, D.T., ALLSOPP, B.A. Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, v. 108, p. 147-152, 1994.
- ANGUS, B. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **International Journal of Parasitology**, v. 26, p. 1341-1355, 1996.
- ARAÚJO, E. R.; MADRUGA, C. R.; ALMEIDA, M. A. O.; LEAL, C. R. B.; MIGUITA, M. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado da

Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de congutinação rápida. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, p.111-115, 1997.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; LEAL, C. R. B.; BASTOS, P. A. S.; MARQUES, A. P. C. Frequência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, p. 243-246, 1998.

ALMERIA, S., CASTELLÀ, J., FERRER, D., ORTUÑO, A., ESTRADA-PEÑA, A., GUTIÉRREZ, J.F. Bovine piroplasms in minorca (Balearic Islands Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. **Veterinary Parasitology**, v. 99, p. 249–259, 2001.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, p. 139-148, 2003.

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

ANTONIASSI, N.A.B., CORRÊA, A.M.R., SANTOS, A.S., PAVARINI, S.P., SONNE, L., BANDARRA, P.M., DRIEMEIER, D. Surto de babesiose cerebral em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.39, n.3, 2009.

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

BARCI, L.A., OLIVEIRA, M.R., MACHADO, R.Z., OLIVEIRA, D.A., ARAÚJO FILHO, R.S. Epidemiologia da babesiose bovina no Estado de São Paulo: I. Estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do município de Pindamonhagaba, Vale do Paraíba. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, p. 79-82, 1994.

BÖSE, R., JORGENSEN, W.K., DALGLIESH, R.J., FRIEDHOFF, K.T., DE VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 61-74, 1995.

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

BARROS, S.L., MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., MENK, C.F., DE ALMEIDA, M.A., MELO, E.P., KESSLER, R.H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 613-617, 2005.

BARROS, C. S. L., DRIEMEIER, D., DUTRA, I., LEMOS, R. **Coleção Vallée: Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. Montes Claros, MG: Vallée, 2006.

CALLOW, L.L.; HOYTE, H.M.D. The separation of *Babesia bigemina* from *Babesia argentina* and *Theileria mutans*. **Australian veterinary Journal**, v.37, p.381-390, 1961.

COSSÍO-BAYÚGAR, R., RODRÍGUEZ, S.D., GARCÍA-ORTIZ, M.A., GARCÍA-TAPIA, D., ABOYTES-TORRES, R. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 32, p. 165-70, 1997.

COETZEE, J. F., APLEY, M.D., KOCAN, K.M., RURANGIRWA, F.R., VAN DONKERSGOED, J. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 61–73, 2005.

COOKE, B. M., MOHANDAS, N., COWMAN, A.F., COPPEL, R.L. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. **Veterinary Parasitology**, v. 132, p. 273-295, 2005.

COSTA-JÚNIOR, L.M., RABELO, E.M., MARTINS FILHO, O.A., RIBEIRO, M.F. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 231-236, 2006.

CANTU, A. ORTEGA-S, J.A., MOSQUEDA, J., GARCIA-VAZQUEZ, Z., HENKE, S.E., GEORGE, J.E. Immunologic and molecular identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Free-Ranging White-Tailed Deer in Northern Mexico. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, p. 504-507, 2007.

DUMLER, J. S., BARBET, A.F., BEKKER, C.P., DASCH, G.A., PALMER, G.H., RAY, S.C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the family's Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of

*Ehrlichia equi* and HE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DREHER, U.M., HOFMANN-LEHMANN, R., MELI, M.L., REGULA, G., CAGIENARD, A.Y., STÄRK, K.D., DOHERR, M.G., FILLI, F., HÄSSIG, M., BRAUN, U., KOCAN, K.M., LUTZ, H. Seroprevalence of anaplasmoses among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. **Veter. Microbiol.**, 2005.

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

FARIAS, N.A.R. **Diagnóstico e Controle da Tristeza Parasitária Bovina**. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba. 80p. 1995.

FURLONG J., MARTINS J.R.S., PRATA M.C.A. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite (Comunicado Técnico 36), 6 p., 2003.

FURLONG, J. MARTINS J.R.S., PRATA M.C.A. Carrapatos: problemas e soluções. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 65 p., 2005.

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

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

GALE, K. R., DIMMOCK, C.M., GARTSIDE, M., LEATCH, G. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. **International Journal of Parasitology**, v.26, p. 1103-9, 1996.

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

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

GUIMARÃES, M.A., CARVALHO, A.H.O., DAHER, D.O., ROCHA, C.M.B.M., HIRSCH, C. Soroprevalência e fatores de risco para *Babesia bovis* em rebanhos leiteiros na região sul de Minas Gerais. **Ciênc. agrotec.**, v. 35, p. 826-832., 2011.

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

HOWARD, J., ROZZA, D., GRAÇA, D., FIGHERA, R. **Babesiose Bovina** (2001). Disponível em: <http://www.vet.uga.edu/vpp/archives/nsep/babesia/PORT/index.htm>. Acesso em: 26/10/2012.

IICA. Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina: **San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura**, pag. 79, 1987.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Produção da pecuária municipal 2010**. Rio de Janeiro, v. 38, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>Acessado em: 13 out. 2012.

JONSSON, N.N.; BOCK, R.E.; JORGENSEN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses , and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.1-9, 2008.

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

KESSLER, R. H., SASTRE, A. M., MOREIRA, M. A., MADRUGA, C. R., HONER, M. R. Experiencias con vacunas vivas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma centrale* conservadas por congelación en Brasil. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 22, p. 189-196, 1991.

KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. Carrapato, tristeza parasitaria e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande. M.S.: Embrapa-CNPGC, 1998.

KOCAN, K. M., DE LA FUENTE, J., GUGLIELMONE, A.A., ROY D. MELÉNDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 698-712, 2003.

KOCAN K.M., DE LA FUENTE, J., BLOUIN, E.F., GARCIA-GARCIA, J.C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v.129, p.285-300, 2004.

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

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

LOPES, L.G., LOPES, R.S., PIRES, P.P., ARAÚJO, F.R., ARAÚJO JÚNIOR, J.P. ALVES, L.;C., PAZ, F., SACCO, S.R. Ação da riboflavina associada à radiação ultravioleta na inativação do *Anaplasma marginale* em sangue bovino. Anais do IX Congresso Brasileiro de Buiatria, Veterinária e Zootecnia, 18, p. 891, 2011.

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

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

MASSARD, C. L.; FREIRE, R. B. Etiologia, manifestações e diagnóstico das babesioses bovinas no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 4, p. 53-56, 1985.

MCGUIRE, T. C. DAVIS, W.C., BRASSFIELD, A.L., MCELWAIN, T.F., PALMER, G.H. Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p.788-93, 1991.

MADRUGA, C.R., HONER, M.R., ANDREOTTI, R., et al. Prevalência de *Anaplasma marginale* em três regiões do estado da Paraíba. Anais VI Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa, p.350-352, 1993.

MARTINS, J. R.; CORRÊA, B. L.; CERESÉR, V. H. Estudo comparativo entre as provas de Elisa e Imunofluorescência Indireta (IFI) para detectar anticorpos contra *Babesia bovis*. **Ciência Rural**, v. 26, p. 115-118, 1996.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A., LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R. F.; VALADÃO, I. F. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection on antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 17-26, 1997.

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

MENDONÇA, C. L.; KOHAYAGAWA, A.; SCHENK, M. A. M.; MADRUGA, C. R.; VIEIRA, D.; AFONSO, J. A. B.; CARVALHO, C. M. E. Perfil eletroforético das proteínas séricas de bezerros nelores infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões sudeste, nordeste e norte do Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.5, p. 70-75, 2002.

MARQUES, D.C. **Criação de bovinos**. 7ª ed. Belo Horizonte: Ed.Consultoria Veterinária e Publicações, 586p., 2003.

MSD SAÚDE ANIMAL, 2012a. Imizol. Disponível em: [http://www.msd-saude-animal.com.br/products/imizol\\_\\_\\_/020\\_resumo\\_da\\_bula.aspx](http://www.msd-saude-animal.com.br/products/imizol___/020_resumo_da_bula.aspx). Acesso em: 16/10/2012.

MSD SAÚDE ANIMAL, 2012b. Tratamento TPB. Disponível em: [http://www.msd-saude-animal.com.br/Doencas/TPB/060\\_Tratamento.aspx](http://www.msd-saude-animal.com.br/Doencas/TPB/060_Tratamento.aspx). Acesso em: 16/10/2012.

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

RODRIGUES, A., RECH, R.R., BARROS, R.R., FIGHERA, R.A., BARROS, C.S.L. Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. **Ciência Rural**, v.35, p.121-135, 2005.

SMITH, R.D.; EVANS, D.E.; MARTINS, J.R.; CERESER, V.H.; CORREA, B.L., PETRACCIA, C.; CARDOZO, H.; SOLARI, M.A.; NARI, A. Babesiosis (*Babesia bovis*) Stability in Unstable Environments. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 510-520, 2000.

SOUZA J.C.P., SOARES, C.O., MASSARD, C.L., SCOFIELD, A., FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesq. Vet. Bras.** v.20, p. 97-101, 2000.

SACCO A.M.S.. Controle de surtos de tristeza parasitária bovina. Circular Técnica 26, Embrapa Pecuária Sul, Bagé, 2002a.

SACCO A.M.S. Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina: Por quê, quando e como fazer. Circular Técnica 28, Embrapa Pecuária Sul, Bagé, 2002b.

SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T. **Parasitologia Animal, animais de produção**. 1 ed. Rio de Janeiro. Editora de Publicações Biomédicas LTDA. 158p, 2002.

SCOLES, G.A., BROCE, A.B., LYSYK, T.J., PALMER, G.H..Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **J. Med.Entomol.** v.42, 2005.

SILVA, R. A.; CORRÊA, F. N.; BOTTEON, R. C. C. M.; BOTTEON, P. T. L. Infecção natural por hemoparasitos em bezerros submetidos à quimio-profilaxia aos 30 dias de idade. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 163-165, 2007.

SINGH, H.; MISHRA, A. K.; RAO, J. R. Comparison of indirect fluorescent antibody test (IFAT) and slide enzyme linked immunosorbent assay (SELISA) for diagnosis of *Babesia bigemina* infection in bovines. **Tropical Animal Health and Production**, v.41, p. 153-159, 2009.

THEILER, A. Gall sickness of South Africa (anaplasmosis of cattle). **The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 23, p. 98–115, 1910.

URQUHART G. M., ARMOUR J., DUNCAN J.L., DUNN A.M. & JENNINGS F.W. **Parasitologia Veterinária**, 2 ed. Guanabara Koogan, 211, 1998.

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

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

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

VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M. Diagnóstico em anaplasmosse bovina. **Ciência Rural**, v. 31, p. 361-368, 2001.

VIEIRA, M.I.B., LEITE, R.C., MARTINS, J.R., SACCO, A.M.S, SILVA, J.G.C. Resposta imune humoral contra *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em bovinos submetidos a distintas estratégias de controle do carrapato vetor *Boophilus microplus* (Canestrine, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, p. 71-76, 2002.

WAGNER, G., CRUZ, D., HOLMAN, P., WAGHELA, S., PERRONE, J., SHOMPOLE, S., RURANGIRWA, F. Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 193-199, 1992.

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

ZINTL, A., GRAY, J.S., SKERRETT, H.E., MULCAHY, G. Possibles mechanisms underlying age related resistance to bovine babesiosis. **Parasite Immunology**, n.27, p. 115-120, 2005.

### 3 ARTIGO 1

#### BABESIOSE E ANAPLASMOSE EM REBANHOS BOVINOS DE PETROLINA E OURICURI, ESTADO DE PERNAMBUCO

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho consistiu em determinar a prevalência da TPB em bovinos de Petrolina e Ouricuri, PE, como também definir os possíveis fatores de risco para a ocorrência da doença nestes municípios. Foram colhidas amostras de sangue total para realização de exame sorológico através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e sangue periférico para pesquisa parasitológica. Foram aplicados junto aos produtores questionários sanitários envolvendo aspectos epidemiológicos objetivando identificar possíveis fatores de risco para TPB. Carrapatos foram coletados e identificados visando o diagnóstico da infecção por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* através da detecção de DNA pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). O estudo foi conduzido com 861 bovinos, sendo 468 de Petrolina e 393 de Ouricuri. A visualização de merozoítos e corpúsculos intraeritrocitários pela pesquisa parasitológica foram demonstrados em 3% (14/468) e 1% (4/393) dos bovinos para *Babesia* spp. e de *A. marginale* em 2,3% (11/468) e 1,2% (5/393) dos animais de Petrolina e Ouricuri, respectivamente. A soroprevalência de *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em Petrolina foi de 35,04% (164/468), 35,89% (168/468) e 32,26% (151/468), respectivamente, observando-se co-infecção destes patógenos em 31,62% (148/468) dos animais. Em Ouricuri, 45,54% (179/393) dos animais foram positivos para *A. marginale*, 38,6% (152/393) para *B. bigemina* e 54,9% (216/393) para *B. bovis*, sendo que 32,06% (126/393) das amostras foram reativas para *Babesia* spp. e *A. marginale*, demonstrando co-infecção também nessa região. Pela PCR, foi possível detectar infecção por *Babesia* spp. em 5,8% (8/137) das amostras de carrapatos, das quais, em 62,5% (5/8) posteriormente detectou-se infecção por *B. bovis*; e por *A. marginale* em 23% (32/137) das amostras. A presença de carrapatos, o uso de carrapaticida, a idade, a raça, assim como o município de residência dos animais foram identificados como fatores de risco para TPB pela análise univariável e multivariável. Este estudo permitiu caracterizar os municípios estudados como de instabilidade enzoótica para

esses hemoparasitos, e conseqüentemente, alertar para adoção de medidas adequadas de controle e realização de novos estudos.

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

## **BABESIOSIS AND ANAPLASMOSIS IN CATTLE IN PETROLINA AND OURICURI, STATE OF PERNAMBUCO**

**ABSTRACT:** The aim of this study was to determine the prevalence of TPB in cattle from Ouricuri and Petrolina, PE, as well as define the possible risk factors for the occurrence of the disease in these counties. Were collected blood samples for serologic testing by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) and peripheral blood for parasitological research. Were applied to the producers involving sanitary epidemiological questionnaires aiming to identify possible risk factors for BPD. Ticks were collected and identified for the diagnosis of infection by *A. marginale*, *B. bovis* and *B. bigemina* detecting DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR). The study was conducted with 861 cattle, being 468 in Petrolina city and 393 in Ouricuri city. By parasitological examination, the visualization of corpuscles and intraerythrocytic merozoites were shown in 3% (14/468) and 1% (04/393) for *Babesia* spp. of cattle. and *A. marginale* 2.3% (11/468) and 1.2% (05/393) of animals from Petrolina and Ouricuri, respectively. The seroprevalence of *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis* in Petrolina was of 35.04% (164/468), 35.89% (168/468) and 32.26% (151/468), respectively, observing co-infection of these pathogens in 31.62% (148 / 468) animals. In Ouricuri, 45.54% (179/393) of the animals were positive for *A. marginale*, 38.6% (152/393) for *B. bigemina* and 54.9% (216/393) for *B. bovis*, and 32.06% (126/393) samples were reactive for *Babesia* spp. and *A. marginale*, demonstrating coinfection also in this region. Through PCR, it was possible to detect *Babesia* spp. in 5.8% (8/137) of samples of ticks, which 62.5% (5/8) was detected later infection with *B. bovis*; and *A. marginale* in 23% (32/137) of the samples. The presence of ticks, the use of acaricide, age, race, and county of residence of the animals were identified as risk factors for TBD by univariate analysis and multivariate. This study allowed characterization of the municipalities studied as enzootic instability for these hemoparasitic, and consequently alert for adoption of adequate control measures and new studies.

**Keywords:** *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale*; epidemiology.

## INTRODUÇÃO

A babesiose bovina é causada pelos hemoprotozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a anaplasmoze, pela riquetsia *Anaplasma marginale*. Essas enfermidades apresentam sinais clínicos e epidemiologias muito similares (BOCK et al., 2004; KOCAN et al., 2010) e são responsáveis por causar grandes perdas econômicas na pecuária mundial e brasileira.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é o principal vetor biológico para os três agentes, o qual se distribui em regiões tropicais e subtropicais (GUGLIELMONE, 1995). Especificamente, a anaplasmoze ainda pode ser transmitida mecanicamente pelos dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys* e de forma iatrogênica, através de fômites com sangue contaminado (KOCAN et al., 2010).

Dentre os principais sinais clínicos apresentados pelos animais, destacam-se anemia progressiva, icterícia, febre, apatia, inapetência, taquipnéia; observam-se também aborto, relatado somente na anaplasmoze; hemoglobinemia e hemoglobinúria, observados somente na babesiose, que geralmente evoluem para a morte do animal (BOCK et al., 2004; KOCAN et al., 2010).

A dinâmica da infecção é dependente de fatores como população de carrapatos infestantes; capacidade de transmissão do carrapato; susceptibilidade dos bovinos, que pode variar com a raça, idade, estado fisiológico e imunológico dos animais (DREHER et al., 2005; KOCAN et al., 2010).

O Brasil é reconhecido como um país enzoótico, no entanto, existem algumas regiões que, em função de suas condições edafoclimáticas, não favorecem o desenvolvimento do carrapato durante todo o ano e, dessa forma, de acordo com conceitos de Mahoney & Ross (1972), podem ser consideradas regiões de instabilidade enzoótica. É conhecido, com base nestes conceitos, que as maiores perdas econômicas referentes à babesiose bovina ocorrem em áreas de instabilidade enzoótica ou por ocasião da transferência de animais destas, ou de áreas livres, para outras cuja situação epidemiológica seja de estabilidade.

O diagnóstico destas enfermidades baseiam-se na pesquisa direta do agente em esfregaços sanguíneos (BÖSE et al., 1995; BOCK et al., 2004), além de métodos sorológicos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e moleculares como a PCR (COSTA JÚNIOR et al., 2006).

O estudo epidemiológico da babesiose e da anaplasmosse bovina em uma determinada área pode revelar a possibilidade da ocorrência ou não de surtos. Tal possibilidade é avaliada segundo a situação epidemiológica da região estudada. Em regiões semiáridas do Nordeste há uma escassez de estudos sobre a situação epidemiológica da babesiose e anaplasmosse. Com isso, existe a necessidade de estudar cada região, uma vez que, não se pode aplicar dados epidemiológicos de uma determinada área a outra, principalmente devido à diversidade climática. Este estudo objetivou verificar os aspectos epidemiológicos da babesiose e anaplasmosse bovina, referente à infecção nos animais e carrapatos; como também definir os possíveis fatores de risco para a ocorrência dessas doenças em municípios localizados no semiárido pernambucano.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **LOCAL DE ESTUDO**

O estudo foi realizado entre agosto de 2011 e abril de 2013 em propriedades rurais dos municípios de Petrolina e Ouricuri, estado de Pernambuco. Petrolina detém aproximadamente 18.500 cabeças de bovinos (ADAGRO, 2012) e está localizada na mesorregião do São Francisco, ocupando uma área territorial de 4.558,537 km<sup>2</sup> o que representa 4,81% do Estado de Pernambuco. O clima é tropical semiárido, a sede do município tem uma altitude aproximada de 376 metros e latitude 09°23'55" sul e longitude 40°30'03" oeste. O índice pluviométrico médio é de 431,8mm anuais. No inverno as temperaturas mínimas são entre 15°C a 22°C, e as máximas entre 28°C a 32°C, no verão as mínimas estão entre 23°C a 30°C e as máximas entre 33°C a 40°C. Tem como principal atividade econômica a fruticultura irrigada, destacando-se as culturas de uva, manga, banana e goiaba. A vegetação é basicamente composta por caatinga hiperxerófila com trechos de floresta caducifólia. Possui uma população de 294.081 habitantes, sendo que 219.309 dos habitantes residem na área urbana do município (IBGE, 2010).

O município de Ouricuri concentra aproximadamente 30.500 cabeças de bovinos (ADAGRO, 2012), localizando-se no Sertão pernambucano, ocupa uma área

de 2.422,882 km<sup>2</sup>, o que representa 2,25% do Estado de Pernambuco. A sede do município tem uma altitude aproximada de 451 metros e coordenadas geográficas de 07°52'57" de latitude sul e 40°04'54" de longitude oeste, distando 620,6 km da capital. A precipitação média mensal varia entre 5 a 140 mm, do mês mais seco ao mês mais chuvoso, aproximadamente (IBGE, 2010).

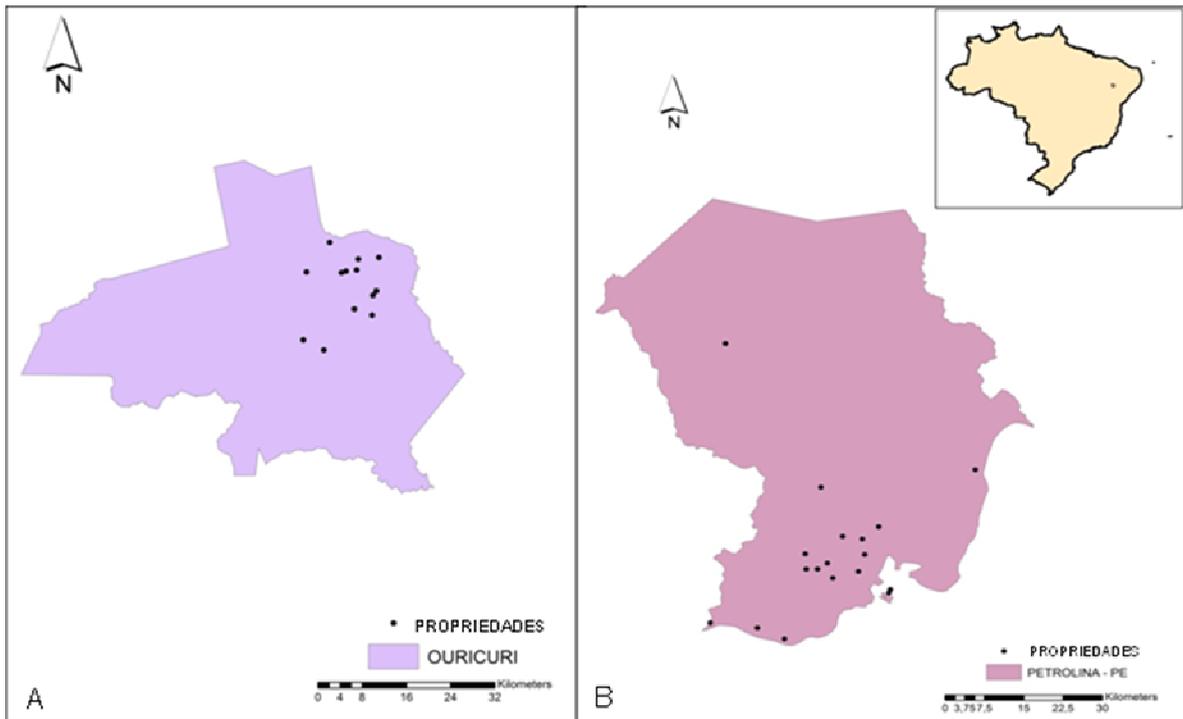


Fonte: <http://peturismo.blogspot.com.br/2009/11/longe-mas-vale-pena-visitara.html>

**FIGURA 1.** Mapa do estado de Pernambuco, adaptado.

## CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES

As propriedades visitadas durante esse estudo caracterizavam-se como sendo de corte ou de leite e exerciam manejo do tipo extensivo, intensivo ou semi-intensivo. O rebanho era composto por animais puros, mestiços ou ambos. A alimentação dos animais era variada, com a utilização de pasto, concentrado, volumoso ou ainda subprodutos da fruticultura e da agricultura. Em Petrolina algumas propriedades localizavam-se nas proximidades do Rio São Francisco e tanto em Petrolina como em Ouricuri algumas possuíam área de irrigação devido a plantação de forragem para os animais, enquanto que outras apresentavam reduzida área verde ou até mesmo muito seca.



**FIGURA 2.** Mapas com a localização das propriedades visitadas nos municípios de Ouricuri (A) e Petrolina (B), PE.

## AMOSTRAGEM

Foram utilizados 861 bovinos, sendo 468 do município de Petrolina provenientes de 19 propriedades rurais e 393 de Ouricuri oriundos de 13 propriedades. O cálculo do número de animais foi determinado a partir de uma amostragem considerando 95% de confiança, erro de 7% e prevalência estimada de 50%. Os animais foram escolhidos de forma aleatória, independentemente de raça, com idade acima de 6 meses. Foram colhidas amostras de sangue através de venopunção da veia jugular, usando tubos sem anticoagulante. Após centrifugação (3.600 rpm, 15 minutos), o soro obtido de cada um dos animais foi alíquotado em tubos de 1,5 mL e estocado a - 20°C.

## ESFREGAÇO SANGUÍNEO

Para realização da análise hemoparasitológica foi preparado um esfregaço sanguíneo de cada animal, utilizando-se uma gota de sangue obtido por punção de vaso sanguíneo periférico da orelha, secos ao ar, identificados e corados pelo Panótico Rápido (RENYLAB<sup>®</sup>) no Laboratório de Parasitologia Veterinária da UNIVASF. A pesquisa de merozoítos/trofozoítos de *Babesia* spp. e de corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale*, foi feita por meio da visualização em microscópio de luz branca, utilizando ampliação de 1000X.

## COLHEITA DOS CARRAPATOS

No momento da colheita sanguínea, todos os bovinos foram examinados para observação da presença de carrapatos. Era realizada a colheita de carrapatos de ambos os sexos e em qualquer fase de parasitismo, os quais eram colocados em frascos plásticos secos, vedados com tampas contendo pequenos furos, para posterior identificação. No laboratório, os ectoparasitas colhidos foram observados em microscópio estereoscópio e os carrapatos foram identificados segundo Aragão & Fonseca (1961) armazenados em microtubos contendo álcool a 70%.

## DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

A presença de anticorpos IgG anti-*B. bigemina*, anti-*B. bovis* e anti-*A. marginale* foi detectada no soro, por meio da RIFI, utilizando anticorpo monoclonal antibovino (AbD Serotec) conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e antígenos fixados em lâminas de esfregaço sanguíneo bovino espesso contendo hemácias parasitadas por esses micro-organismos, confeccionadas no Laboratório de Protozoologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), segundo o Instituto Interamericano de Cooperación para La Agricultura (IICA, 1987).

Os soros foram diluídos em PBS 1X na proporção de 1:40. Foram colocados 5µL da diluição do soro teste em cada poço da lâmina, inclusive o controle positivo e o branco (PBS 1X). Após 30 minutos de incubação a 37°C, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 1X por 3 minutos cada lavagem e uma vez com água destilada, também por três minutos, e secas a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado, em cada poço, o conjugado antibovino (AbD Serotec<sup>®</sup>), marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluído a 1: 150 em azul de Evans (1:50 em PBS Tween). As lâminas foram incubadas novamente a 37°C por 30 minutos e lavadas do mesmo modo já descrito. As lâminas foram secas em temperatura ambiente, foi adicionada glicerina tamponada e, em seguida, foram cobertas por lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio fluorescência, em aumento de 20X e 40X. As amostras reativas na diluição de 1:40 foram consideradas positivas.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### **Extração de DNA**

A extração de DNA dos carrapatos foi realizada conforme protocolo padronizado por Horta et al., (2007) através da maceração dos artrópodes em microtubos, com auxílio de ponteiros adaptadas. As amostras foram processadas individualmente e/ou em “pools” conforme a disponibilidade. Foram separados aleatoriamente entre as propriedades 62 carrapatos individuais (20 provenientes de animais de Petrolina e 42 de animais de Ouricuri) e 75 “pools” de carrapatos (27 provenientes de Petrolina e 48 de Ouricuri), cada “pool” contendo 4 carrapatos (300 carrapatos), totalizando 137 amostras (47 oriundas de Petrolina e 90 de Ouricuri). Os carrapatos foram submetidos à extração com kit comercial Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA), para um volume final de 75 µL para os “pools” e 50 µL para extração de carrapatos individuais.

## Reação em cadeia da Polimerase

Inicialmente, visando à amplificação de DNA de *Babesia* spp. foram testadas sequências de oligonucleotídeos que consistem na amplificação de fragmentos de DNA de 551 pares de base do gene 18S rRNA de *Babesia* spp. de acordo com Almeida (2011): BAB 143-167 [5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3'] e BAB 694-667 [5'-GCTTGAAACACTCTARTTTCTCAAAG-3'].

As reações foram feitas em volume final de 25µL, contendo 11,0 µL de água ultra purificada; 4,0 µL de 2 mM mix dNTP (Invitrogen®); 0,75 µL de 25 mM MgCl<sup>2</sup> (Invitrogen®); 2,5µL de buffer 10x (Invitrogen®); 1,25µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25µL (1U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen®); e 4 µL da amostra de DNA. Para cada reação, foi adicionado um controle positivo (DNA *Babesia* spp) e um controle negativo (água ultra purificada).

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, sendo seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturação, 58°C por 30 segundos para anelamento, 72°C por 30 segundos para extensão e 72°C por 7 minutos para extensão final.

Posteriormente, as amostras positivas para *Babesia* spp. foram submetidas a uma nova reação utilizando *primers* específicos para *B. bovis* e *B. bigemina* (COSTA et al., 2013). Na PCR para *B. bovis*, foram utilizados os *primers* Bbo(F) [5'- CGA GGA AGG AAC TAC CGA TGT TGA ATA TC-3'] e Bbo(R) [5'- CAA CGT ACG AGG TCA AGC TAC CGA GCA G-3'], que amplificam um fragmento de 347-pb específico para o gene de roptria (*rap-1*) de *B. bovis*. Na PCR para *B. bigemina*, foram utilizados os *primers* Bbi(F) [5'- GGG ACG TCA AGC GAT TTT GAG ACG T-3'] e Rbi(R) [5'- GAG TGT TGC TGA TTG ACG ACC TAA GCG C-3'], que amplificam um fragmento de 340-pb específico para o gene de roptria (*rap-1*) de *B. bigemina*.

Visando a PCR para amplificação de DNA de *A. marginale*, foram empregados os seguintes *primers* Am1(F) [5'-CAA TCG TGA GGG ATA GCC TTG TAC-3'] e Am1(R) [5'-TGG TAT CAC GGT CAA AAT CTT TGC T-3'], que amplificam um fragmento de 300-pb específico para o gene *msp1a* de *A. marginale* (COSTA et al., 2013).

Todas as reações foram realizadas nas mesmas condições de reagentes e ciclos térmicos. Para tal, cada tubo de reação consistiu num volume total final de

25µL, com uma mistura contendo 12,6µL de água ultrapura, 2,5µL de tampão, 2,5µL de amostra de DNA dos carrapatos, 4,0µL de dNTPs, 0,75µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,25µL de cada *primer* e 0,15µL de enzima Taq-polimerase (Taq-Platinum, Invitrogen). As condições de PCR foram 95°C por 5 min., seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg., 58°C por 30 seg., 72°C por 30seg.; finalmente, houve uma extensão final a 72°C por 5 min.

As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador (Biocycler®) e o produto amplificado na PCR foi submetido à eletroforese em gel de Agarose a 1,5%, sob 100 V (≅ 1 hora) corado por Brometo de etídeo (30 minutos). As bandas de DNA separadas por meio de eletroforese foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um computador com digitalizador de imagens. Foram consideradas positivas as amostras com produto amplificado correspondente ao mesmo padrão de migração da banda gerada pelo controle positivo correspondente.

**TABELA 1.** Sequência de iniciadores utilizados para identificação dos hemoparasitas.

DNA	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
<i>Babesia</i> spp.	5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3' 5' GCTTGAAACACTCTARTTTCTCAAAG-3'	Bab 143-167 Bab 694-667	18S rRNA	551	Almeida (2011)
<i>B. bovis</i>	5'-CGAGGAAGGAAGGACTACCGATGTTGAATATC-3' 5'-CAACGTACGAGGTCAAGCTACCGAGCAG-3'	Bbo(F) Bbo(R)	rap-1	347	Costa et al. (2013)
<i>B. bigemina</i>	5'-GGGACGTCAAGCGATTTTGAGACGT-3' 5'-GAGTGTGCTGATTGACGACCTAAGCGC-3'	Bbi(F) Rbi(R)	rap-1	340	Costa et al. (2013)
<i>A. marginale</i>	5'-CAATCGTGAGGGATAGCCTTGAC-3' 5'-TGGTATCACGGTCAAAATCTTTGCT-3'	Am1(F) Am1(R)	msp1a	300	Costa et al. (2013)

## APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIO

No momento da visita às propriedades, aplicou-se um questionário para avaliar as condições sanitárias e epidemiológicas, como tipo de criação, manejo sanitário, presença de sinais clínicos e medidas de controle da TPB, objetivando a identificação de possíveis fatores de risco da doença na região.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de fatores de risco foi conduzida em duas etapas: análise univariável e análise multivariável. Foram feitas duas análises: uma para propriedades e outra para animais. Na análise univariável, cada variável independente foi cruzada com a variável dependente, e aquelas que apresentaram valor de  $p \leq 0,20$  pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram selecionadas para a análise multivariável, utilizando-se regressão logística múltipla. Para a determinação da variável dependente, os resultados sorológicos foram avaliados em dois níveis dicotômicos: para animais, de acordo com o resultado da sorologia (negativo = 0; positivo = 1), e para propriedades, de acordo com a proporção de bovinos positivos no rebanho ( $\leq 25\%$  de bovinos positivos = 0;  $> 25\%$  de bovinos positivos = 1). O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 20.0 *for Windows*.

## RESULTADOS

### ESFREGAÇO SANGUÍNEO

No exame hemoparasitológico das amostras de sangue dos bovinos provenientes das propriedades dos municípios de Petrolina e Ouricuri, foram visualizadas, respectivamente, inclusões intraeritrocitárias sugestivas de *Babesia* spp. em 3% (14/468) e 1% (04/393) dos bovinos e de *A. marginale* em 2,3% (11/468) e 1,2% (05/393) dos animais.

### DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

A prevalência de *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* detectada por meio da RIFI nas amostras de soro de bovinos dos municípios de Petrolina foi de 35,04% (164/468), 35,89% (168/468) e 32,26% (151/468) respectivamente. Das amostras de soro analisadas 148 (31,62%) foram reativos para *Babesia* spp. e *A. marginale*, demonstrando co-infecção. Em Ouricuri, 45,54% (179/393) das amostras foram

positivas para *A. marginale*, 38,6% (152/393) para *B. bigemina* e 54,9% (216/393) para *B. bovis*, observando-se infecção simultânea de *Babesia* spp. e *A. marginale* em 32,06% (126/393) dos animais (TABELA 2).

**TABELA 2.** Número e frequência de anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em amostras de soro sanguíneo de bovinos das propriedades rurais dos municípios de Petrolina e Ouricuri-PE utilizando a RIFI.

	Nº de animais reagentes para <i>B. bigemina</i> (%)	Nº de animais reagentes para <i>B. bovis</i> (%)	Nº de animais reagentes para <i>A. marginale</i> (%)	Co-infecção ( <i>Babesia</i> spp. e <i>A. marginale</i> )	Nº de animais amostrados
Petrolina	168 (35,9)	151 (32,2)	164 (35,0)	111 (23,7)	468
Ouricuri	152 (38,6)	216 (54,9)	179 (45,5)	126 (32,0)	393
Total	320 (37,1)	367 (42,6)	343 (39,8)	237 (27,5)	861

Ao fazer uma análise individual de cada propriedade nos municípios estudados, pôde-se observar que a condição epidemiológica não foi a mesma. Em Petrolina há situações de instabilidade em 63,1% (12/19) das propriedades, estabilidade em 31,6% (6/19), e ainda uma propriedade considerada livre para anaplasrose, pois nenhum dos animais testados apresentou anticorpos anti-*A. marginale*. Com relação à babesiose, 15,8% (3/19) das propriedades são consideradas estáveis, enquanto 84,2% (16/19) destas são instáveis (TABELA 3). Em Ouricuri, 69,2% (9/13) e 46% (6/13) das propriedades, respectivamente, são instáveis para *A. marginale* e *Babesia* spp., e estabilidade foi observada em 30,8% (4/13) e 54% (7/13) destas (TABELA 4).

**TABELA 3.** Frequência de animais infestados por carrapatos e frequência de anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em amostras de soro sanguíneo de bovinos de diferentes propriedades do município de Petrolina-PE utilizando a RIFI.

Propriedade	Animais infestados por carrapatos (%)	Nº de animais reagentes frente <i>A. marginale</i> (%)	Nº de animais reagentes frente <i>Babesia</i> spp. (%)	Co-infecção <i>Babesia</i> spp. e <i>A. marginale</i> (%)
01	0/31 (0%)	4/31 (12,9%)	12/31 (38,7%)	3/31 (9,6%)
02	0/16 (0%)	8/16 (50%)	8/16 (50%)	7/16 (43,7%)
03	29/31 (93,5%)	29/31 (93,5%)	24/31 (77,4%)	23/31 (74,1%)
04	0/12 (0%)	6/12 (50%)	8/12 (66,6%)	4/12 (33,3%)
05	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	4/12 (33,3%)	1/12 (8,3%)
06	0/38 (0%)	1/38 (2,63%)	15/38 (39,4%)	0/38 (0%)
07	34/34 (100%)	22/34 (64,7%)	31/34 (91,1%)	21/34 (61,7%)
08	13/22 (59,1%)	13/22 (59%)	12/22 (54,5%)	4/22 (18,1%)
09	0/29 (0%)	8/29 (27,5%)	16/29 (55,13%)	6/29 (20,6%)
10	0/30 (0%)	5/30 (16,6%)	18/30 (60%)	4/30 (13,3%)
11	0/22 (0%)	8/22 (36,3%)	12/22 (54,5%)	5/22 (22,7%)
12	0/15 (0%)	10/15 (66,6%)	10/15 (66,6%)	5/15 (33,3%)
13	0/27 (0%)	6/27 (22,2%)	12/27 (44,4%)	5/27 (18,5%)
14	0/24 (0%)	14/24 (22,2%)	6/24 (25%)	3/24 (12,5%)
15	0/20 (0%)	0/20 (0%)	2/20 (10%)	0/20 (0%)
16	0/35 (0%)	5/35 (14,28%)	16/35 (45,7%)	4/35 (11,4%)
17	0/23 (0%)	6/23 (26%)	15/23 (65,2%)	4/23 (17,3%)
18	0/14 (0%)	6/14 (42,8%)	8/14 (57,1%)	4/14 (28,5%)
19	0/33 (0%)	12/33 (36,3%)	18/33 (54,5%)	8/33 (24,2%)
<b>TOTAL</b>	<b>76/468 (16,2%)</b>	<b>164/468 (35%)</b>	<b>247/468 (52,8%)</b>	<b>111 (23,7%)</b>

**TABELA 4.** Número e frequência de anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em amostras de soro sanguíneo de bovinos de diferentes propriedades do município de Ouricuri-PE utilizando a RIFI.

Propriedade	Animais infestados por carrapatos (%)	Nº de animais reagentes frente <i>A. marginale</i> (%)	Nº de animais reagentes frente <i>Babesia</i> spp. (%)	Co-infecção <i>Babesia</i> spp. e <i>A. marginale</i> (%)
01	5/36 (13,9%)	29/36 (80,5%)	20/36 (55,5%)	15/36 (41,6%)
02	12/26 (46,2%)	17/26 (65,3%)	21/26 (80,7%)	15/26 (57,6%)
03	11/20 (55%)	6/20 (30%)	16/20 (80%)	2/20 (10%)
04	1/34 (2,9%)	18/34 (52,9%)	26/34 (76,4%)	13/34 (38,2%)
05	24/34 (70,6%)	2/34 (5,8%)	22/34 (64,7%)	0/34 (0%)
06	2/26 (7,7%)	18/26 (69,2%)	19/26 (73%)	12/26 (46,1%)
07	31/34 (91,2%)	12/34 (35,2%)	30/34 (88,2%)	12/34 (35,2%)
08	6/23 (26,1%)	8/23 (34,7%)	21/23 (91,3%)	8/35 (22,8%)
09	0/36 (0%)	9/36 (25%)	9/36 (25%)	3/36 (8,3%)
10	0/29 (0%)	3/29 (10,3%)	16/29 (55,1%)	2/29 (6,8%)
11	31/40 (77,5%)	32/40 (80%)	36/40 (90%)	28/40 (70%)
12	4/20 (20%)	11/20 (55%)	18/20 (90%)	10/20 (50%)
13	0/35 (0%)	14/35 (40%)	14/35 (40%)	6/35 (17,1%)
<b>TOTAL</b>	<b>127/393 (32,3%)</b>	<b>179 (45,5%)</b>	<b>268/393 (68,2%)</b>	<b>126 (32,0)</b>

A análise da soroprevalência de acordo com a faixa etária revelou que para Anaplasmosose o maior número de animais positivos estava entre 37 e 48 meses (52,57%) e aqueles que apresentavam menor positividade foram os que possuíam entre 6-12 meses (33,33%). Com relação à Babesiose, o maior percentual de positivos para *B. bovis* e *B. bigemina* pertenciam aos grupos de 48-60 meses (50,76%) e de 25-36 meses (43,78%) respectivamente, enquanto que o grupo etário com menor positividade para ambas as espécies, corresponde também ao grupo de 6-12 meses com 22,8% de positivos para *B. bovis* e 26,66% para *B. bigemina*. Os bovinos da raça Nelore, Girolando e os animais mestiços foram os que apresentaram maior positividade para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*. De

acordo com o sexo dos animais, as fêmeas apresentaram maior soroprevalência para os hemoparasitas analisados (TABELA 5).

**TABELA 5.** Número e frequência de anticorpos anti-*A. marginale*, anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em amostras de soro sanguíneo de bovinos de Petrolina e Ouricuri-PE, de diferentes faixas etárias, sexo e raças.

Variáveis	Número de bovinos						
	Amostrados	Positivos		Positivos		Positivos	
		<i>A. marginale</i>		<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Idade (meses)							
6 - 12	105	35	33,33	24	22,8	28	26,66
13 - 24	122	45	36,88	38	31,14	43	35,24
25 - 36	322	119	36,95	159	49,37	141	43,78
37 - 48	97	51	52,57	46	47,42	41	42,26
48 - 60	65	19	29,23	33	50,76	24	36,92
>60	150	74	49,33	67	44,66	43	28,66
Sexo							
Macho	157	53	33,75	60	38,21	55	35,03
Fêmea	704	290	41,19	307	43,60	265	37,64
Raça							
Nelore	35	22	62,85	31	88,57	21	60
Holandês	143	45	31,46	49	34,26	52	36,36
Girolando	43	18	41,86	20	46,51	20	46,51
Pardo-Suíço	19	06	31,57	09	47,36	06	31,57
Mestiço	532	231	43,42	225	42,29	193	36,27
SRD	86	21	24,41	33	38,37	28	32,55
Total	861	343	39,8	367	42,6	320	37

## ECTOPARASITOS

A infestação por carrapatos foi verificada em 15,8% (3/19) das propriedades de Petrolina com um percentual de 16,2% (74/468) de animais infestados, em 84,2% (16/19) das propriedades havia a presença de dípteros hematófagos (tabanídeos e/ou mosca do chifre). Em Ouricuri, 76,9% (10/13) das propriedades apresentavam infestação por carrapato, sendo que 32,3% (127/393) dos animais estavam parasitados, a ocorrência de dípteros hematófagos estava presente em 100% das propriedades visitadas (TABELA 6). Foram coletados 1.678 carrapatos (998 em Petrolina e 680 em Ouricuri), sendo 20 ninfas, 1.349 fêmeas e 309 machos. Todos os carrapatos foram identificados como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

**TABELA 6.** Relação entre a presença de ectoparasitas e presença de área irrigada nas propriedades visitadas em Petrolina e Ouricuri-PE.

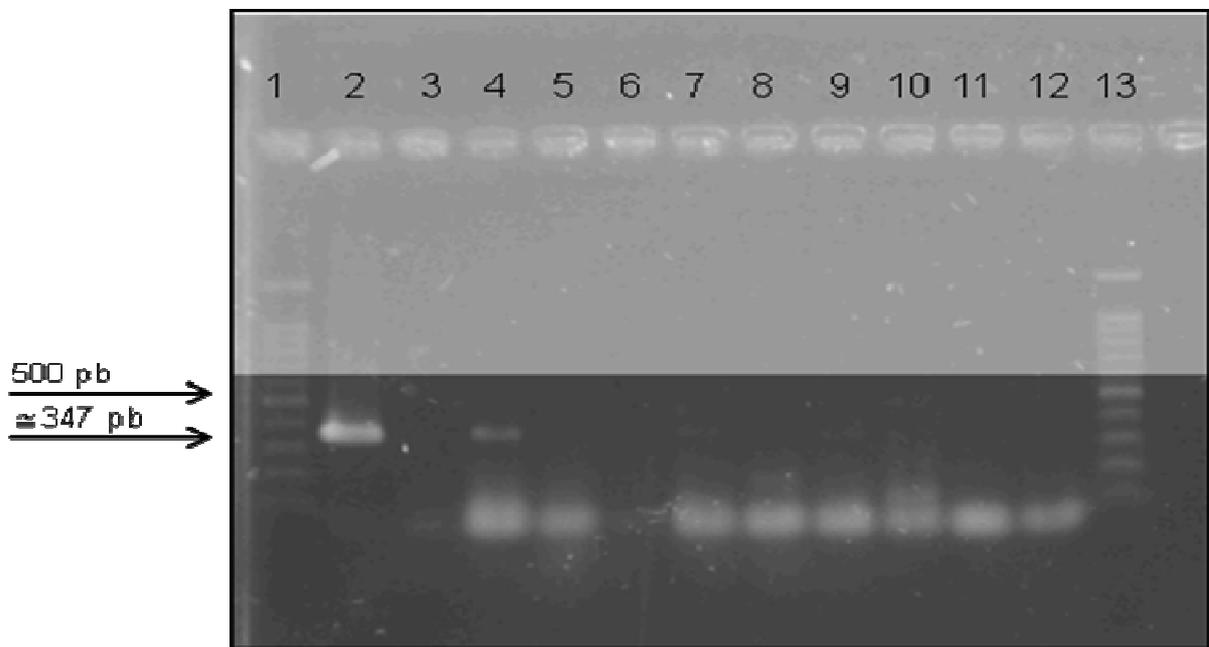
	Nº de propriedades com infestação por carrapato (%)	Nº de propriedades com infestação por dípteros hematófagos (%)	Nº de propriedades com área irrigada (%)
Petrolina	3/19 (15,8%)	16/19 (84,2%)	12/19 (63,1%)
Ouricuri	10/13 (76,92%)	13/13 (100%)	8/13 (61,5%)
Total	13/32 (40,6%)	29/32(90,6%)	20/32 (62,5%)

## PCR

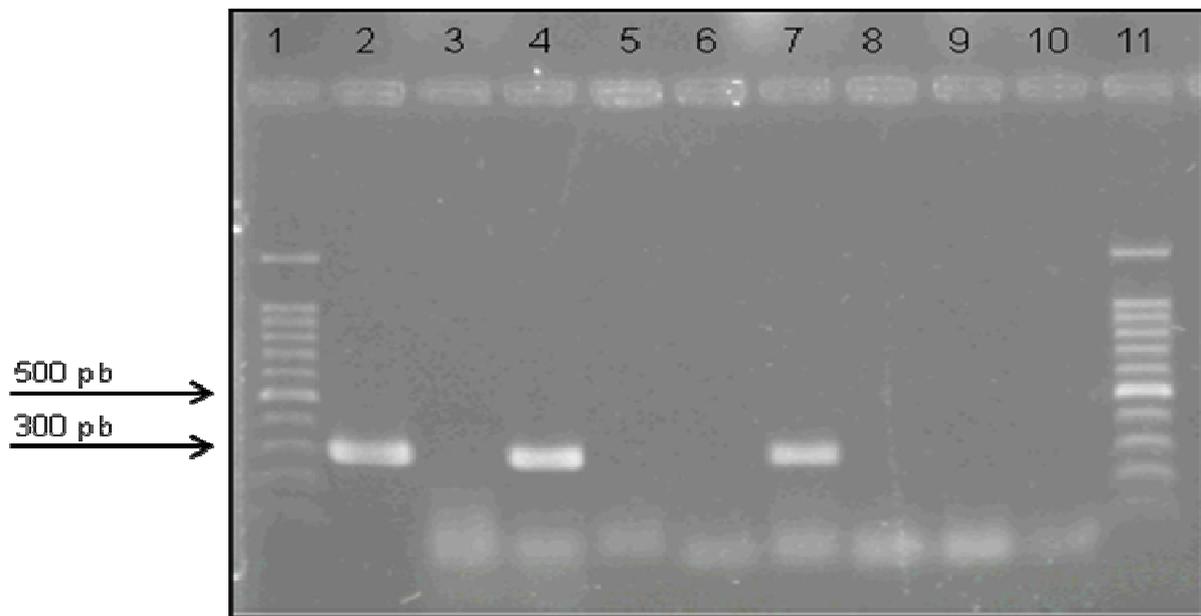
Os resultados obtidos através da PCR (TABELA 7), demonstraram que em 5,8% (8/137) das amostras de carrapatos (2 individuais e 6 “pools”) foi possível detectar infecção por *Babesia* spp., os quais eram provenientes de animais de Petrolina e Ouricuri. Posteriormente, em 62,5% (5/8) destas amostras detectou-se infecção por *B. bovis*. (Figura 3) e as 3 (37,5%) amostras restantes não foi possível realizar a identificação. Para detecção de DNA de *A. marginale* (Figura 4), 23,3% (32/137) das amostras de carrapatos foram positivas, sendo 50% (16/32) provenientes de animais de Petrolina (3 individuais e 13 “pools”) e 50% (16/32) oriundos de animais de Ouricuri (4 individuais e 12 “pools”).

**TABELA 7.** Detecção da infecção por hemoparasitas em carrapatos coletados de animais de Petrolina e Ouricuri, PE através da PCR.

	Nº de amostras testadas	Nº de amostras positivas para <i>Babesia</i> spp. (%)	Nº de amostras positivas para <i>B. bovis</i> (%)	Nº de amostras positivas para <i>B. bigemina</i> (%)	Nº de amostras positivas para <i>A. marginale</i> (%)
Petrolina	47	1 (2,1%)	-	-	16 (34%)
Ouricuri	90	7 (7,8%)	5 (71,4%)	-	16 (17,8%)
Total	137	8 (5,8%)	5 (62,5%)	-	32 (23,3%)



**FIGURA 3.** Amplificação por PCR de DNA de *B. bovis* em amostras de carrapatos. 1 e 13: marcador de peso molecular 100 pares de base (Ludwig biotecnologia); 2: controle positivo para *B. bovis*; 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10: amostras negativas; 4: amostra positiva; 11 e 12: controles negativos.



**FIGURA 4.** Amplificação por PCR de DNA de *A. marginale* em amostras de carrapatos. 1 e 11: marcador de peso molecular 100 pares de base (Ludwig biotecnologia); 2: controle positivo para *A. marginale*; 3, 5, 6 e 8: amostras negativas; 4 e 7: amostras positivas; 9 e 10: controles negativos.

## QUESTIONÁRIO

O inquérito epidemiológico aplicado nas propriedades visitadas demonstrou que em Petrolina a criação semi-intensiva predominou em 57,9% destas, seguida do manejo extensivo (26,3%) e intensivo (15,78%), enquanto que em Ouricuri 100% dos criadores visitados praticavam o manejo do tipo semi-intenso. Dentre as propriedades de Petrolina, 63% possuíam alguma área irrigada, rio ou coleção de água nas adjacências, já em Ouricuri esse número foi equivalente a 61,5%. Em Petrolina, 79% dos criadores faziam controle da população de ectoparasitas, mas somente 21% realizavam mudança de princípio ativo. Em Ouricuri 100% utilizavam carrapaticida, sendo o rodízio de princípio ativo praticado por apenas 38,5% destes, e dentre os mais utilizados, foram citados principalmente a ivermectina e cipermetrina, e com menor frequência o amitraz, deltametrina e fipronil. A prática de realizar quarentena na aquisição de novos animais foi relatada por 15,8% dos criadores de Petrolina, não sendo realizada em nenhuma das propriedades visitadas em Ouricuri. O conhecimento da transmissão de doenças por carrapatos era obtido por 42% e 92% dos criadores de Petrolina e Ouricuri, respectivamente, dos quais

26% e 100% descreveram o histórico de babesiose ou anaplasmosose nas propriedades, com sinais clínicos que incluíam anorexia, apatia, palidez de mucosas, hemoglobinúria e óbito dos animais (TABELA 8).

**TABELA 8.** Caracterização das propriedades de Petrolina e Ouricuri, PE, através das informações obtidas pelo questionário.

Questionário	Petrolina		Ouricuri	
	Nº	(%)	Nº	(%)
Tipo de criação				
Intensiva	3/19	15,8	0/13	0,0
Semi-intensiva	11/19	57,9	13/13	100
Extensiva	5/19	26,3	0/13	0,0
Área irrigada	12/19	63	8/13	61,5
Quarentena	3/19	15,8	0/13	0,0
Utilização de carrapaticida	15/19	79	13/13	100
Rodízio de princípio ativo	4/19	21	5/13	38,5
Conhecimento da Babesiose/Anaplasmosose	8/19	42	12/13	92
Histórico de Babesiose/Anaplasmosose	5/19	26,3	13/13	100

## FATORES DE RISCO

Os parâmetros descritivos por propriedade e por animal estão representados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Dentre as variáveis analisadas para as propriedades através da análise univariável e posteriormente multivariável, foi considerada como fator de risco para babesiose a variável uso de carrapaticida que apresentou associação significativa com a taxa de anticorpos para *Babesia* spp. Para anaplasmosose, a variável presença de carrapatos, apresentou associação com o resultado sorológico para *A. marginale* (TABELA 11).

Com relação às análises feitas por animal, foram considerados como fatores de risco para *B. bigemina* a idade dos animais (13 – 60 meses) e a presença de carrapatos. Já para *B. bovis* os fatores de risco identificados foram a localidade dos

animais, ou seja, habitar no município de Ouricuri, bem como a presença de carrapatos. Para *A. marginale*, a raça dos animais (mestiço e SRD) e a presença de carrapatos foram considerados fatores de risco para infecção por este patógeno (TABELA 12).

**TABELA 9.** Análise univariada das propriedades com a distribuição das variáveis associadas à babesiose e anaplasmosose em Petrolina e Ouricuri, no período de 2011/2012.

Variável	Categoria	Nº total de propriedades	Babesia		Anaplasma	
			Nº de propriedades com positividade > 25% (%)	p	Nº de propriedades com positividade > 25% (%)	p
Município	Ouricuri	13	12 (92,3)	0,629	10 (76,9)	0,450
	Petrolina	19	16 (84,2)		11 (57,9)	
Quarentena	Não	29	25 (86,2)	1,000	19 (65,5)	1,000
	Sim	3	3 (100,0)		2 (66,7)	
Manejo	Intensivo	3	3 (100,0)	0,118*	1 (33,3)	0,418
	Semi-intensivo	24	22 (91,7)		17 (70,8)	
	Extensivo	5	3 (60,0)		3 (60,0)	
Área irrigada	Não	12	10 (83,3)	0,620	10 (83,3)	0,139*
	Sim	20	18 (90,0)		11 (55,0)	
Presença de dípteros hematófagos	Não	3	2 (66,7)	0,340	1 (33,3)	0,266
	Sim	29	26 (89,7)		20 (69,0)	
Presença de carrapato	Não	19	15 (78,9)	0,128*	9 (47,4)	0,011*
	Sim	13	13 (100,0)		12 (92,3)	

\* Variáveis selecionadas para a análise multivariável

**TABELA 9.** Análise univariada das propriedades com a distribuição das variáveis associadas à babesiose e anaplasiose em Petrolina e Ouricuri, no período de 2011/2012 (CONTINUAÇÃO).

Variável	Categoria	Nº total de propriedades	Babesia		Anaplasma	
			Nº de propriedades com positividade > 25% (%)	p	Nº de propriedades com positividade > 25% (%)	p
Freq. infest. carrapato	Sem infestação	19	15 (78,9)		9 (47,4)	
	Alta	5	5 (100,0)		4 (80,0)	
	Moderada	3	3 (100,0)		3 (100,0)	0,059*
	Baixa	5	5 (100,0)	0,372	5 (100,0)	
Uso de carrapaticida	Não	4	2 (50,0)		1 (25,0)	0,106*
	Sim	28	26 (92,9)	0,066*	20 (71,4)	
Rodízio P.A.	Não	23	19 (82,6)		14 (60,9)	0,441
	Sim	9	9 (100,0)	0,303	7 (77,8)	
Conhecimento da doença	Não	12	10 (83,3)		7 (58,3)	0,703
	Sim	20	18 (90,0)	0,620	14 (70,0)	
Hist. da doença	Não	14	11 (78,6)		7 (50,0)	0,142*
	Sim	18	17 (94,4)	0,295	14 (77,8)	0,450

\* Variáveis selecionadas para a análise multivariável

**TABELA 10.** Análise univariada dos animais com a distribuição das variáveis associadas à babesiose e anaplasnose em Petrolina e Ouricuri, no período de 2011/2012.

Variável	Categoria	Nº total de animais	<i>B. bigemina</i>		<i>B. bovis</i>		<i>A. marginale</i>	
			Positivos (%)	p	Positivos (%)	p	Positivos (%)	p
Sexo	Fêmea	704	258 (36,6)		303 (43,0)		289 (41,1)	
	Macho	157	56 (35,7)	0,890	60 (38,2)	0,309	54 (34,4)	0,147*
Raça	CRD	220	91 (41,4)		107 (48,6)		90 (40,9)	
	Mestiço	532	187 (35,2)		219 (41,2)		233 (43,8)	
	SRD	109	36 (33,0)	0,199*	37 (33,9)	0,030*	20 (18,3)	< 0,001*
Idade	Até 12 meses	105	26 (24,8)		24 (22,9)		34 (32,4)	
	13 - 36 meses	444	184 (41,4)		196 (44,1)		166 (37,4)	
	37 - 60 meses	162	62 (38,3)		78 (48,1)		70 (43,2)	
	> 60 meses	150	42 (28,0)	0,001*	65 (43,3)	< 0,001*	73 (48,7)	0,027*
Município	Ouricuri	393	147 (37,4)		213 (54,2)		179 (45,5)	
	Petrolina	468	167 (35,7)	0,652	150 (32,1)	< 0,001*	164 (35,0)	0,002*
Carrapatos	Não	657	208 (31,7)		214 (32,6)		228 (34,7)	
	Sim	204	106 (52,0)	< 0,001*	149 (73,0)	< 0,001*	115 (56,4)	< 0,001*

\* Variáveis selecionadas para a análise multivariável

**TABELA 10.** Análise univariada dos animais com a distribuição das variáveis associadas à babesiose e anaplasmose em Petrolina e Ouricuri, no período de 2011/2012 (CONTINUAÇÃO).

Variável	Categoria	Nº total de animais	<i>B. bigemina</i>		<i>B. bovis</i>		<i>A. marginale</i>	
			Positivos (%)	p	Positivos (%)	p	Positivos (%)	p
Mucosa	Hipocorada	181	54 (29,8)		88 (48,6)		76 (42,0)	
	Normal	678	259 (38,2)		274 (40,4)		267 (39,4)	
	Hipercorada	2	1 (50,0)	0,107*	1 (50,0)	0,136*	0 (0,0)	0,420
Estado geral	Normal	715	265 (37,1)		306 (42,8)		277 (38,7)	
	Ótimo	65	20 (30,8)		29 (44,6)		32 (49,2)	
	Ruim	81	29 (35,8)	0,596	28 (34,6)	0,334	34 (42,0)	0,234
Manejo	Intensivo	102	30 (29,4)		26 (25,5)		17 (16,7)	
	Semi-intensivo	640	238 (37,2)		290 (45,3)		285 (44,5)	
	Extensivo	119	46 (38,7)	0,275	47 (39,5)	0,001*	41 (34,5)	< 0,001*
Área irrigada	Não	515	190 (36,9)		252 (48,9)		240 (46,6)	
	Sim	346	124 (35,8)	0,808	111 (32,1)	< 0,001*	103 (29,8)	< 0,001*
Nº de carrapatos	Sem infestação	658	208 (31,6)		215 (32,7)		229 (34,8)	
	Leve	154	80 (51,9)		117 (76,0)		82 (53,2)	
	Moderada	33	17 (51,9)		19 (57,6)		20 (60,6)	
	Alta	16	9 (56,2)	< 0,001*	12 (75,0)	< 0,001*	12 (75,0)	< 0,001*
Carrapaticida	Não	93	25 (26,9)		16 (17,2)		25 (26,9)	
	Sim	768	289 (37,6)	0,055*	347 (45,2)	< 0,001*	318 (41,4)	0,010*

\* Variáveis seleccionadas para a análise multivariável

**TABELA 11.** Fatores de risco para babesiose e anaplasmosose em propriedades de Petrolina e Ouricuri, PE.

Variável (categoria)	Odds ratio (IC 95%)	p
<b><i>Babesia</i></b>		
Uso de carrapaticida (sim)	13,00 (1,14 - 147,82)	0,039
<b><i>Anaplasma marginale</i></b>		
Presença de carrapatos (sim)	13,33 (1,43 - 123,99)	0,023

**TABELA 12.** Fatores de risco para infecção por *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* em animais de Petrolina e Ouricuri, PE.

Variável (categoria)	Odds ratio (IC 95%)	p
<b><i>Babesia bigemina</i></b>		
Idade (13 - 36 meses)	2,11 (1,30 - 3,45)	0,003
Idade (37 - 60 meses)	1,80 (1,04 - 3,12)	0,037
Carrapatos (sim)	2,25 (1,63 - 3,11)	< 0,001
<b><i>Babesia bovis</i></b>		
Município (Ouricuri)	2,12 (1,58 - 2,84)	< 0,001
Carrapatos (sim)	5,02 (3,52 - 7,16)	< 0,001
<b><i>Anaplasma marginale</i></b>		
Raça (mestiço)	3,56 (2,11 - 5,99)	< 0,001
Raça (SRD)	2,28(1,29 - 4,04)	0,005
Carrapatos (sim)	2,70 (1,91 - 3,82)	< 0,001

## DISCUSSÃO

A visualização de merozoítos de *B. bigemina* e *B. bovis* é facilitada em animais com sinais clínicos da doença, não sendo geralmente detectados em bovinos portadores da infecção, os quais apresentam níveis baixos de parasitemia (JACKSON et al., 2001), o que possivelmente justifica os baixos níveis observados

neste estudo, uma vez que os animais amostrados não apresentavam indícios de doença clínica no momento da visita. De forma similar, na anaplasmose a riquetsia geralmente é detectada no início da infecção através do exame direto, onde até 90% dos eritrócitos podem apresentar-se infectados, ou ainda pode ser detectada em casos crônicos em que os níveis de parasitemia permanecem baixos (KIESER et al., 1990).

Em decorrência da sorologia de animais reativos concomitantemente para *Babesia* spp. e *A. marginale*, é possível demonstrar a existência do complexo Tristeza Parasitária Bovina nos municípios de Petrolina e Ouricuri, PE. As baixas taxas de soroprevalência (frequência de anticorpos abaixo de 75%) para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* verificadas por este trabalho permitem considerar os municípios de Petrolina e Ouricuri como áreas de instabilidade enzoótica para a TPB, constatando-se a existência de um baixo grau de imunidade específica para esses agentes. Nas áreas mais secas do semiárido o carrapato não sobrevive durante o período de seca, mas a TPB pode ocorrer no início do período chuvoso quando bovinos com carrapatos são introduzidos e esses se multiplicam durante este período (COSTA et al., 2009).

Nas áreas de instabilidade enzoótica é importante o conhecimento da condição imunológica dos animais do rebanho, considerando-se a necessidade de um manejo adequado, controle de vetores, vacinação e os riscos no transporte dos animais, uma vez que essa condição pode causar grandes prejuízos aos produtores da região, devido à possibilidade da ocorrência de um grande número de casos clínicos com alta taxa de mortalidade. As altas temperaturas e a baixa precipitação pluviométrica, cobertura vegetal escassa e baixa densidade populacional de hospedeiros vertebrados, o que pode ser observado na região estudada, provavelmente interferem no grau de infestação dos animais, uma vez que o sucesso do parasitismo é dependente de variações climáticas e topográficas, assim como no manejo dos rebanhos (UILEMBERG, 1995; FURLONG et al., 2002)

Nas regiões da Zona da Mata e do Agreste do Nordeste, o desenvolvimento do carrapato é limitado, principalmente pelas condições de umidade, sendo necessários alguns meses com índices de precipitação elevados, após o início do período das chuvas, em março, para que o aumento da umidade no ambiente favoreça o desenvolvimento e a sobrevivência graduais dos estádios da fase não-parasitária do

carrapato. Aliado a isso, as temperaturas mais amenas desse período também contribuem para esse sucesso (FURLONG et al., 2003).

A soroprevalência verificada em Petrolina foi menor, o que pode ser explicado pela menor infestação pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* nos rebanhos, quando comparados aos de Ouricuri. Embora estejam localizadas em uma área quente e seca, as propriedades em Petrolina onde os animais encontravam-se parasitados por carrapato apresentavam em comum o fato de possuírem um lago ou coleção de água nas proximidades, o que garante ao carrapato um habitat favorável para sua sobrevivência.

Os dados históricos de precipitação pluviométrica observados nos últimos 10 anos, entre 2001–2010, nos municípios de Petrolina ( $38,4 \pm 38,9$  mm/mês) e Ouricuri ( $59,4 \pm 55,0$  mm/mês), demonstram que não houve diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ) na média de precipitação pluviométrica entre esses municípios. No entanto, se consideramos a média histórica dos últimos 2 anos, entre 2010–2012, o município de Ouricuri apresentou uma maior precipitação ( $51,9 \pm 40,7$  mm/mês) quando comparada a Petrolina ( $20,5 \pm 22,2$  mm/mês) (SAMPAIO, 1998; MINITAB RELEASE 13, 2000; LAMEPE/ITEP, 2013), o que provavelmente justifica a maior ocorrência de carrapatos nesse município verificada através deste estudo, devido ao fato de o carrapato encontrar melhores condições climáticas para o seu desenvolvimento, em razão da maior umidade. Associado à questão climática, a utilização de carrapaticida em Ouricuri era realizada de forma indiscriminada, uma vez que o controle era realizado sob critério subjetivo do criador, quando ocorria uma infestação elevada, com frequências irregulares, na maioria das vezes sem acompanhamento veterinário e nem um controle estratégico.

Em estudos realizados no sertão paraibano, os resultados encontrados demonstraram áreas de instabilidade enzoótica, ocorrendo surtos de TPB no final da época de chuvas nas áreas de planaltos e serras, em áreas úmidas como as bacias do Rio do Peixe e Rio Piranhas e também em áreas irrigadas, como no município de Patos, em que há a formação de microclimas favoráveis à sobrevivência do carrapato (COSTA et al. 2009; COSTA et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente trabalho diferem dos resultados observados por Berto et al. (2008) que buscaram determinar a frequência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos do município de Paudalho, PE,

onde 76,59% (127/168) e 97,61% (164/168) dos animais foram positivos, respectivamente, para *B. bovis* e para *B. bigemina*, caracterizando a área de estudo como de estabilidade enzoótica para estes patógenos. Os resultados observados também diferem da maioria dos trabalhos realizados em outras regiões do Brasil (BARCI et al., 1994; SOARES et al., 2000; MADRUGA et al., 2000; TRINDADE et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2011), prevalecendo na maior parte destes, áreas de estabilidade enzoótica para estas espécies.

Em um estudo realizado por Araújo et al. (1997) nos municípios de Feira de Santana, Jequié, Ilhéus e Vitória da Conquista no Estado da Bahia a média dos percentuais de bovinos sorologicamente positivos pela RIFI para *B. bovis* foi de 97,2% e de 95,0% para *B. bigemina*, caracterizando as quatro microrregiões como de estabilidade para a babesiose.

Em um estudo mais recente também realizado no Estado da Bahia, nos municípios de Senhor do Bonfim, Euclides da Cunha, Uauá e Juazeiro, uma área estável foi verificada em Senhor do Bonfim e Euclides da Cunha para *B. bovis* que apresentaram 86% e 95,5% de prevalência, respectivamente, e para *B. bigemina* com 90,8% e 91,3%. No entanto, Uauá e Juazeiro foram caracterizadas como áreas instáveis, uma vez que as prevalências foram de 63,7% e 56,4% para *B. bovis* e 53% e 54,8% para *B. bigemina*, respectivamente. Nos quatro municípios, a prevalência de *A. marginale* foi superior a 90%, indicando uma condição de estabilidade enzoótica para Anaplasmosse (BARROS et al., 2005), assim como em outros locais do Brasil (SOUZA et al., 2000; SOUZA et al., 2001). Todavia, de forma semelhante ao presente estudo, instabilidade para *A. marginale* foi observado em outro estado do Nordeste, onde foi obtida prevalência de 16,30% em Sergipe (OLIVEIRA et al., 1992).

Costa et al., (2011) verificaram que os surtos de TPB no sertão paraibano ocorrerem principalmente por anaplasmosse do que por babesiose, fato que pode estar associado às formas de transmissão, uma vez que a anaplasmosse ainda pode ser ainda transmitida por vetores mecânicos, que são comuns em todas as propriedades do sertão no período chuvoso, e essa forma de transmissão possivelmente ainda pode ser potencializada caso haja bovinos sintomáticos com altas parasitemias no rebanho.

A susceptibilidade dos animais pode ser alterada por fatores com idade, raça, estresse ambiental, e, nos primeiros meses de vida pela imunidade passiva conferida pelo colostro de mães imunes. Semelhante ao que vem ocorrendo em outras áreas de instabilidade enzoótica (COSTA et al., 2011) a grande maioria de bovinos afetados são adultos. Geralmente, os casos clínicos são mais graves em bovinos adultos sendo estes mais susceptíveis que os jovens, considerando registrar-se uma resistência maior em bezerros até os seis meses de idade (FURLONG et al., 2005), o que pôde ser verificado nesse experimento, uma vez que os animais adultos foram os que apresentaram maior prevalência de anticorpos para babesiose e anaplasiose, o que provavelmente se deve às condições climáticas da nossa região que não permitem a presença constante do carrapato e com isso, não há transmissão contínua dos agentes da TPB aos bovinos, principalmente em animais jovens, fazendo com que estes não desenvolvam imunidade específica adequada e tornem-se adultos sensíveis.

Em um estudo conduzido por D'Andrea et al. (2006) com bovinos das raças Holandesa (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*) no Estado de São Paulo, observou-se situação de estabilidade enzoótica para raça Holandesa, enquanto que para a raça Nelore a situação observada foi de instabilidade. De acordo com Jonsson et al. (2008) os animais das raças *Bos taurus* são mais sensíveis aos carrapatos e assim, são mais expostos às hemoparasitoses, desenvolvendo com mais facilidade imunidade aos patógenos, enquanto o gado zebu *Bos indicus* é, naturalmente, mais resistente, corroborando com Costa et al. (2011) que constataram através do seu trabalho que os animais mais afetados foram os bovinos *Bos taurus* das raças Holandês, Pardo-Suíço e suas cruzas com animais da raça Gir. Resultado distinto foi observado no presente estudo onde os animais zebuínos da raça Nelore foram os que apresentaram maior soroprevalência, logo foram os mais afetados.

As técnicas moleculares, dentre elas a PCR, apresentam maior sensibilidade e especificidade quando comparadas há outros métodos de diagnóstico, como os testes sorológicos e o exame direto através do esfregaço sanguíneo. Através da pesquisa do DNA do agente, a PCR demonstra que os animais positivos realmente estão infectados pelo parasita, independentemente da fase da doença (COSSÍO-BAYÚGAR et al., 1997).

Os pares de oligonucleotídeos utilizados neste estudo para a realização da PCR foram designados como sendo específicos para o gênero *Babesia* (ALMEIDA, 2011), assim como os demais oligonucleotídeos utilizados para detecção de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* que foram desenhados para esta finalidade (COSTA et al., 2013). A detecção da infecção por *Babesia* spp. foi possível em 8/137 amostras analisadas, que posteriormente foram testadas, e em 5/8 identificou-se que a infecção ocorrera por *B. bovis*. Nas demais amostras (3/8), não foi possível detectar a espécie envolvida, possivelmente devido à quantidade insuficiente de DNA nas amostras, e/ou por ter ocorrido a desnaturação do DNA presente nestas amostras ao longo dos testes realizados.

Informações sobre a epidemiologia de doenças transmitidas por carrapatos, especialmente sobre a dinâmica de transmissão da infecção por este vetor, é essencial para elaboração de eficientes estratégias de controle (MORZARIA et al., 1992). No Brasil, escassos estudos têm sido realizados utilizando carrapatos na detecção da infecção por *Babesia* spp. e *A. marginale*, e principalmente na região do semiárido nordestino pouco se conhece a respeito dos aspectos da infecção por esses hemoparasitas em carrapatos. No entanto, estudos epidemiológicos em diversos países já estão utilizando comumente essa prática (ICA et al., 2007; M'GHIRBI & BOUATTOUR, 2008; MAJLÁTHOVÁ et al., 2011).

Ica et al. (2007) objetivando identificar através da PCR a infecção por *Babesia* e *Theileira* em carrapatos de bovinos na Turquia, observaram que dos 43 "pools" de carrapatos examinados, seis (14%) estavam infectados com *B. bigemina*, 4 (9,3%) com *T. annulata*, e 1 (2,3%) com *Babesia* spp., enquanto 1 (2,3%) apresentou infecção mista com *T. annulata* + *B. bigemina*.

Visando detectar as espécies de *Babesia* infectando carrapatos de bovinos no Irã por meio da PCR, Tavassoli et al. (2013) detectou que *Rhipicephalus* spp. pode desempenhar um papel importante na transmissão da infecção de *Babesia* spp. em bovinos no oeste e noroeste do Irã.

Oliveira-Sequeira et al. (2005) utilizando a PCR e nested-PCR para avaliar a frequência de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* em fêmeas ingurgitadas e ovos de *Boophilus microplus* em bezerros e vacas naturalmente infestados criados em uma área endêmica para babesiose em São Paulo, verificou que embora a frequência de ambas espécies de *Babesia* tenha sido semelhante em bezerros e vacas, a

infectividade de *B. bigemina* foi maior para os carrapatos alimentados em bezerros do que aqueles alimentados em vacas, onde a infectividade de ambas as espécies de *Babesia* foi semelhante, diferente do que foi observado nesta pesquisa, uma vez que detectou-se apenas a infecção por *B. bovis*.

Os carrapatos individuais infectados por *Babesia* spp. testados no presente estudo, eram provenientes de animais com sorologia negativa para esse patógeno, e daqueles positivos para *A. marginale*, a minoria (2/7) era proveniente de animais com sorologia negativa, o que possivelmente, deve-se ao fato do diagnóstico pela RIFI ser comprometido na fase inicial da doença, uma vez que o parasita aparece no sangue antes que haja um nível detectável de anticorpos, ou provavelmente estes carrapatos foram coletados dos animais antes que ocorresse a inoculação do agente por esse vetor, sendo necessário um tempo de repasto sanguíneo para que a transmissão aconteça.

A falta de soroconversão, provavelmente implica na ocorrência de resultados negativos na RIFI com carrapatos positivos a PCR simultaneamente, não sendo indicativo de que os animais estejam livres da infecção, todavia, animais soropositivos que foram parasitados por carrapatos também positivos a PCR apresentam maior probabilidade de estarem infectados com esses agentes, sendo necessário, portanto, a realização da PCR da amostra de sangue desses animais.

A presença de carrapatos e o uso de carrapaticidas, detectados neste estudo como fatores de risco para ocorrência de babesiose e anaplasiose em propriedades de Petrolina e Ouricuri, demonstram que a utilização indiscriminada dos carrapaticidas, além de favorecer ao aumento dos gastos, promove à seleção e proliferação de populações de carrapatos resistentes às bases químicas disponíveis, além da poluição ambiental e da elevada quantidade de resíduos nos produtos derivados dos animais tratados (FURLONG et al., 2003). O controle intensivo de carrapatos reduz ainda o contato dos animais com os vetores, favorecendo o aparecimento de áreas de instabilidade endêmica para os agentes dessa enfermidade (GUGLIELMONE, 1995; BOCK et al., 2004).

É importante lembrar que uma vez instalada a resistência em uma população de carrapatos a um determinado carrapaticida, esta resistência também estará instalada para os carrapaticidas pertencentes a este grupo. A resistência desenvolvida nas populações é uma condição permanente, e inviabiliza a utilização

futura do grupo químico no rebanho de uma propriedade. A única exceção a este fato é feita ao grupo das Amidinas, que após alguns anos sem serem utilizadas numa propriedade, é possível a reversão da resistência, com a possibilidade de novo uso dentro do manejo dos animais da propriedade (BRITO et al., 2006).

Dentre as variáveis associadas aos animais, a presença de carrapato foi considerada fator de risco para infecção por *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, o que é importante principalmente no município de Ouricuri, dada a presença de carrapatos nas propriedades ser mais frequente do que em Petrolina, e o que pode ser evidenciado pela maior soroprevalência para os três patógenos observada nos animais deste município. A idade (entre 13–60 meses) foi considerada fator de risco para ocorrência da infecção por *B. bigemina*, demonstrando que os animais adultos dessa região são mais sensíveis a infecção por este patógeno. A raça (animais mestiços e SRD) foi considerada um fator de risco associado à infecção por *A. marginale*, uma vez que não se conhece origem destas cruzas. Residir no município de Ouricuri foi considerado um fator de risco para ocorrência da infecção por *B. bovis*, assumindo que *B. bovis* é mais patogênica que *B. bigemina*, surtos de babesiose por *B. bovis*, poderão ocorrer nos animais naturais ou de áreas indenes transportados para essa região, principalmente para o município de Ouricuri.

Guimarães et al. (2011) analisando a soroprevalência e os fatores de risco associados à infecção por *B. bovis* em rebanhos leiteiros de alta e de baixa produção da microrregião de Lavras - MG, não encontrou associação significativa entre os fatores de risco analisados (o tamanho da propriedade, o sistema de criação, o grupo racial e o tipo de alimentação dos animais) com a taxa de anticorpos anti-*B. bovis*, o que, de acordo com os autores, deve-se provavelmente a elevada soroprevalência média observada em ambos os grupos estudados, que ficou acima de 90%.

Em outro estudo, realizado por Solorio-Rivera et al. (1999), no México, avaliando o efeito das práticas de manejo sobre a prevalência de bovinos soropositivos para *B. bovis*, observaram a densidade animal (<1cabeça/ha) e intervalo de banho carrapaticida (>60 dias) como fatores de risco ( $p > 0,05$ ) associados com a taxa de bovinos reagentes, e fatores de risco como tipo de fazenda, sistema de produção, tamanho do rebanho, entre outros avaliados, não apresentaram associação com a prevalência de bovinos soropositivos para *B. bovis*.

## CONCLUSÃO

A investigação epidemiológica da infecção por *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis* nos bovinos dos municípios de Petrolina e Ouricuri possibilitou confirmar a presença desses agentes e considerar que a babesiose e anaplasmose ocorrem sob a forma de instabilidade enzoótica nessas regiões, o que pode predispor a ocorrência de surtos de TPB nos municípios estudados;

O município de Ouricuri, localizado na mesorregião do Sertão Pernambucano, apresentou uma frequência de infestação por carrapatos maior que a verificada no município de Petrolina, localizado na região do São Francisco, devido à presença de condições favoráveis ao desenvolvimento dos carrapatos;

O uso de carrapaticida, a presença de carrapatos, a idade, a raça e o município de residência dos animais foram considerados fatores de risco para ocorrência da TPB na região.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos proprietários e funcionários das propriedades de Petrolina e Ouricuri, PE, pela oportunidade de desenvolvimento deste estudo, bem como a todos que ajudaram direta e indiretamente, assim como à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa processo APQ 1174-5.05/10; e pela bolsa de pós-graduação processo IBPG-0095-5.05/11.

## REFERÊNCIAS

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.59, p.115-129, 1961.

ARAÚJO, E. R.; MADRUGA, C. R.; ALMEIDA, M. A. O.; LEAL, C. R. B.; MIGUITA, M. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de conglutinação rápida. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, p.111-115, 1997.

ALMEIDA, A. P. Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo. Dissertação (Mestrado Epidemiologia Experimental Aplicada)-Universidade de São Paulo, São Paulo. 80 f. 2011.

ADAGRO (Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco. Relatório de rebanho. Regional de Petrolina, 2012.

BARCI, L.A.G., OLIVEIRA, M.R., MACHADO, R.Z., OLIVEIRA, D.A., ARAÚJO FILHO, R.S. Epidemiologia da babesiose bovina no Estado de São Paulo: I. Estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do município de Pindamonhagaba, Vale do Paraíba. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.3, p.79-82, 1994.

BÖSE, R., JORGENSEN, W.K., DALGLIESH, R.J., FRIEDHOFF, K.T., DE VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 61-74, 1995.

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

BARROS, S.L., MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., MENK, C.F., DE ALMEIDA, M.A., MELO, E..P, KESSLER, R.H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 613-617, 2005.

BRITO L.G., NETTO F.G.S., OLIVEIRA M.C.S., BARBIERI F.S. Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplu*. Porto Velho : Embrapa Rondonia, 21 p., 2006.

BERTO, R.S., FAUSTINO, M.A.G., MELO, L.E.H., ALVES, L.C., MADRUGA, C.R., ALMEIDA, M.A.O., RAMOS, C.A.N., TENÓRIO, T.G.S., SILVA, F.F. Frequência de anticorpos IgG anti - *Babesia bovis* e anti - *Babesia bigemina* em bovinos no Município do Paudalho, Zona da Mata do Estado de Pernambuco. **Medicina Veterinária**, Recife, v.2, p.9-12, 2008.

COSSÍO-BAYÚGAR , R., RODRÍGUEZ, S.D., GARCÍA-ORTIZ, M.A., GARCÍA-TAPIA, D., ABOYTES-TORRES, R. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 32, p. 165-70, 1997.

COSTA-JÚNIOR, L.M., RABELO, E.M., MARTINS FILHO, O.A., RIBEIRO, M.F. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 231-236, 2006.

COSTA, V.M.M., SIMÕES, S.V.D., RIET-CORREA, F. Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, p. 563-568, 2009.

COSTA V.M.M, RODRIGUES A.L., MEDEIROS J.M.A. et al. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, p. 239-243, 2011.

COSTA, V.M.M. Estudo epidemiológico da Tristeza Parasitária Bovina no estado da Paraíba. [Tese] Patos: Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, 2013.

DREHER, U.M., HOFMANN-LEHMANN, R., MELI, M.L., REGULA, G., CAGIENARD, A.Y., STÄRK, K.D., DOHERR, M.G., FILLI, F., HÄSSIG, M., BRAUN, U., KOCAN, K.M., LUTZ, H. Seroprevalence of anaplasmoses among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. **Veterinary Microbiology**, 2005.

D'ANDREA, L.A.Z., SARTOR, I.F., MADRUGA, C.R., FREITAS, S.B.Z., KROLL, L.B., KRONKA, S.N. Condição imunológica de bovinos das raças Holandesa e Nelore frente a *Babesia bovis* e *B. bigemina* em duas regiões do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, p. 74-78, 2006.

FURLONG, J., CHAGAS, A.C.S., NASCIMENTO, C.B. Comportamento e ecologia de larvas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.39, p. 213-217, 2002.

FURLONG J., MARTINS J.R.S., PRATA M.C.A. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite (Comunicado Técnico 36), 6 p., 2003.

FURLONG, J. MARTINS J.R.S., PRATA M.C.A. Carrapatos: problemas e soluções. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 65 p., 2005.

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

GUIMARÃES, M.A., CARVALHO, A.H.O., DAHER, D.O., ROCHA, C.M.B.M., HIRSCH, C. Soroprevalência e fatores de risco para *Babesia bovis* em rebanhos leiteiros na região sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 826-832., 2011.

HORTA, M.C.; LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; LINARDI, P.M.; SCHUMAKER, T.T.S. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 02, p.793-801, 2007.

IICA. Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina: **San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura**, pag. 79, 1987.

ICA, A., VATANSEVER, Z., YILDIRIM, A., DUZLU, O., INCI, A. Detection of *Theileria* and *Babesia* species in ticks collected from cattle. **Veterinary Parasitology**, 2007.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Produção da pecuária municipal 2010**. Rio de Janeiro, v. 38, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>Acessado em: 13 out. 2012.

JACKSON, L.A., WALDRON SJ, WEIER HM, NICOLL CL, COOKE BM. *Babesia bovis*: Culture of laboratory adapted parasite lines and clinical isolates in a chemically defined medium. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 168-174, 2001.

JONSSON, N.N.; BOCK, R.E.; JORGENSEN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses , and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.1-9, 2008.

LAMEPE/ITEP. Disponível em:

<[http://www.itep.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=102&Itemid=162](http://www.itep.br/index.php?option=com_content&view=article&id=102&Itemid=162)> Acessado em: 23 mai. 2013.

KIESER, S.T., ERIKS, I.E., PALMER, G.H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Infection and Immunity**, v. 58, p.1117–1119, 1990.

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

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

MORZARIA, S., KATENDE, J., KAIRO, A., NENE, V., MUSOKE, A. New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 201-205, 1992.

MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., MARQUES, A.P.C., CARVALHO, C.M.E., CUSINATO, F.Q., CROCCI, A.J., KESSLER, R.H., MIGUITA, M. Desenvolvimento de uma prova de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, p.167-170, 2000.

MINITAB. **The student edition of MINITAB statistical software adapted for education: 13.0 release; user's manual**. New York: Wesley, 624 p., 2000.

M'GHIRBI, Y.; BOUATTOUR, A. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p.1-7, 2008.

MAJLÁTHOVÁ, V.; MAJLÁTH, I.; VICHOVÁ, B.; GUL'OVÁ, I.; DERDÁKOVÁ, M.; SESZTÁKOVÁ, E.; PET'KO, B. Polymerase chain reaction Confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in Dogs Suspected of Babesiosis in Slovakia. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**. v.11, p. 1447-51, 2011.

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

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., OLIVEIRA, M.C.S., ARAUJO JR., J.P., AMARANTE, A.F.T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**. v 35, p. 105-111, 2005.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 221 p., 1998.

SOLORIO-RIVERA, J.L. et al. Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalence in cattle from eastern Yucatán, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v.40, p.261-269, 1999.

SOUZA J.C.P., SOARES, C.O., MASSARD, C.L., SCOFIELD, A., FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, p. 97-101, 2000.

SOARES, C.O., SOUZA, J.C.P., MADRUGA, C.R., MADUREIRA, R.C. , MASSARD, C.L., FONSECA, A.H. Seroprevalence of *Babesia bovis* in cattle in the Norte Fluminense region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, p.75 79, 2000.

SOUZA, J.C.P., SOARES, C.O., MADRUGA, C.R., MASSARD, C.L. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do Médio Paraíba. **Ciência Veterinária Brasileira**, v.31, p. 31, 309-314, 2001.

TRINDADE, H.I., SILVA, G.R.A., TEIXEIRA, M.C.A., SOUSA, M.G., MACHADO, R.Z., FREITAS, F.L.C., ALMEIDA, K.S. Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguaína, State of Tocantins, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, p.169-173, 2010.

TAVASSOLI, M., TABATABAEI, M., MOHAMMADI, M., ESMAEILNEJAD, B., MOHAMADPOUR, H. PCR-based Detection of *Babesia* spp. Infection in Collected Ticks from Cattle in West and North-West of Iran. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, 2013.

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

## APÊNDICE

### APÊNDICE A. Prancha de figuras.



**FIGURA 5.** Propriedade com sistema de criação extensivo, com coleção de água e presença de carrapatos em Petrolina, PE.



**FIGURA 6.** Propriedade com sistema de criação semi-intensivo, com coleção de água e presença de carrapatos, Petrolina, PE.



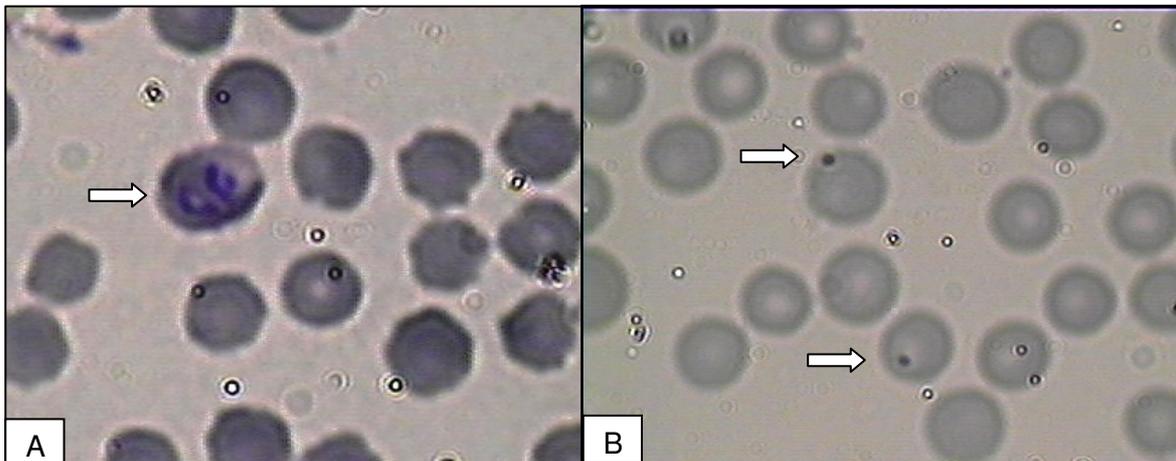
**FIGURA 7.** Propriedade com sistema de criação semi-intensivo, com coleção de água e presença de carrapatos, Petrolina, PE.



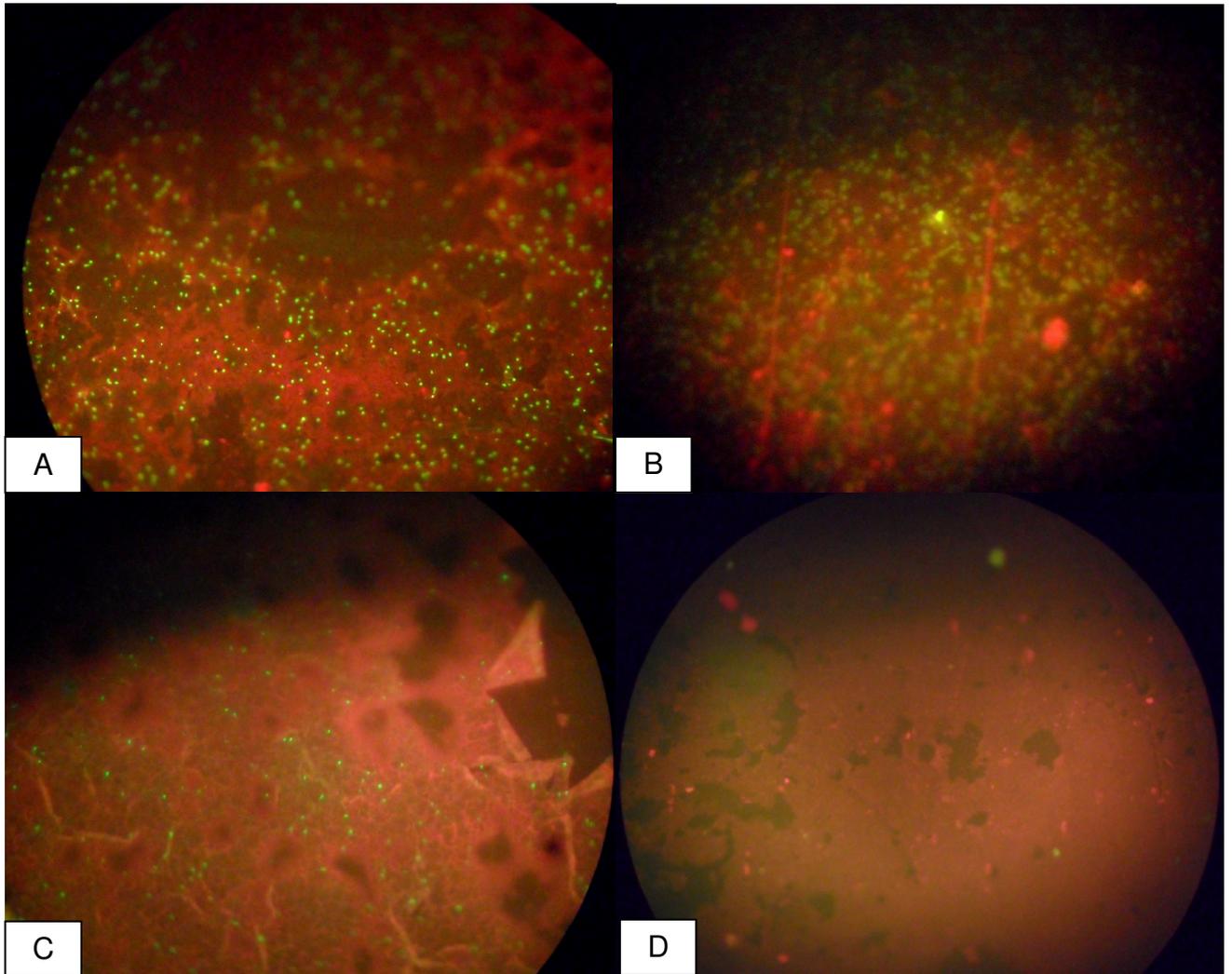
**FIGURA 8.** Propriedade com sistema de criação intensivo, sem a presença de carrapatos, Petrolina, PE.



**FIGURA 9.** Bovino da raça Holandês apresentando infestação por carrapatos (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*).



**FIGURA 10.** A - Trofozoíto de *B. bigemina* em eritrócito observado em esfregaço de sangue periférico de bovino naturalmente infectado. B - Corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* observados em esfregaço de sangue periférico de bovino naturalmente infectado. Panótico. Aumento: 100X.



**FIGURA 11.** Reação de imunofluorescência indireta. Formas de *B. bovis* (A), *B. bigemina* (B) e *A. marginale* (C) marcadas por isoticianato de fluoresceína, demonstrando reatividade 1:40. Reação negativa de imunofluorescência indireta (D). Aumento: 20X.

APÊNDICE B. Modelo da ficha de inquérito epidemiológico aplicado durante visita às propriedades de Petrolina e Ouricuri-PE.



**Universidade Federal do Vale do São Francisco**  
**Campus de Ciências Agrárias da UNIVASF**  
**Colegiado Acadêmico de Medicina Veterinária**



### Questionário Sanitário

#### **1. Dados da propriedade:**

1.1 Propriedade: \_\_\_\_\_ 1.2. Data da visita: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

1.3 Proprietário: \_\_\_\_\_

1.4 Endereço: \_\_\_\_\_

1.5 Coordenadas: LAT: \_\_\_\_\_ LONG: \_\_\_\_\_ ALT: \_\_\_\_\_

1.6. Cidade: \_\_\_\_\_ 1.7. Fone: \_\_\_\_\_

#### **2. Características da propriedade:**

2.1 Quantidade de bovinos: \_\_\_\_\_

2.2 Tipo de exploração: \_\_\_\_\_

2.3 Área irrigada? ( ) Sim ( ) Não      2.4 Alguma lagoa/riacho? ( ) Sim ( ) Não

2.5 Período chuvoso: \_\_\_\_\_ 2.6: Período seco: \_\_\_\_\_

2.7 Tipo de Manejo: ( ) Intensivo ( ) Extensivo ( ) Semi-intensivo

2.8 Tipo de dieta: ( ) Pasto nativo ( ) Pasto melhorado ( ) Feno ( ) Silagem

( ) Concentrado ( ) Outras: \_\_\_\_\_

2.9 Cultiva Pasto? ( ) Sim ( ) Não Qual(is)? \_\_\_\_\_

2.10 Faz rotação de pastagem? ( ) Sim ( ) Não Quanto tempo/pasto? \_\_\_\_\_

2.11 Faz quarentena ao adquirir um animal novo para a propriedade? \_\_\_\_\_

**3. Sanidade:**

3.1 Vacinação? ( ) Sim ( ) Não

3.2 Quais? ( ) Aftosa ( ) Brucelose ( ) Carbúnculo ( ) Raiva ( ) Leptospirose ( ) Tétano

Outras \_\_\_\_\_

3.3 Vermifugação? ( ) Sim ( ) Não

3.4 Quais vermífugos? \_\_\_\_\_

3.5 Frequência: \_\_\_\_\_ 3.6 Última vermifugação: \_\_\_\_\_

3.6 Presença de carrapatos: ( ) Sim ( ) Não

3.7 Presença de moscas: ( ) Sim ( ) Não

3.8 Em que meses? \_\_\_\_\_ 3.9 Período: ( ) seca ( ) chuvas

3.9 Usa carrapaticida? ( ) Sim ( ) Não 3.10 Qual? \_\_\_\_\_

3.10 Forma de utilização: \_\_\_\_\_

3.11 Faz rodízio de principio ativo? ( ) Sim ( ) Não 3.13 Periodicidade? \_\_\_\_\_

3.12 Conhecimento sobre alguma doença que o carrapato pode transmitir? \_\_\_\_\_

3.13. Doenças relatadas na propriedade: \_\_\_\_\_

3.14 Algum óbito nos últimos 12 meses? ( ) Sim ( ) Não 3.15: Causa? \_\_\_\_\_

3.15 Histórico de sinais clínicos da TPB? ( ) Sim ( ) Não

3.16 Quais os sinais? \_\_\_\_\_

3.17 Animal tratado? ( ) Sim ( ) Não 3.18 Tratamento? \_\_\_\_\_

3.18 Óbito por TPB? ( ) Sim ( ) Não

3.19 O rebanho recebe assistência de algum médico veterinário? ( ) Sim ( ) Não