

Gustavo Góes Cavalcante

Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por
Babesia bovis, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em
bezerros da raça Nelore no Estado de São Paulo.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus
de Botucatu como requisito para a obtenção
do título de Doutor em Medicina Veterinária-
Área de Clínica Veterinária.

Botucatu- SP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Cavalcante, Gustavo Góes.

Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por *Babesia bovis*
Babesia bigemina e *Anaplasma marginale* em bezerros da raça Nelore no
Estado de São Paulo / Gustavo Góes Cavalcante. -- Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007

Orientadora: Teresa Cristina Goulart de Oliveira Sequeira

Assunto CAPES: 50502042

1. Bovino - Doenças -Epidemiologia - São Paulo 2. Babesiose em
bovino

CDD 636.20896

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*; *Babesia bigemina*; *Babesia bovis*;
Boophilus microplus; Epidemiologia

Dedico essa obra a toda a minha família,
especialmente a meus pais José Carlos Cavalcante e
Heliana Góes Cavalcante, ao meu irmão Thiago G. Cavalcante e
com todo o meu amor à Déborah Costa de Oliveira.

Agradecimentos

Nesse momento muito especial, agradeço primeiramente a DEUS e a Nosso Senhor Jesus Cristo, pela maravilhosa família que fui presenteado, pela saúde que nunca me faltou e pela Fé que me sustentou até aqui, me consolando nas horas difíceis e me fortalecendo quando fraquejei.

À Prof^ª. Dr^ª. Teresa Cristina G. de Oliveira Sequeira por quem sinto uma grande admiração, pela atenção, amizade e dedicação dispensada nesses quatro anos de convivência. Por ter entendido minhas dificuldades, e especialmente por me ensinar com atitudes e palavras que a ética e a responsabilidade são características essenciais em qualquer profissional.

À Prof^ª. Dr^ª. Lucia Helena O'Dywer, por quem eu tenho grande amizade, pelas palavras dispensadas e pelas 'dicas' de quem tem um pouquinho mais de experiência.

Ao Dr. Cláudio Roberto Madruga, que sempre me ajudou desde o mestrado, pela amizade e realização dos exames sorológicos.

À Profa. Dra. Regina Takahira e à colega Andreza Inaba, pela disponibilização da estrutura do Laboratório de Patologia Clínica da FMVZ e pela realização dos hemogramas dos bezerros.

Aos funcionários responsáveis pelo manejo do rebanho da Fazenda São Manoel/ UNESP, em especial ao Sr. João Ratti JR. (Chumaço), Sr. Ivo Donizette de Brito e Sr. José Carlos Moro, pela atenção e cuidado com os animais experimentais e a disponibilidade a mim dispensada nas inúmeras visitas à propriedade.

Ao querido casal de amigos Ary e Renata Carneiro, que pela amizade, conselhos e idéias, foram como irmãos mais velhos na ausência dos pais.

Aos meus amigos do peito (velha-guarda), Christianne Wienkowsky e Milena Brant, que pela amizade (logo de cara) e carinho sempre recarregaram minhas energias quando tudo estava muito difícil.

Aos GRANDES amigos Jayme Neto, Nelson Marra e Rogério Sena (Sabão), que juntos formamos a “The worms”, pela amizade, companheirismo, força e inúmeros momentos de Rock n’ Roll na veia.

Aos meus amigos Carla Moraes, Cristina Haanwickel e Antonio Fialho (Bob), que me receberam assim que cheguei em Botucatu e me proporcionaram momentos inesquecíveis na nossa incrível convivência.

Aos meus estimados amigos pós-graduandos do Departamento de Parasitologia, Adriano Rubini, Alberto Wagner, Aline Angella, Bianca Cechetto, Diego Alonso, Ellen Cruz, Letícia Finks, Karina Paduan, Karina Rodrigues, Marcela Carneiro, Marco Rossellini (xabi) e Satie Katagiri, pela amizade e intermináveis momentos de descontração.

Aos queridos amigos que fiz na UNESP, Luis Justulin, Ana Carolina Luchinni, Douglas e Fabiane Missuma, pela amizade e por todos os momentos de farra.

Aos Profs. Alessandro Amarante, Luciene Mascarini, Newton Madeira, Paulo Ribolla, Reinaldo da Silva, Semíramis Guimarães, Wesley Godoy e aos funcionários Ângela, Márcia, Nilza, Roberto (bicho) e Valdir, que fazem o Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências de Botucatu.

À todos os meus colegas e professores do curso de pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu.

À Universidade Federal do Pará e ao Colegiado do Curso de Medicina Veterinária, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Leônidas Olegário e posteriormente Prof. Dr. Stefano Tavares de Andrade, pela confiança dispensada durante o período de finalização desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
pela bolsa de estudos concedida.

MUITO OBRIGADO!!!

Impossível é uma palavra usada por gente fraca
que prefere viver no mundo como está
à arriscar mudá-lo. Tem medo do que vem pela frente e
desiste diante da primeira dificuldade.

Sumário

	Página
Resumo	12
Abstract	14
1. Introdução	16
2. Revisão de Literatura	18
2.1 Babesioses Bovinas.....	18
2.2 Anaplasnose Bovina.....	32
3. Objetivos	44
4. Material e Métodos	45
4.1. Laboratórios.....	45
4.2. Animais Experimentais.....	45
4.3. Exame físico e colheita de amostras.....	47
4.4. Processamento das amostras de sangue	48
4.5. Processamento das amostras de <i>Boophilus microplus</i>	49
4.6. Pesquisa de DNA de <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>Anaplasma marginale</i> ...	49
4.6.1. Extração de DNA das amostras de sangue.....	49
4.6.2. Extração de DNA das fêmeas de <i>Boophilus microplus</i>	51
4.6.3. Reações de PCR.....	51
4.6.4. Reações de Nested-PCR (nPCR).....	53
4.7. Ensaio de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA-I).....	55
5. Resultados	56
5.1. Parâmetros Clínicos e Hematológicos.....	56
5.1.1. Contagem de Eritrócitos.....	56
5.1.2. Concentração de hemoglobina.....	58
5.1.3. Volume Globular.....	60
5.1.4. Contagem total de Leucócitos.....	62
5.2. Freqüência de infecções por <i>Babesia bovis</i>	64
5.3. Freqüência de infecções por <i>Babesia bigemina</i>	64
5.4. Freqüência de infecções por <i>Anaplasma marginale</i>	65
5.5. Pesagem dos bezerros.....	77
5.6. População de <i>Boophilus microplus</i>	78

5.7. Freqüência de infecções por <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>Anaplasma marginale</i> em teleóginas de <i>Boophilus microplus</i>	79
6. Discussão	80
7. Conclusões	100
8. Referências Bibliográficas	102

Lista de Figuras

Figura 1	Bezerros que integram o rebanho Nelore mantido na Fazenda São Manuel/ UNESP, localizada no município de São Manuel-SP.....	46
Figura 2	Merozoítas de <i>Babesia bigemina</i> (seta) em esfregaço de sangue corado por Giemsa.....	58
Figura 3	Corpúsculos intra-eritrocitários de <i>Anaplasma marginale</i> (setas) em esfregaço de sangue corado por Giemsa.....	58
Figura 4	Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de <i>Babesia bigemina</i> pelas técnicas de PCR e nPCR (canaletas 1 e 2), amostra PCR negativa (canaleta 3); amostra nPCR negativa (canaleta 4); e controle PCR/nPCR negativo (canaletas 5 e 6).....	64
Figura 5	Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de <i>Babesia bovis</i> pelas técnicas de PCR e nPCR (canaletas 3 e 4), amostra PCR negativa (canaleta 1); amostra nPCR negativa (canaleta 2); e controle PCR/nPCR negativo (canaletas 5 e 6).....	64
Figura 6	Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de <i>Anaplasma marginale</i> pelas técnicas de PCR e nPCR (canaletas 1 e 2), amostra negativa (canaleta 3); controle negativo (canaleta 4).....	68
Figura 7	Evolução do peso em função da idade de bezerros da raça Nelore criados no município de São Manuel-SP.....	70
Figura 8	Número de bezerros Nelore parasitados por <i>Boophilus microplus</i> ao longo de ano, criados no município de São Manoel, SP.....	79

Lista de Quadros

- Quadro 1** Seqüências iniciadoras externas (“primers”) para amplificação de DNA de *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale*. 52
- Quadro 2** Seqüências iniciadoras internas (“primers”) para amplificação de DNA de *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale*. 54

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Idade mínima e máxima de 17 bezerros da raça Nelore em função dos meses em que foram realizados os exames físicos e as colheitas das amostras, no município de São Manuel, SP.....	47
Tabela 2:	Detecção de DNA de <i>Babesia bovis</i> pelos métodos de PCR e nPCR em amostras de sangue de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.....	59
Tabela 3:	Detecção de anticorpos anti- <i>Babesia bovis</i> pelo método de ELISA-I em amostras de soro de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.....	60
Tabela 4:	Parasitemia (%) de <i>Babesia bigemina</i> em função da idade de 17 bezerros da raça Nelore naturalmente infectados, no município de São Manuel, SP.....	57
Tabela 5:	Detecção de DNA de <i>Babesia bigemina</i> pelos métodos de PCR e nPCR em amostras de sangue de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.....	61
Tabela 6:	Detecção de anticorpos anti- <i>Babesia bigemina</i> pelo método de ELISA-I em amostras de soro de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.....	62
Tabela 7:	Parasitemia (%) de <i>Anaplasma marginale</i> em 17 bezerros da raça Nelore, naturalmente infectados, no município de São Manuel, SP.....	65
Tabela 8:	Detecção de DNA de <i>Anaplasma marginale</i> pelos métodos de PCR e nPCR em amostras de sangue de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.....	66
Tabela 9:	Detecção de anticorpos anti- <i>Anaplasma marginale</i> pelo método de ELISA-I em amostras de soro de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.....	67
Tabela 10:	Valores médios e desvios-padrão do número de eritrócitos em amostras de sangue negativas para hemoparasitas em função da idade de 17 bezerros da raça Nelore, no município de São Manuel, SP.....	71
Tabela 11:	Idade, contagem total de eritrócitos e parasitemia nas amostras de sangue de bezerros da raça Nelore, criados no município de São Manuel, SP.....	72
Tabela 12:	Valores médios e desvios-padrão da concentração de hemoglobina em função da idade, nas amostras de sangue negativas para hemoparasitas de 17 bezerros da raça Nelore, no município de São Manuel, SP.....	73
Tabela 13:	Idade, concentração de hemoglobina e parasitemia nas amostras de sangue de bezerros da raça Nelore, criados no	

	município de São Manuel, SP.....	74
Tabela 14:	Valores médios e desvios-padrão do volume globular (%) em amostras de sangue negativas em função da idade, de 17 bezerros da raça Nelore, criados no município de São Manuel, SP.....	75
Tabela 15:	Idade, volume globular (%) e parasitemia nas amostras de sangue de bezerros da raça Nelore, criados no município de São Manuel, SP.....	76
Tabela 16:	Valores médios e desvios-padrão da contagem total de leucócitos, de acordo com a idade de bezerros da raça Nelore, negativos para <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>Anaplasma marginale</i> , criados no município de São Manuel, SP.....	77
Tabela 17:	Idade, número total de leucócitos e parasitemia em amostras de sangue de bezerros da raça Nelore, criados no município de São Manuel, SP.....	78
Tabela 18:	Frequência de infecções por <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>Anaplasma marginale</i> em teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> colhidas de bezerros nelore criados no município de São Manuel-SP.....	80

RESUMO

A dinâmica das infecções naturais por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, foi investigada ao longo do primeiro ano de vida de bezerros da raça Nelore criados em sistema extensivo no Estado de São Paulo, com o propósito de se avaliar a influência da criação exclusiva e extensiva de bovinos da raça Nelore sobre a epidemiologia desses hemoparasitas.

Amostras de sangue de 17 animais P.O. foram colhidas a cada 15 dias do nascimento até os quatro meses, e então, a cada 30 dias até um ano. Amostras de sangue colhidas da ponta da orelha foram utilizadas para a confecção de esfregaços sanguíneos, e amostras de sangue da veia jugular foram utilizadas para a determinação da contagem total de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina (HB), volume globular (VG), contagem total de leucócitos (CTL) e extração de DNA. As teleóginas colhidas foram incubadas em estufa BOD e posteriormente submetidas ao processo de extração de DNA.

A amplificação do DNA dos hemoparasitas foi feita pelas técnicas de PCR e nPCR, utilizando-se respectivamente os primers BoF e BoR; BoFN e BoRN para *Babesia bovis*, BilA e BilB; BilAN e BilBN para *B. bigemina* e Am9 e Am10; Am11 e Am12 para *A. marginale*.

Ao longo de um ano de experimento não foram observados casos clínicos de tristeza parasitária, e os quatro animais em que parâmetros hematológicos indicativos de anemia foram detectados concomitantemente com uma ou mais espécies de hemoparasitas se recuperaram sem que houvesse necessidade de tratamento.

Babesia bovis não foi detectada nos esfregaços sanguíneos corados por Giemsa, porém merozoítas de *B. bigemina* foram encontrados em 5 amostras de sangue provenientes de 4 animais. Corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* foram detectados em 29 amostras oriundas de 14 animais, nas quais a mais elevada taxa de parasitemia foi de 26%.

As reações de PCR e nPCR revelaram a presença de DNA de *B. bovis* em sete amostras de sangue (quatro por PCR) de três animais, um dos quais com menos de 24 horas de nascimento.

O DNA de *B. bigemina* foi detectado em 47 amostras de sangue (25 por PCR) colhidas de 15 animais e o DNA de *A. marginale* em 103 amostras de sangue (83 pela PCR). Não foram detectados resultados falso-negativos nas reações de amplificação de DNA de *B. bigemina* e *A. marginale*.

A presença de amostras de soro positivas para os agentes da TPB, tanto com menos de 24 horas após o nascimento (82% para *B. bovis*; 88% para *B. bigemina*; 94% para *A. marginale*), quanto aos nove meses de idade (100% para *B. bovis*; 94% para *B. bigemina*; 100% para *A. marginale*), revela a condição de estabilidade enzoótica para os agentes da tristeza parasitária bovina na propriedade estudada, fato ratificado pelo histórico de mais de 20 anos do rebanho estudado, onde não há relato de surtos epidêmicos de TPB, tendo observado-se apenas relatos de casos isolados.

A utilização da técnica de nPCR como ferramenta para se detectar infecções por *Babesia* spp. e *A. marginale* em teleóginas de *B. microplus* ingurgitadas nos bezerros, não revelou a infecção por *B. bovis* em nenhuma teleóquina; já o DNA de *B. bigemina* foi detectado em duas (7,4%) teleóginas colhidas, uma das quais proveniente de um animal no qual foi detectado a presença do protozoário pela PCR na mesma colheita. O DNA de *A. marginale* foi detectado em 18 (66,6%) teleóginas colhidas ao longo do primeiro ano de vida dos bezerros, das quais 13 colhidas de animais nos quais foram detectados a presença desse parasita.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, observou-se que a criação extensiva e exclusiva de bovinos da raça Nelore não foi capaz de modificar o quadro epidemiológico dos agentes etiológicos da TPB, de uma situação de endemia estável para instável.

Abstract

The dynamics of natural *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* infection was investigated along the first year of Nelore calves, raised on extensive system in São Paulo State. The purpose was to evaluate the influence of the exclusive and extensive breeding of Nelore bovine on the epidemiology of those hemoparasites.

Blood samples of 17 purebred animals were harvested every 15 days beginning on the first day of birth till four months old, and then, every 30 days till one year old. Blood samples from the ear tip were used to make blood smears, and blood samples were taken from the jugular vein to determine the red blood cells total count (RBC), hemoglobin concentration (HB), haematocrite (VG), leukocytes total count (LTC) and DNA extraction. The engorged *Boophilus microplus* were incubated and submitted to the DNA extraction process.

The hemoparasite DNA amplification was made by PCR and nPCR respectively, using the primers BoF and BoR; BoFN and BoRN for *Babesia bovis*, BilA and BilB; BilAN and BilBN for *B. bigemina* and Am9 and Am10; Am11 and Am12 for *A. marginale*.

Clinical cases of parasitic sickness were not observed along one year of experiment. The four animals that were observed with indication of anemia hematological parameters, detected at the same time with one or more hemoparasites species, recovered without treatment.

Babesia bovis was not detected in the blood smears. However, *B. bigemina* merozoites were found in five blood samples coming from four animals. *A. marginale* was detected in 29 blood samples of 14 animals, in which the highest parasitemia level was 26%.

The reactions of PCR and nPCR revealed the presence of *B. bovis* DNA in seven blood samples (four by PCR) from three animals, one of them born in less than 24 hours.

Babesia bigemina DNA was detected in 47 blood samples (25 by PCR) from 15 animals and *A. marginale* DNA in 103 blood samples (83 by PCR). False-negative results were not detected on *B. bigemina* and *A. marginale* DNA amplification reactions.

The positive TPB agents serum samples, not only those with less than 24 hours after birth (82% for *B. bovis*; 88% for *B. bigemina*; 94% for *A. marginale*), but also nine months old (100% for *B. bovis*; 94% for *B. bigemina*; 100% for *A. marginale*), revealed the enzootic stability condition on analyzed property, fact ratified by the report of more than 20 years of the studied herd, where is no report of TPB outbreaks, but only the occurrence of isolated cases.

The use of the nPCR technique as a tool to detect *Babesia* spp. and *A. marginale* infections on engorged *B. microplus* did not reveal *B. bovis* infection in any tick. However, *B. bigemina* DNA was detected in two (7,4%) engorged *B. microplus*, one of them from an animal in which the presence of the protozoa parasite was detected by PCR in the same sampling procedure. *A. marginale* DNA was detected in 18 (66,6%) engorged *B. microplus* along the first year of the calves, from which 13 were collected from animals detected with the parasite's presence.

From the results obtained in the present work, it was observed that the extensive and exclusive breeding of Nelore bovine was not capable of modifying the epidemic situation of the TPB etiological agents from a stable to an unstable endemic situation.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com grande vocação para pecuária, tendo atualmente no setor produtivo animal, potencial imensurável e de grande importância econômico-social. Para tornar mais racional o aproveitamento econômico da cadeia produtiva animal e maximizar o desenvolvimento da pecuária de modo sustentável, faz-se necessário utilizar as novas tecnologias, especialmente nas áreas de sanidade animal, epidemiologia e controle das enfermidades infecciosas e parasitárias que acometem os animais de produção.

Dentre as enfermidades parasitárias se destacam as pertencentes ao complexo chamado Tristeza Parasitária Bovina, que no Brasil são causadas por dois protozoários do gênero *Babesia* — *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* — e pela rickettsia *Anaplasma marginale*. Ambas as espécies de protozoários são transmitidas exclusivamente pelo carrapato *Boophilus microplus*, enquanto que *Anaplasma marginale* pode também ser transmitida por moscas hematófagas (KOCAN et al., 2003).

Na pecuária brasileira, as perdas econômicas causadas pelos agentes da TPB são consideráveis, cerca de 500 milhões de dólares anuais segundo estimativas do Ministério da Agricultura, corrigidas por GRISI et al. (2002).

Clinicamente essas enfermidades caracterizam-se por uma síndrome hemolítica e febril, cuja gravidade está diretamente relacionada à reação do hospedeiro frente à infecção (McCOSKER, 1981). Com isso, são responsáveis por perdas econômicas consideráveis decorrentes do menor ganho ou perda de peso dos animais parasitados, decréscimo da produção de leite, infertilidade ou subfertilidade dos touros, abortamentos, mortalidade, gastos com medicamentos e

serviço médico veterinário, além do estado crônico portador, que interfere no desenvolvimento normal dos animais.

Na cadeia epidemiológica da TPB, as complexas interações que resultam na manutenção das taxas de infecção dos bovinos, das teleóginas de carrapatos e da transmissão transovariana das diferentes espécies do protozoário são influenciadas por fatores relacionados ao hospedeiro vertebrado, ao hospedeiro invertebrado e ao meio ambiente (BOCK et al., 1999^a; 1999^b; KESSLER & SCHENK, 1998^a; MACHADO, 1991).

O conhecimento das interações que regulam a epidemiologia dos agentes da TPB 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 à pecuária, seja pela redução da perda de produtividade, por morbidade ou mortalidade de animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Babesioses bovinas

As babesioses bovinas são enfermidades que ocorrem em vários países nos quais se destaca por causar considerável perda econômica, principalmente, nas criações de raças taurinas e seus cruzamentos (BOCK et al., 2004).

No final do século XIX, um pesquisador romeno chamado Victor Babés e sua equipe começaram a investigar mais detidamente uma enfermidade caracterizada por um quadro de anemia hemolítica que acometia bovinos na Europa. Essa equipe de pesquisadores conseguiu associar essa enfermidade, chamada na época de hemoglobinúria enzoótica bovina, com a presença de microorganismos no interior de eritrócitos dos animais doentes. Babés então, no ano de 1888, denominou esses microorganismos de *Haematococcus bovis*, por pensar que se tratava de bactérias (UILENBERG, 2006).

Cinco anos mais tarde, dois pesquisadores americanos, Smith e Kilborne, associaram a ocorrência de uma enfermidade que se caracterizava por apresentar alta taxa de mortalidade e sintomas muitos semelhantes à hemoglobinúria enzoótica bovina, à presença de microorganismos intraeritrócitários. Além de conseguirem caracterizar o microorganismo como sendo um protozoário, *Pyrosoma bigeminum*, comprovaram que este agente era transmitido por um artrópode, o carrapato bovino da América do Norte, *Boophilus annulatus*. A publicação desses resultados constitui um marco histórico por ser o primeiro relato da transmissão de um protozoário por um artrópode (BOCK et al., 2004).

Ainda no ano de 1893, STARCOVICI verificou a similaridade entre os organismos descritos por Babés, na Romênia, e Smith e Kilborne nos Estados

Unidos, e propôs a inclusão de ambos em um novo gênero chamado *Babesia*, em homenagem ao pesquisador romeno (UILENBERG, 2006).

Das oito espécies do gênero *Babesia* que são capazes de infectar bovinos (UILENBERG, 2006), *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* são encontradas no Brasil (VIDOTTO et al., 1995; GUGLIELMONE, 1995). O primeiro relato dessas enfermidades no Brasil data de 1901, quando Francisco Fajardo diagnosticou a presença dos protozoários ao examinar animais recém-importados e em fase de aclimação no Rio de Janeiro (FONSECA & BRAGA, 1924).

A ocorrência das babesioses bovinas está intimamente relacionada à distribuição do carrapato *Boophilus microplus*, sendo esse artrópode considerado como o único vetor biológico e o responsável pela difusão desses protozoários (BOCK et al., 2004). Esse carrapato é originário da Ásia e se espalhou por diversas regiões, acompanhando a transferência de animais, sendo encontrado na Ásia, Austrália, México, América do Sul e África, tendo sua área de distribuição situada entre os paralelos 40° Norte e 32° Sul (McCOSTER, 1981).

Os bovinos, hospedeiros intermediários de *Babesia* spp., se infectam pela inoculação de esporozoítas presentes na glândula salivar dos carrapatos no ato do repasto sangüíneo. A inoculação de *B. bovis* ocorre quando o carrapato está na fase de larva e a de *B. bigemina* ocorre quando o carrapato está na fase de ninfa (RIEK, 1964, 1966).

Utilizando substâncias presentes nas organelas que formam o complexo apical, as quais viabilizam a introdução do parasita no eritrócito, os esporozoítas invadem os eritrócitos sem que haja o seu rompimento. Já dentro do eritrócito, os parasitas evadem-se do vacúolo parasitóforo e se transformam em merozoítas, quando irão se multiplicar por divisão binária dando origem a dois merozoítas; estes

merozoítas rompem a célula parasitada e penetram em outro eritrócito íntegro para continuar a multiplicação (BOCK et al., 2004).

A infecção dos carrapatos por *Babesia* spp. ocorre durante a hematofagia das teleóginas em animais com parasitemia. Após a ingestão de eritrócitos parasitados, os merozoítas sofrem alterações morfo-fisiológicas adaptativas se preparando para o início do ciclo sexuado (FRIEDHOFF, 1988). MACKENSTEDT et al. (1995), identificaram no sangue dos bovinos um tipo ovóide de merozoíta de *B. bigemina* que seriam as formas infectantes do protozoário para o carrapato, denominando-o de gamonte.

As primeiras observações do ciclo sexuado de *Babesia* spp. se deram em 1906 por KOCH e por KLEINE. O primeiro autor observou a presença de formas características do protozoário, e denominou-as de corpos estrelados, associando-as a estágios de reprodução sexuada. Esses corpos estrelados seriam os gametas do protozoário, responsáveis pela gametogonia, ou seja, a fase sexuada do ciclo biológico. Os gametas se fundem formando zigotos (MACKENSTEDT et al. 1995) móveis que penetram nas células do epitélio intestinal do carrapato. Ao se multiplicarem por esporogonia, dão origem aos esporocinetos, que são maiores e em forma de arco, que são liberados na hemocele (MOSQUEDA et al., 2004).

Por serem móveis, os esporocinetos invadem vários órgãos do carrapato, iniciando múltiplos ciclos de esporogonia, que se estendem até a morte da teleógina (BOCK et al., 2004). Desse modo, *Babesia* spp. são capazes de infectar a progênie de teleóginas, sendo essa via de infecção chamada de transovariana. Uma vez infectados os ovos, vários ciclos de esporogonia ocorrem nos embriões e larvas, culminando com a presença de inúmeros esporozoítas nas glândulas salivares dos carrapatos jovens (BOCK et al., 2004).

Segundo KESSLER & SCHENK (1998^a), a transmissão transovariana é fundamental para a manutenção da endemia dessa parasitose. Aparentemente, esse mecanismo de transmissão é a principal explicação para a sua ampla distribuição geográfica (MEHLHORN & SCHEIN, 1984).

RIEK (1964, 1966) foi o primeiro autor a descrever a seqüência de eventos que culminam na transmissão transovariana de *B. bigemina* e *B. bovis*. A partir desses trabalhos, várias pesquisas foram realizadas com o intuito de se esclarecer as interações entre as diferentes espécies de *Babesia* e os carrapatos (POTGIETER & ELS, 1976; CAFRUNE & AGUIRRE, 1995; GUGLIELMONE et al., 1997, BARREIRA et al., 2005^a; 2005^b). Nessas pesquisas foram investigadas a possibilidade de se discriminar morfologicamente formas evolutivas de *B. bovis* e *B. bigemina* no carrapato (POTGIETER & ELS, 1976; GUGLIELMONE et al., 1996) e também os efeitos do parasitismo por *Babesia* spp. sobre os hospedeiros invertebrados (SANTOS, et al., 1998; CEN-AGUILAR et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2005).

Outras abordagens que se fizeram possíveis incluem os aspectos epidemiológicos da infecção dos carrapatos. Assim, MAHONEY & MIRRE (1971), observaram que a freqüência de infecções por *B. bovis* variou de 22 a 30% e de *B. bigemina* de 36% em teleóginas de *B. microplus* colhidas de bovinos experimentalmente infectados. Posteriormente, verificou-se que as taxas de infecção por *Babesia* spp. nas teleóginas de *B. microplus* podem ser influenciadas por uma série de fatores relacionados aos bovinos, como a idade (QUINTÃO-SILVA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005), parasitemia (SANTOS et al., 1998) e raça (GULIELMONE, 1992). Outros fatores, como o tempo de incubação da teleógina,

também podem influenciar na detecção da infecção por *Babesia* spp. nos carrapatos (GUGLIELMONE et al., 1997).

A infecção do hospedeiro vertebrado por *B. bovis* se dá de dois a três dias após a fixação das larvas de *B. microplus*, enquanto que *B. bigemina* é transmitida após oito a dez dias, quando os ixodídeos já se encontram na fase de ninfa (RIEK, 1964, 1966). De modo geral, o período pré-patente de *B. bovis* varia de 6 a 12 dias e de *B. bigemina* de 12 a 18 dias após a fixação dos carrapatos.

No Brasil, o carrapato *B. microplus* incide 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).

As raças bovinas se comportam de modo diverso frente às infestações por carrapatos: enquanto raças europeias são mais sensíveis, as raças zebuínas apresentam uma resistência de caráter genético, muito maior (GOMES, 1998; JONSSON et al., 2000). Essa característica é transmitida de geração para geração, guardando uma proporção em relação ao grau de sangue resultante do cruzamento; assim, animais da primeira geração (F1) resultante do cruzamento de taurinos com zebuínos são ainda bastante susceptíveis ao carrapato e às doenças por ele transmitidas (SARTOR et al., 1992; BOCK et al., 1999^b).

Há evidências de que a raça dos bovinos também interfere na gravidade das infecções por hemoparasitos transmitidos por carrapatos (GUGLIELMONE, 1992; BOCK et al., 1999^a; JONSSON et al., 2000), sendo as raças zebuínas também mais resistentes do que as taurinas (MADRUGA et al., 1984; UILENBERG, 1995; BOCK et al., 1997).

A susceptibilidade dos animais zebuínos às babesioses tem sido questionada, existindo controvérsia entre autores. Para alguns, a resistência à infecção por

Babesia spp. poderia estar relacionada à ineficiente transmissão dos protozoários pelo vetor, em decorrência da maior resistência dos zebuínos ao carrapato, já que, nesses animais a maioria dos carrapatos morre precocemente (GOMES et al., 1989; SARTOR et al., 1992). Contudo, o que se observa é que os bovinos zebuínos também se infectam, porém, geralmente, apresentam enfermidade subclínica após a infecção primária por *Babesia* spp. (BOCK et al., 1997).

No que diz respeito à idade dos animais considera-se que os animais jovens sejam naturalmente mais resistentes, já que com freqüência apresentam infecções subclínicas (BROWN, et al., 2006). No entanto, MADRUGA et al. (1984) verificaram que no período entre 28 a 56 dias após o nascimento, para *B. bigemina* e 84 a 112 dias, para *B. bovis*, os títulos de anticorpos são baixos, aumentando a probabilidade dos animais a desenvolverem as babesioses de forma aguda. Segundo MAHONEY & MIRRE. (1977), os efeitos da infecção por *Babesia* spp. são minimizados pela exposição dos animais aos hemoprotozoários desde os primeiros meses de vida, quando os anticorpos colostrais estão elevados.

Ao que tudo indica, outros fatores além dos anticorpos colostrais estariam envolvidos na resistência relacionada à idade, visto que a resistência de animais jovens excede o período de proteção dos anticorpos colostrais (BROWN et al., 2006). Além disso, bezerros nascidos em regiões livres de *Babesia* spp. também apresentam certo grau de resistência às infecções experimentais (GOFF et al., 1982). A imunidade humoral tem importância secundária nas infecções por *Babesia* spp., na qual os anticorpos teriam a função de opsoninas, facilitando a fagocitose dos parasitas pelas células de defesa do organismo do hospedeiro (BOCK et al., 2004).

Além da raça e idade dos hospedeiros vertebrados, outros fatores que interferem no ecossistema do *B. microplus* podem desencadear situações em que a superinfestação pelo carrapato aumenta o desafio, sobrepujando a resposta imunológica dos animais aos hemoparasitas, inclusive em áreas endêmicas (GOMES, 1998). Segundo FRIEDHOFF (1988), existe uma relação diretamente proporcional entre o número de carrapatos ingurgitados e a taxa de inoculação do protozoário.

A resposta imunológica dos bovinos à infecção por *Babesia* spp. envolve tanto mecanismos inatos como adquiridos. A imunidade inata está relacionada a fatores como especificidade parasita-hospedeiro, características genéticas, idade e resposta imune celular do hospedeiro (BOCK et al., 2004). Diferentemente do que acontece nas anaplasmoses bovinas, não existe imunidade cruzada entre *B. bovis* e *B. bigemina*, ou seja, a infecção por uma dessas espécies não protege o animal contra a outra (SMITH et al., 1980).

Do ponto de vista epidemiológico, as babesioses bovinas ocorrem sob dois panoramas distintos regulados pela dinâmica das populações de carrapatos *B. microplus*: estabilidade e instabilidade endêmica.

A situação de estabilidade endêmica é caracterizada pela constante transmissão dos protozoários, de forma que a primo-infecção dos bovinos ocorre durante o período em que os animais jovens estão protegidos pela imunidade passiva e sob a ação da resistência inata. Essa situação é caracterizada pela ocorrência de muitos casos subclínicos e poucos casos clínicos da enfermidade (GUGLIELMONE, 1995; COLEMAN, et al. 2001).

MAHONEY et al. (1973), estimou que, quando cerca de 75% dos bovinos são infectados por *Babesia* spp. entre seis e nove meses de idade, a enfermidade ocorre em níveis baixos, caracterizando uma situação de estabilidade endêmica.

Nas áreas de instabilidade, os bezerros não se infectam por períodos prolongados e a presença do carrapato é inconstante ou insuficiente para assegurar taxas de inoculação de *Babesia* spp. capazes de manter elevado o nível de imunidade dos bovinos (MAHONEY et al., 1981). Nessa situação existe a possibilidade de ocorrência de um grande número de casos clínicos, geralmente de curso agudo e com alta taxa de mortalidade (UILEMBERG, 1995).

Apesar do potencial patogênico, as infecções por *Babesia* spp. muitas vezes são assintomáticas, e os animais tendem a apresentar baixa parasitemia, originando-se assim formas subclínicas da enfermidade (RADOSTITS et al., 2000).

Os sintomas clínicos e o curso da infecção dependem também da espécie do protozoário envolvido; no entanto, infecções por *B. bigemina* ou *B. bovis* determinam febre, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinúria e fraqueza, podendo evoluir para a morte do animal (RADOSTITS et al., 2000). Segundo MAHONEY & MIRRE (1977) e PANDEY & MISHRA (1978), existe uma correlação direta entre a elevação da temperatura corpórea e o aumento da parasitemia.

Os registros de infecção intra-uterina por *Babesia* spp. em bovinos foram feitos tendo por base a ocorrência de enfermidade clínica nos neonatos (BANNOR, 1976; DOWSETT et al., 1978; BARBOSA et al., 1994; EGELI, 1996; BRACARENSE et al., 2001; YERUHAM et al., 2003). Com a utilização de técnicas mais sensíveis, OSAKI et al. (2002) identificaram que esse tipo de infecção não é seguido, necessariamente, de sintomas clínicos, e com isso, a relevância dessa via de infecção pode estar subestimada.

A infecção por *B. bigemina* é capaz de causar danos celulares e tissulares em decorrência da hemólise intravascular e da conseqüente hipóxia tecidual ocasionada pela diminuição de eritrócitos circulantes, que afeta principalmente o fígado e os rins (PANDEY & MISHRA, 1978).

A infecção por *B. bovis* pode causar manifestações nervosas em decorrência da hipóxia e inflamação determinada pela presença dos parasitas nos capilares cerebrais. Os eritrócitos parasitados por *B. bovis* apresentam uma alteração na superfície da membrana citoplasmática que promovem a aderência da célula parasitada ao endotélio vascular e a outras hemácias não parasitadas (COOKE et al. 2005).

O aglomerado de eritrócitos formado nos capilares cerebrais interfere na circulação local, levando a alterações hemodinâmicas que culminam com danos tissulares. A babesiose cerebral ou nervosa é caracterizada por incoordenação motora, convulsão, opistótono, coma e morte (RADOSTITIS et al., 2000; RODRIGUES et al, 2005).

Dentre as principais alterações hematológicas, a anemia, que no início é normocítica normocrômica, torna-se macrocítica normocrômica pela presença de reticulócitos. Tal patologia é resultado direto da hemólise intravascular que é conseqüência da reprodução e evasão dos merozoítas, causando o rompimento dos eritrócitos parasitados. Ao mesmo tempo, ocorre a deposição de metabólitos do parasita sobre a membrana celular de vários eritrócitos, fazendo com o que eritrócitos normais que apresentam complexos estranhos em sua superfície, sejam fagocitados (MURASE et al., 1996; FIGHERA, 2001). Segundo ARAGON (1976), a anemia é diretamente proporcional à parasitemia.

MENDONÇA et al. (2002) observaram que entre dois e quatro dias após a inoculação experimental de *B. bigemina* em bezerros Nelore, mantidos em isolamento, ocorrem alterações na contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume globular, mas que esses valores retornam a níveis próximos aos anteriores cerca de 16 dias após a infecção. Os autores atribuem esses achados à rusticidade racial dos animais, pois mesmo sem imunidade prévia são capazes de debelar a infecção.

A constatação de uma leucopenia inicial seguida de uma fase mais duradoura de leucocitose por neutrofilia foram achados comuns relatados após a inoculação de *Babesia* em bezerros taurinos submetidos a premunicação (KOHAYAGAWA et al. 1990) e em bezerros Nelore experimentalmente inoculados com diferentes isolados geográficos de *B. bigemina* (MENDONÇA et al. 2002).

Nas babesioses, a fase aguda da enfermidade é caracterizada não só pelos sinais de hemólise, mas também por uma parasitemia elevada (BOSE et al., 1995). Nessa situação, o exame direto de esfregaços sangüíneos colhidos de ponta de orelha é o principal método diagnóstico empregado, pois além da praticidade é o método que apresenta o mais baixo custo. Porém a baixa sensibilidade dessa técnica é um fator limitante para a aplicação em estudos epidemiológicos, em decorrência da incapacidade de se detectar animais cronicamente infectados convertidos ao estado de portador (BOSE et al., 1995; COSTA-JUNIOR et al., 2006).

As técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos específicos têm sido freqüentemente empregadas em estudos epidemiológicos das babesioses, e com base no status imunológico dos animais é possível definir a situação epidemiológica das diferentes regiões de ocorrência dessas parasitoses (MAHONEY et al., 1973).

Muitos testes sorológicos foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos anti-*Babesia* spp., porém três técnicas são mais rotineiramente empregadas: fixação do complemento (FC), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA-I).

O teste de fixação de complemento é primariamente utilizado para detecção de anticorpos IgM, ou seja, para detecção de 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. (REITER & WEILAND, 1989).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é uma técnica sorológica amplamente empregada, tem baixo custo, porém, além de ser mais laboriosa, tem a desvantagem da subjetividade do diagnóstico (TIZARD, 2002).

O ensaio de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA-I) vem sendo amplamente utilizado para o diagnóstico de *Babesia* spp. (MADRUGA et al., 2000^a; SOUZA et al., 2000; SOARES et al., 2000; MADRUGA et al., 2001; D'ANDREA et al., 2006). No entanto, a sensibilidade e a especificidade dos exames são grandemente influenciadas pela qualidade do antígeno utilizado. A técnica de ELISA-I tem as vantagens de ser objetiva, de possibilitar a avaliação de um grande número de amostras em curto intervalo de tempo, e de utilizar leitura mecanizada e rápida, sendo por isso indicada para a realização de inquéritos epidemiológicos (TIZARD, 2002).

Nos vários estudos soropidemiológicos sobre babesiose bovina realizados no Brasil, as prevalências detectadas revelam uma situação de estabilidade endêmica na maior parte do território. No Mato Grosso do Sul a prevalência de anticorpos anti-*B. bovis* foi de 83% (MADRUGA et al., 2000^a) e de 87 a 98% para *B.*

bigemina (MADRUGA et al., 2001); no Rio de Janeiro de 90% para *B. bovis* (SOARES et al., 2000) e de 69% para *B. bigemina* (SOUZA et al., 2000); no Paraná de 64% para *B. bovis* (OSAKI et al., 2002) e na Bahia 91% para *B. bovis* e 95% para *B. bigemina* (BARROS et al., 2005).

Apesar de apresentarem elevadas 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).

O advento das técnicas moleculares de diagnóstico propiciou a conjugação de elevada sensibilidade e especificidade com a possibilidade de detecção do próprio parasita, e não de anticorpos. Essa característica é particularmente interessante, pois permite discriminar os animais infectados que apresentam baixa parasitemia daqueles que por haverem eliminado as infecções não são fonte de infecção para os carrapatos.

A técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) é baseada na amplificação de milhões de cópias de uma região específica do genoma de qualquer organismo, utilizando-se uma enzima DNA-polimerase termoestável, oligonucleotídeos livres e seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (primers), em um tampão contendo substâncias que favorecem a reação (FIGUEROA et al., 1992; BÖSE et al., 1995; FIGUEROA et al., 1996).

A PCR apresenta sensibilidade cerca de 100 vezes maior que a técnica de esfregaço sangüíneo, detectando cerca de 10 pg de DNA do parasita nas amostras de sangue (BÖSE et al., 1995), sendo que essa sensibilidade pode ser aumentada ainda mais pela utilização da técnica de nested PCR (COSTA-JUNIOR et al., 2006).

A nPCR é capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 fg de DNA (BÖSE et al., 1995), e consiste na utilização de seqüências iniciadoras internas às utilizadas na PCR, ou seja, que anelem ao fragmento amplificado pela PCR em uma segunda bateria de amplificação, aumentando ainda mais o número de cópias da seqüência alvo e conseqüentemente a sensibilidade do teste (FIGUEROA et al., 1996).

Em virtude da alta sensibilidade do teste, podem ocorrer contaminações por produtos da amplificação (amplicons) de amostras de uma mesma bateria, gerando resultados falso-positivos. Todavia, uma série de medidas profiláticas como, realização de cada fase do teste em ambientes distintos, utilização de tubos e ponteiros estéreis, exposição e limpeza das bancadas com radiação ultravioleta e hipoclorito de sódio à 10% são executadas a fim de se evitar a contaminação de amostras (BARTKOWIAK, 2003).

A utilização das técnicas de PCR na investigação epidemiológica das infecções por *Babesia* spp. tem produzido informações relevantes, pois permitem a detecção desses agentes tanto nos hospedeiros vertebrados (BUENNING & FIGUEROA, 1996; OSAKI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2005, TEGLAS et al., 2005), quanto nos carrapatos (SPARAGANO et al., 1999; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005).

No que se refere às babesioses bovinas, o emprego dessa metodologia permitiu que se constatasse que, em área endêmica para *B. bovis* e *B. bigemina*, a freqüência de bezerros mestiços leiteiros infectados era similar à de vacas (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005). No entanto, no que se refere à infecção de *B. microplus*, esses autores constataram que teleóginas alimentadas em bezerros apresentavam maior freqüência de infecções por *B. bigemina* e que teleóginas

alimentadas em vacas apresentavam frequências similares de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina*.

2.2. Anaplasmosose bovina

O gênero *Anaplasma* inclui duas espécies que infectam bovinos, *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) e *A. centrale* (Theiler, 1911). *A. marginale* é a espécie mais patogênica, e *A. centrale* por ser menos patogênica é utilizada como vacina viva em bovinos de diversas regiões do mundo (de la FUENTE et al., 2005^a).

No texto de FONSECA & BRAGA (1924), “Noções sobre a Tristeza Parasitária dos Bovinos”, podem ser obtidos os detalhes sobre o histórico inicial do conhecimento sobre esse hemoparasita, do qual foram extraídas as breves informações que se seguem: Em 1910, Theiler, na África do Sul, identificou *Anaplasma marginale* como sendo o agente etiológico de uma enfermidade muito similar à febre do Texas, que era conhecida como febre biliar bovina. Antes disso, Smith & Kilborne (1893) consideraram que as “granulações endoglobulares” ou “peripheral coccuslike” seriam produtos da multiplicação de piroplasmas causadores da Febre do Texas. Ao descrever a “Tristeza” na República Argentina, Lignieres (1900) também mencionou a presença dessas granulações, sem, contudo, classificá-las como anaplasmas. Ainda na região da Plata, Knuth (1905) considerou que os anaplasmas eram parte do ciclo biológico de “*piroplasma bigeminum*”. Por esse breve histórico é possível perceber que, a princípio, as similaridades entre as infecções causadas por *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale*, associadas ao fato de suas distribuições serem coincidentes, representaram uma complicação na caracterização individual desses hemoparasitas e explicam o seu agrupamento em uma única síndrome denominada popularmente de “Tristeza Parasitária dos Bovinos”.

Atualmente, com base em análises genéticas dos genes 16S rRNA, groELS e de genes que codificam proteínas de superfície, *A. marginale* é classificado como um organismo pertencente à Ordem Rickettsiales que inclui duas famílias: Anaplasmataceae e Rickettsiaceae. Os membros da família Anaplasmataceae são parasitas intracelulares obrigatórios, encontrados exclusivamente no interior de vacúolos no citoplasma da célula hospedeira (KOCAN et al., 2002).

Dentre os agentes patogênicos transmitidos por carrapatos, *Anaplasma marginale* é o que apresenta distribuição mais ampla, estando presente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, incluindo todo continente Americano, Austrália e sudeste do continente Africano (GUGLIELMONE, 1995; KOCAN et al., 2003). Contudo, tanto a frequência como a incidência de infecções por essa rickettsia são mais elevadas em regiões em que o carrapato *Boophilus microplus* é endêmico (FUTSE et al., 2003).

A transmissão de *Anaplasma marginale* tem sido motivo de muita polêmica, pois ainda persistem muitas dúvidas em relação aos mecanismos de transmissão e à importância epidemiológica de cada um dos diferentes mecanismos de transmissão e dos possíveis vetores (GUGLIELMONE, 1995).

A transmissão biológica de *A. marginale* já foi demonstrada experimentalmente em mais de 20 espécies de carrapatos ixodídeos (KOCAN et al., 1992; STILLER & COAN, 1995; KOCAN et al., 2004), mas a relevância de cada uma dessas espécies na transmissão, sob condições naturais, ainda não está bem definida (GONÇALVES-RUIZ et al., 2002). No Brasil, onde o carrapato *Boophilus microplus* ocorre de forma endêmica, as evidências epidemiológicas sugerem ser ele o principal vetor de *A. marginale* (GUGLIELMONE, 1995; KESSLER, 2001).

A morfologia e o desenvolvimento das formas evolutivas de *A. marginale* no intestino de *B. microplus* foram estudadas empregando-se microscopia óptica e microscopia eletrônica (RIBEIRO & LIMA, 1996). Nesse estudo, os autores descreveram detalhadamente a seqüência do desenvolvimento da rickettsia no intestino do carrapato, comprovando a sua replicação nesse local.

Os carrapatos podem transmitir agentes patogênicos pelas vias transovariana, transtadial ou intrastadial (GONÇALVES-RUIZ et al., 2002). No caso de *A. marginale*, a transmissão transovariana por *B. microplus* é contestada por diversos autores (RIBEIRO & LIMA, 1996; GONÇALVES-RUIZ et al., 2002). No entanto, utilizando a técnica de nPCR, MOURA et al. (2003), detectaram a presença de DNA de *Anaplasma* na progênie de teleóginas de *B. microplus* nPCR positivas (3 de 104) e também na de teleóginas nPCR negativas (34 de 152). SHIMADA et al. (2004) detectaram, pela reação de PCR, a presença de DNA de *A. marginale* tanto em larvas coletadas de pastagens como das provenientes de teleóginas alimentadas em bezerros portadores assintomáticos.

Os dados disponíveis até o momento, sobre a transmissão de *A. marginale* para ovos e larvas de *B. microplus*, sugerem que este pode ser um evento se não pouco freqüente na natureza como sugerido por (RIBEIRO et al., 1996, KOCAN et al., 2004), pelo menos irregular, mesmo porque ainda não foi comprovada a transmissão de *A. marginale* por larvas de *B. microplus* que tenham sido infectadas por esta via (KOCAN et al., 2004).

Apesar de o carrapato *B. microplus* ser um parasita monoxeno e realizar as ecdises sobre o hospedeiro, admite-se que a transmissão transtadial (de larvas para ninfas e de ninfas para adultos) possa ocorrer, pois os carrapatos mudam freqüentemente de hospedeiro ao se deslocarem do local de fixação do ínstar

anterior para fixar-se e reiniciar a alimentação do novo ínstar (KESSLER, 2001). Destaca-se nesse sentido a possibilidade de bezerros lactentes se infectarem com carrapatos provenientes de suas mães (MELO et al., 2001).

A transmissão intra-estadial de *A. marginale*, atribuída aos carrapatos machos, pode ser um importante mecanismo de transmissão no caso de carrapatos monoxenos, em virtude da sua grande movimentação e longevidade (POTGIETER, 1981). De acordo com AGUIRRE et al. (1994), tanto a transmissão transestadial como a intra-estadial são mais prováveis nos sistemas de criação intensiva devido ao contato físico mais freqüente entre os animais, o que facilitaria a transferência dos carrapatos.

No caso de carrapatos de três hospedeiros, larvas, ninfas e adultos alimentados em animais infectados adquirem e transmitem a infecção de forma eficaz (ERICKS et al., 1993, FUTSE et al., 2003) pelas vias transtadial (ninfas e adultos), e intrastadial (machos adultos).

No que diz respeito à transmissão biológica de *A. marginale* há ainda dois aspectos que precisam ser considerados. Em primeiro lugar, a existência de isolados de *A. marginale* que não infectam carrapatos (KOCAN et al., 2002). Esse fato pode ser ilustrado pela demonstração de que isolados brasileiros de *A. marginale* desprovidos de apêndice se multiplicam nas células epiteliais do intestino de *B. microplus* (RIBEIRO & LIMA, 1996), enquanto que os isolados que apresentam apêndice não o fazem (GONÇALVES-RUIZ et al., 2002). Em segundo lugar, a observação de que níveis flutuantes de parasitemia dos bovinos alteram a proporção de carrapatos infectados e também a intensidade de infecção dos vetores. De acordo com ERICKS et al. (1993), existe uma correlação positiva entre a taxa média de parasitemia nos bovinos e a taxa de infecção dos carrapatos.

A existência de isolados não transmissíveis por carrapatos põe em evidência outras possíveis formas de transmissão da rickettsia que assumiriam, assim, um papel de destaque na epidemiologia da anaplasose bovina (de la FUENTE et al., 2005^b).

A transmissão mecânica pode ser efetuada por insetos hematófagos e por materiais como agulhas, bisturis, etc, contaminados por sangue (KOCAN et al., 2005). Os dípteros hematófagos freqüentemente referidos como vetores mecânicos incluem diferentes espécies de tabanídeos, *Stomoxys calcitrans* e algumas espécies de mosquitos (KESSLER, 2001).

Os dados experimentais sobre a eficiência e o impacto da transmissão mediada por insetos hematófagos são escassos. De acordo com SCOLES et al. (2005), esse tipo de transmissão depende, fundamentalmente, do nível de parasitemia no momento da alimentação do inseto, e dessa forma se restringe à fase aguda da infecção dos bovinos. Por outro lado, essa forma de transmissão seria a mais importante para a disseminação de *A. marginale* em regiões onde não ocorre o carrapato vetor; em regiões em que os isolados geográficos não infectam os carrapatos ou onde os carrapatos foram erradicados (KOCAN et al. 2003). De acordo com GUGLIELMONE (1995), na Argentina *A. marginale* ocorre de forma endêmica em regiões em que o carrapato *B. microplus* foi erradicado e que surtos esporádicos de anaplasose ocorrem nas regiões temperadas do país que são naturalmente livres do carrapato.

A via transplacentária é outra forma referida de transmissão de *A. marginale* cuja importância epidemiológica carece de melhor definição. A maioria dos relatos de transmissão congênita refere-se a casos em que bezerros recém-nascidos desenvolveram doença hemolítica grave (PAINE & MILLER, 1977, NORTON et al.,

1983; PASSOS & LIMA, 1984). No entanto, RIBEIRO et al. (1995), utilizando métodos sorológicos de diagnóstico, detectaram a transmissão congênita de *A. marginale* em 4 de 11 bezerros nascidos de vacas inoculadas e em 2 de 97 fetos examinados em abatedouro, demonstrando que na fase aguda da infecção a transmissão congênita seria mais freqüente.

Quanto ao significado epidemiológico da transmissão congênita e dos animais nascidos congenitamente infectados, não existe uma clara definição. As observações de NORTON et al. (1983) sugerem que a importância das infecções fetais estaria relacionada à mortalidade neonatal, que seria, inclusive, maior do que a registrada por causa das perdas neonatais não diagnosticadas. De acordo com as conclusões de ZAUGG (1985), a infecção intrauterina seria responsável apenas pelo estímulo antigênico que induz a resposta imune do feto. Esse autor postulou que o material que infecta o feto permaneceria infectivo por muito pouco tempo e que, por isso, os animais nascidos com sorologia positiva não constituiriam uma fonte de infecção.

KOCAN et al. (2003) consideraram que a transmissão congênita de *A. marginale* poderia ter importância epidemiológica em algumas regiões, referindo-se, mais especificamente, aos dados obtidos por POTGIETER & VAN RESBURG (1987) na África do Sul, onde constataram a ocorrência de infecção intrauterina em 15,6% de 77 bezerros de um rebanho. Nos bovinos, *A. marginale* é encontrada exclusivamente no interior dos eritrócitos onde, ao se multiplicar por fissão binária, produz rickettsiemias persistentes que são detectáveis, microscopicamente, quando o número de eritrócitos parasitados excede a 10^7 células. Estudos de microscopia eletrônica revelaram que *A. marginale* penetra nos eritrócitos sob a forma de corpúsculo inicial, graças a uma invaginação da membrana do eritrócito (RISTIC &

CALDER, 1977) que dá origem a um vacúolo. Logo após a invasão, tem início a multiplicação por fissão binária e a formação de um corpúsculo de inclusão contendo de quatro a oito corpúsculos iniciais. Os corpúsculos formados deixam o eritrócito sem rompê-lo e invadem outras células vermelhas, dando continuidade ao ciclo (KOCAN et al., 2003).

Inicialmente, o número de eritrócitos parasitados aumenta exponencialmente, quando então são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), resultando em anemia e icterícia, sem que ocorra hemoglobinemia e hemoglobinúria (de la FUENTE et al., 2001).

Além da alteração eritrocitária, ALFONSO et al. (1996) demonstraram que após o segundo dia da infecção experimental por *A. marginale* se instala um quadro de leucocitose que desaparece após cerca de 30-35 dias a infecção. O quadro clínico ainda é caracterizado por febre e perda de peso, podendo levar os animais a óbito.

Os bovinos que sobrevivem à fase inicial da infecção convertem-se em portadores, ou seja, permanecem infectados, porém com baixos níveis de parasitemia, o que geralmente não é suficiente para desencadear os sinais típicos da doença (PALMER et al., 2000). Embora essa imunidade seja duradoura e impeça novas infecções, os bovinos persistentemente infectados se portam como fonte de infecção para os artrópodes vetores, favorecendo o trânsito da rickettsia no rebanho (GUGLIELMONE, 1995).

A resposta imunológica dos bovinos infectados por *A. marginale* envolve tanto mecanismos de origem humoral quanto celular, tendo o baço importante função no desenvolvimento e manutenção dessa imunidade (VIDOTTO & MARANA, 2001). A remoção do baço deixa os bezerros totalmente susceptíveis à infecção, e a

anaplasmose em bezerros esplenectomizados é geralmente mais grave do que a observada em bovinos adultos (KOCAN et al., 2004). A esplenectomia prejudica tanto a defesa imune celular, quanto a formação de anticorpos IgM, que aparecem após a infecção e apresentam atividade de fixação de complemento (TIZARD, 2002).

Bezerros são mais resistentes à infecção por *A. marginale* do que bovinos adultos, pois quando infectados são menos propensos a desenvolver a anaplasmose (KOCAN et al., 2004). Os bezerros nascidos em regiões endêmicas, ao se infectarem nos primeiros dias de vida, apresentam elevada imunidade em decorrência da ação de anticorpos colostrais e da imunidade celular (MADRUGA et al., 1987). Na região metalúrgica de Minas Gerais, MELO et al. (2001), constataram que bezerros nascidos na estação seca estariam sujeitos a desenvolverem doença na estação chuvosa subsequente, provavelmente, em virtude dos baixos níveis de anticorpos colostrais e da escassa proteção dos anticorpos adquiridos, já que na estação seca o desafio pelos carrapatos é baixo e insuficiente para estimular a produção de níveis elevados de anticorpos.

Em virtude dessas características epidemiológicas, o conceito de estabilidade/instabilidade enzoótica, proposto e aplicado por MAHONEY et al. (1973) no estudo das babesioses bovinas, também tem sido aplicado no estudo da anaplasmose bovina (GUGLIELMONE, 1995).

Se por um lado a resistência etária nas infecções por *A. marginale* seja reconhecida consensualmente à semelhança do que se observa nas babesioses bovinas, a susceptibilidade relacionada à raça é contestável. Em diversos estudos realizados sob condições naturais ou experimentais (OTIM et al., 1980; BOCK et al., 1997; BOCK et al., 1999^a) verifica-se que quando se detecta alguma diferença em favor dos zebuínos, ela é muito discreta. PARKER et al. (1985) relataram que as

manifestações da infecção por *A. marginale* foram apenas ligeiramente mais brandas em novilhas zebuínas puras do que em novilhas taurinas. BOCK et al. (1997) avaliaram as conseqüências da infecção em novilhos taurinos, zebuínos e cruzados meio-sangue e $\frac{1}{4}$ zebu e concluíram que independentemente da raça e do grau de sangue há risco de desenvolvimento de doença grave, quando os animais são expostos a isolados virulentos de *A. marginale*.

As infecções por *A. marginale* assemelham-se clinicamente às babesioses (TRUEBLOOD et al., 2001) não apresentando nenhum sinal patognomônico, o que inviabiliza a possibilidade de diagnóstico clínico, tornando necessário o apoio laboratorial (RADOSTITS et al., 2000).

A técnica de esfregaço sanguíneo continua sendo a de maior praticidade para diagnóstico das infecções por *A. marginale*, especialmente, durante a fase aguda, quando grande parte dos eritrócitos está parasitado (HART et al., 1992). Contudo, trata-se de um método pouco sensível e incapaz de detectar o parasita nos casos de baixos níveis de rickettsemia que ocorrem predominantemente durante a fase crônica (VIDOTTO & MARANA, 2001).

Segundo TRUEBLOOD et al. (2001), o fato dos animais persistirem infectados após se recuperam de uma primo-infecção por *Anaplasma* faz com que os níveis de anticorpos se mantenham elevados, favorecendo com isso a possibilidade de realização de diagnóstico indireto, por diferentes métodos sorológicos. No entanto, McGUIRE et al. (1991) consideram que as técnicas sorológicas apresentam um elevado índice de erros em função, principalmente, de resultados falso-positivos cuja principal causa seria a contaminação dos antígenos utilizados por proteínas de eritrócitos.

Considerando essas duas afirmativas anteriores, é possível afirmar que os maiores avanços relacionados ao diagnóstico sorológico da anaplasmose bovina têm sido obtidos pela identificação e caracterização de antígenos de *A. marginale* através da clonagem de genes e da produção de proteínas recombinantes (REYNABELLO et al., 1998). As análises antigênicas das proteínas de membrana de *A. marginale* revelaram que seis proteínas principais de superfície ou “major surface proteins” (MSP) são reconhecidas por anticorpos produzidos por bovinos infectados com diferentes isolados de *A. marginale* (OLIVEIRA et al., 2003). As investigações realizadas com essas seis proteínas principais têm revelado que elas estão envolvidas em distintas atividades biológicas (KOCAN et al., 2003) do parasita, e que as MSP 1, 2 e 4 apresentam características que as credenciam como candidatas para a produção de vacinas e as MSP 3 e 5 como imunógenos para utilização no diagnóstico imunológico das anaplasmoses bovinas (BARBET, 1995).

Já em 1991, McGUIRE e colaboradores consideravam que a utilização de antígenos purificados, livres dos contaminantes de hemácias, aumentaria a especificidade de todos os métodos sorológicos, tais como, Fixação de Complemento (FC), Aglutinação em Cartão (CT), Aglutinação em Tubo Capilar (CTA) reação imunoenzimática (ELISA), imunofluorescência Indireta (IFI), Imunoblotting e Radio-imuno-ensaio.

No entanto, nas últimas décadas, as técnicas baseadas em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) têm substituído as demais técnicas sorológicas (BARROS et al., 2005) em função das vantagens que apresenta. Além de possibilitar a análise de um grande número de amostras, trata-se de uma metodologia que elimina erros da avaliação subjetiva (MADRUGA et al., 2000^b) pela possibilidade de leitura automatizada (SOARES, 2001).

Em decorrência das várias vantagens das técnicas imunoenzimáticas de diagnóstico e da característica de possibilitar a análise de um grande número de amostras em um curto intervalo de tempo, essas técnicas têm sido as mais utilizadas nos estudos epidemiológicos da anaplasose bovina, inclusive no Brasil (MADRUGA et al., 2000^b; VIEIRA et al., 2002; BARROS et al., 2005).

Apesar da indiscutível relevância das técnicas imunológicas, há particularidades na epidemiologia das infecções por *A. marginale* cuja investigação não pode ser assistida por essas técnicas. Um desses aspectos diz respeito à necessidade de se definir os parâmetros quantitativos da transmissão da rickettsia, que dependem da detecção do parasita tanto no hospedeiro vertebrado como nos invertebrados.

Os avanços obtidos no campo da biologia molecular tornaram possível o desenvolvimento de novas metodologias para diagnóstico de parasitas baseadas na detecção de DNA que, ao contrário de substâncias como proteínas, permanece inalterado em todos os estágios do ciclo biológico do parasita (BARKER, 1990). Os primeiros avanços científicos obtidos com a aplicação das provas baseadas na detecção de DNA de *A. marginale* foram revisados por diversos autores (BARBET, 1995; FIGUEROA & BUENING, 1995; STILLER & COAN, 1995). Nessas publicações os autores descrevem o progresso das técnicas de biologia molecular e as conseqüentes descobertas que propiciaram em relação a essa rickettsia.

Atualmente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), desenvolvida por MULLIS & FALOONA (1987), tem sido a técnica molecular mais utilizada na investigação dessa e de outros parasitas. Pela PCR, uma determinada região do genoma de qualquer organismo pode ser multiplicada em milhões de cópias, possibilitando o diagnóstico específico com elevada sensibilidade.

No que se refere aos hospedeiros vertebrados, a aplicação das técnicas baseadas na PCR no diagnóstico das infecções por *A. marginale* tem como principal vantagem a possibilidade de discriminar animais soronegativos infectados, como por exemplo, animais em fases iniciais da infecção ou que foram infectados congenitamente (COSSÍO-BAYÚGAR et al. 1997) e distinguir animais soropositivos infectados de animais vacinados (GALE et al. 1996).

Quanto à infecção dos carrapatos, as investigações epidemiológicas foram, até recentemente, bastante limitadas pelo escasso conhecimento das interações entre os carrapatos e a própria rickettsia, assim como, pela inexistência de métodos diagnósticos adequados (STILLER & COAN, 1995). Essa limitação foi minimizada pela utilização de técnicas baseadas em PCR, pois possibilitam o diagnóstico direto pela detecção da rickettsia nos vários estágios de desenvolvimento dos artrópodes vetores (VIDOTTO & MARANA, 2001).

Até o momento, a maioria das pesquisas em que as técnicas de amplificação de DNA foram empregadas para investigar as relações entre os vetores e *A. marginale* contemplaram espécies de carrapatos que não ocorrem no Brasil (de la FUENTE et al., 2001, 2005^a; SCOLES et al., 2005;).

No que se refere a *B. microplus*, essas pesquisas possibilitaram a constatação de que esse carrapato retém sua capacidade vetorial em relação a isolados que ocorrem em áreas livres dessa espécie (FUTSE et al., 2003). No Brasil, SHIMADA et al. (2004) pesquisaram a presença de DNA de *A. marginale* em larvas de *B. microplus* constatando com isso que em teleóginas infectadas, a rickettsia pode migrar para os ovários e provocar a infecção das larvas, e que a frequência desse evento é influenciada pela temperatura de incubação das teleóginas.

3. Objetivos

O conhecimento das interações que regulam a epidemiologia dos agentes da TPB em cada região geográfica é indispensável para o desenvolvimento e aplicação de medidas de controle que possam reduzir os prejuízos causados à pecuária pela redução de produtividade, morbidade ou mortalidade de animais. No entanto é necessário que os estudos epidemiológicos sejam conduzidos empregando-se métodos de diagnóstico que indiquem de forma segura a prevalência da infecção tanto nos hospedeiros vertebrados como nos invertebrados.

Diante dessas considerações, o presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de se verificar a dinâmica das infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* ao longo do primeiro ano de vida de bezerros da raça Nelore, utilizando parâmetros clínicos, imunológicos e técnicas moleculares de diagnóstico para detectar a frequência de infecções nos bovinos e nos carrapatos. Explicitando, os objetivos propostos foram os seguintes:

1. Avaliar a dinâmica das infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bezerros da raça Nelore criados em área endêmica no Estado de São Paulo.
2. Correlacionar a frequência de infecções por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* com parâmetros clínico-hematológicos de bezerros Nelores ao longo de um ano.
3. Avaliar a frequência de infecções por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* em teleóginas de *Boophilus microplus* colhidas dos bezerros.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Laboratórios

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu.

4.2. Animais Experimentais

Os animais utilizados no presente estudo integravam o rebanho Nelore mantido na Fazenda São Manuel, pertencente à UNESP, localizado no município de São Manuel. As coordenadas da região são 22°43'22" de latitude sul e 48°34'14" de longitude oeste.

A propriedade possui uma área total de 210 alqueires, sendo 100 alqueires destinados à pecuária bovina, divididos em 16 piquetes e com 330 animais no total, em uma lotação média de três UA/ alqueire.

Foram utilizados 17 bezerros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) puros de origem, criados sob aleitamento natural (Figura 1). As vacas eram mantidas em pasto com cobertura de *Brachiaria decubens* e sal mineral disponibilizado "ad libitum" em cochos cobertos. Imediatamente após o nascimento, os bezerros eram tratados com uma única dose de ivermectina injetável, sendo este o único medicamento antiparasitário administrado aos animais ao longo do experimento. Após o desmame, aos nove meses de idade, os bezerros permaneceram em regime de pastagem sob as mesmas condições de manejo extensivo.



Figura 1: Bezerros que integram o rebanho Nelore mantido na Fazenda São Manuel/ UNESP, localizada no município de São Manuel-SP.

4.3. Exame físico e colheita de amostras

Os exames físicos e as colheitas das amostras tiveram início no mês de janeiro de 2004, época do nascimento dos animais, sendo esses procedimentos realizados nas primeiras 24 horas de vida de cada animal. A partir de então, foram realizados em 14 outras ocasiões até os animais completarem um ano de idade. Na tabela 1 a idade mínima e máxima dos animais amostrados está apresentada em função dos meses em que foram realizados os exames físicos e as colheitas das amostras.

Tabela 1: Idade mínima e máxima de 17 bezerros da raça Nelore em função dos meses em que foram realizados os exames físicos e as colheitas das amostras, no município de São Manuel, SP.

Colheita	Mês	Idade mínima- máxima (dias)
1	Jan/Fev/2004	<1
2	Fev	15-30
3	Mar	38-55
4	Mar	53-70
5	Abr	73-90
6	Abr	87-105
7	Mai	107-130
8	Jun	123-146
9	Jul	158-181
10	Ago	192-215
11	Set	223-246
12	Out	258-281
13	Nov	285-308
14	Dez	313-336
15	Jan/2005	343-369

Em cada ocasião de colheita, os animais foram submetidos a exame físico constituído de inspeção das mucosas oculares, tomada de temperatura retal e observação da pelagem e do comportamento. A pesagem individual dos animais foi feita utilizando-se balança mecânica apropriada para bovinos, e o peso vivo registrado em quilogramas (kg). A partir da terceira colheita, todos os procedimentos eram realizados com os animais contidos em tronco de contenção.

Amostras de sangue da veia jugular foram colhidas em tubos “vacutainer” com EDTA para realização dos exames hematológicos e para a extração de DNA e em tubos sem anticoagulante para obtenção de soro sangüíneo para as provas sorológicas. Amostras de sangue periférico, provenientes de vasos auriculares, foram colhidas em lâminas histológicas para a confecção de esfregaços sangüíneos e determinação direta da parasitemia em microscopia óptica.

Após rigorosa inspeção, todas as fêmeas ingurgitadas (teleóginas) de *Boophilus microplus*, de cada bezerro, foram colhidas, contadas e acondicionadas isoladamente em microtubos de plástico.

Todas as amostras de sangue e de carrapatos foram transportadas para o Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências, da UNESP, Campus de Botucatu, onde foram processadas.

4.4. Processamento das amostras de sangue

As amostras de sangue foram processadas a fim de se avaliar os seguintes parâmetros hematológicos: avaliação do número total de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume globular, número total de leucócitos e pesquisa de hemoparasitas em esfregaços sangüíneos.

A contagem total de eritrócitos e leucócitos foi realizada em contador eletrônico de células. A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro utilizando-se comprimento de onda de 540 nm. O volume globular foi determinado pelo método de microhematócrito.

Os esfregaços sanguíneos confeccionados com sangue colhido dos vasos auriculares foram fixados em metanol e corados por Giemsa. A parasitemia foi estimada pela contagem do número de eritrócitos parasitados em 1000 eritrócitos e o resultado foi expresso em porcentagem.

4.5. Processamento das amostras de *Boophilus microplus*

No laboratório, os carrapatos colhidos foram identificados e as teleóginas de *Boophilus microplus* colhidas de cada bezerro foram contadas, acondicionadas individualmente em placas escavadas de polietileno e incubadas em estufa BOD à temperatura de 27 ± 1 °C e umidade superior a 70%, para realização da postura.

No décimo quinto dia após o início da postura, as teleóginas de *B. microplus* foram examinadas individualmente para a pesquisa de esporocinetos de *Babesia* sp. na hemolinfa, seccionando-se uma das patas com uma micro-tesoura para dissecação, seguindo-se a técnica descrita por Burgdorfer (1970).

As amostras de hemolinfa foram depositadas sobre lâmina de vidro e após serem secas ao ar foram fixadas em metanol e coradas com Giemsa. As leituras foram feitas em microscópio óptico utilizando-se objetiva de 100x. Após a obtenção da hemolinfa, as teleóginas foram acondicionadas individualmente e conservadas em freezer -80°C para a posterior extração de DNA.

4.6. Pesquisa de DNA de *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*

4.6.1. Extração de DNA das amostras de sangue

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada empregando-se o kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. O seguinte protocolo foi realizado:

- Colocar 300 µl de sangue e 900µl de solução de lise (KHCO₃ 10 mM; NH₄Cl 155 mM; EDTA 0,1 mM), em microtubo de 1,5 ml;
- Homogeneizar e centrifugar a 20.800 g por cinco minutos e descartar o sobrenadante;
- Homogeneizar e adicionar 500 µl de solução de extração;
- Incubar por cinco minutos em temperatura ambiente e transferir o conteúdo do tubo para a coluna de extração acoplada a um tubo coletor;
- Centrifugar a 5.000 g por um minuto;
- Adicionar à coluna 500 µl da solução de extração e centrifugar a 5.000 g por um minuto;
- Adicionar à coluna 500 µl da solução de lavagem (tampão tris-EDTA) e centrifugar a 20.8000 g por três minutos;
- Transferir a coluna para um tubo de 1,5 ml, limpo e livre de DNAses;
- Adicionar 100 µl de água ultrapura, autoclavada e aquecida a 70 °C.
- Incubar por um minuto à temperatura ambiente e centrifugar a 5.000 g por um minuto, obtendo-se assim a solução de DNA.

As soluções de DNA foram identificadas e mantidas estocadas em freezer –80C° para posterior amplificação.

4.6.2. Extração de DNA das fêmeas de *Boophilus microplus*

Para a extração de DNA das teleóginas, cada exemplar previamente congelado foi macerado individualmente em tubo de 1,5 ml ao qual foram adicionados 10 µl de tampão lisozima pH 8,5 (TRIS 10 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 5%), e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 20 µl de solução de proteinase K (20 µg/ml de em TRIS-HCl 10 mM, pH 8,0), e incubado por 4 horas a 56°C em banho-maria. Após a incubação foi realizada a extração de DNA utilizando o kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare), adotando-se procedimento semelhante ao indicado para a extração de DNA de amostras de sangue: ao material digerido pela proteinase K, foram adicionados 500 µl de solução de extração, seguindo-se uma incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 5.000 g por dois minutos e o sobrenadante foi transferido para a coluna de extração acoplada a um tubo coletor. A partir desse ponto, o procedimento foi o mesmo já descrito para a extração de DNA do sangue.

As soluções de DNA foram identificadas e mantidas estocadas em freezer – 80 C° para posterior amplificação pela técnica de PCR.

4.6.3. Reações de PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando as seqüências iniciadoras (“primers”) descritas por FIGUEROA et al. (1993), cujas descrições estão apresentadas no Quadro 1. As reações foram feitas em tubos de 0,2 ml empregando-se volume final de 25 µl, sendo 5 µl da solução de DNA das amostras teste e 20 µl de tampão de reação (master mix) com a seguinte composição:

- 2,5 µl de tampão 10 X (Tris-HCl 10 mM; KCl 500mM; MgCl₂ 15 mM)

- 0,3 µl de Taq-DNA-polimerase (5U/µl)
- 0,5 µl de solução 10mM de nucleotídeos
- 1µl de “primer” BilA (10µM)
- 1µl de “primer” BilB (10µM)
- 14,7 µl de água bi-destilada estéril.

Quadro 1: Seqüências iniciadoras externas (“primers”) para amplificação de DNA de *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale*

Espécie	Seqüência	Oligonucleotídeos(5'-3')	Produto Amplificado (pb*)
<i>B. bovis</i>	BoF	CACGAGGAAGGAAGTACCGATGTTGA	350
	BoR	CCAAGGAGCTTACCGTACGAGGTCA	
<i>B. bigemina</i>	BilA	CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC	278
	BilB	CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG	
<i>A. marginale</i>	Am9	TTGAAGGTTGAAGTGCAGGT	200
	Am10	CCATATCGAATGCACCAAAC	

*Pares de base

Uma vez aplicadas as amostras, os tubos foram submetidos a uma breve centrifugação (“spin”) e posteriormente colocados em termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf), empregando-se a seguinte seqüência de ciclos:

1. Desnaturação inicial; 95 °C/7 min;
2. Anelamento:
 - a. *B. bovis*: 55 °C/1 min.
 - b. *B. bigemina*: 64 °C/1 min
 - c. *A. marginale*: 58 °C/1 min.
3. Extensão: 73 °C/1,5 min.

Após o ciclo inicial seguiram-se 34 ciclos idênticos exceto pela redução da etapa de desnaturação para 1 minuto e da ampliação do tempo da extensão final para 5 minutos. Para controle positivo das reações foi utilizada amostra de DNA de cepa vacinal de *B. bigemina* e *B. bovis*, diluídas a 1:1000. Para controle positivo das reações de *A. marginale* foi utilizada amostra de DNA diluída a 1:100, extraída de animal com diagnóstico positivo em esfregaço sangüíneo.

Para o controle de contaminação, em cada bateria de reações, foi utilizada uma amostra (branco) contendo “master mix” e água bi-destilada em vez de DNA teste.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio (0,5µg/ml). O comprimento dos produtos amplificados foram estimados utilizando-se um padrão de pares de base (100 Base-Pair-Ladder - GE Healthcare) em cada gel de corrida. A visualização dos produtos amplificados foi realizada em transiluminador UV.

4.6.4. Reações de Nested-PCR (nPCR)

As amostras de DNA extraídas de sangue, que não apresentaram produtos de amplificação após a PCR, foram submetidas à nPCR. As seqüências iniciadoras internas utilizadas nessa segunda amplificação foram designadas por FIGUEROA et al. (1993) e estão apresentadas no Quadro 2. As reações de nPCR foram feitas utilizando 2 µl do produto da reação de PCR e 23 µl do tampão de reação com a mesma composição anteriormente descrita para as reações de PCR, porém utilizando as seqüências iniciadoras internas:

Quadro 2: Seqüências iniciadoras internas (“primers”) para amplificação de DNA de *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale*

Espécie	Seqüência	Oligonucleotídeos (5'-3')	Produto Amplificado (pb*)
<i>B. bovis</i>	BoFN	TCAACAAGGTA CTCTATATGGCTACC	290
	BoRN	CTACCGAGCAGAACCTTCTTCACCAT	
<i>B. bigemina</i>	BiIAN	CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC	170
	BiIBN	CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG	
<i>A. marginale</i>	Am11	CACATTTCTTGGAGCTGG	150
	Am12	TCTCTGCGACTTTGAACC	

*Pares de base

A seqüência dos ciclos de amplificação de DNA foi idêntica à descrita para a PCR, excetuando-se a temperatura de anelamento dos primers que foi de 70 °C para *B. bigemina*, 65 °C para *B. bovis* e 51 °C para *A. marginale*.

Para o controle positivo das reações de nPCR, as amostras de DNA controle utilizadas na reação de PCR foram diluídas a 1:10.000 no caso de *B. bigemina* e *B. bovis* e a 1000, no caso de *A. marginale*. O controle de contaminação foi feito como nas reações de PCR, ou seja utilizando água bidestilada autoclavada em substituição a amostra teste.

4.7. Ensaio de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA-I)

Os ensaios de imunoadsorção enzimática indireta para detecção de anticorpos anti- *B. bovis*, anti- *B. bigemina* e anti- *A. marginale* no soro dos bovinos foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Sanidade Animal, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Corte (CNPGC), localizada em Campo Grande-MS. A obtenção dos

antígenos utilizados e o protocolo para a execução dos testes de ELISA-I para detecção de anticorpos anti-*B. bovis*, anti-*B. bigemina* e anti-*A. marginale*, foram realizados respectivamente segundo MADRUGA et al. (2000^a; 2000^b; 2001).

Nos testes para diagnóstico de *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* utilizou-se placas de microtitulação de 96 poços que foram sensibilizadas com antígeno de homogeneizado total diluído a 1:500 (*B. bovis*), 1:1000 (*B. bigemina*) e 1:5000 (*Anaplasma marginale*) em tampão carbonato/bicarbonato (Na₂CO₃ 200 mM, NaHCO₃ 199 mM), pH 9,2 (100 µL/ poço), por pelo menos 12 horas a 4°C, sendo adicionados 100 µL/ poço dos soros controle e teste diluídos a 1:1.000 em PBST.

Em seguida, foram adicionados 50 µL/ poço de imunoglobulina de coelho anti-IgG bovina conjugada com fosfatase alcalina (Sigma A-0705) e diluída a 1:12.000 em PBST. O substrato p-nitrofenil fosfato (1,0 mg/mL em tampão do substrato: dietanolamina 0,1 M, MgCl₂ 0,1 mM, NaCl 0,1 mM) foi adicionado em um volume de 50µL/ poço, sendo a reação parada após 20 minutos com NaOH 0,2 M (100 µL/ poço). A leitura dos resultados foi realizada em um espectrofotômetro para microplacas, com filtro de 405 nm e o cut-off da prova foi determinado usando a média das DOs de soros de animais livres de infecção mais dois desvios-padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Frequência de infecções por *Babesia bovis*

Merozoítas de *Babesia bovis* não foram detectados nos esfregaços sangüíneos em nenhuma ocasião ao longo de todo o experimento, entretanto o DNA dessa espécie foi detectado em sete (2,74%) amostras provenientes de três animais (Tabela 2). Em quatro dessas amostras o DNA de *B. bovis* foi detectado pela técnica da PCR e em três, pela técnica de nPCR. Um animal teve três amostras positivas e dois animais, duas amostras positivas.

Em um animal (13) a presença de DNA de *B. bovis* foi detectada na primeira colheita, com menos de 24 horas após o nascimento dos bezerros, no mês de janeiro de 2004. Nos outros dois animais as amostras positivas foram colhidas quando eles tinham entre 244 e 339 dias de idade.

No que diz respeito à sorologia, anticorpos anti-*B. bovis* foram detectados em 82,4% (14) dos bezerros com menos de 24 horas de nascimento e em 100% (17) dos animais aos nove meses de idade (Tabela 3).

5.2. Frequência de infecções por *Babesia bigemina*

Merozoítas de *B. bigemina* (Figura 2) foram detectados em cinco esfregaços sangüíneos oriundos de quatro bezerros. A maior parasitemia observada foi de 1,8% em um animal que apresentava infecção concomitante por *A. marginale*. A média de parasitemia de *B. bigemina* nos bezerros foi de 0,72% ($\pm 0,7$) (Tabela 4).

O DNA de *B. bigemina* (Tabela 5) foi detectado em 47 (18,43%) amostras dos bezerros. A PCR foi capaz de detectar o DNA de *B. bigemina* em 25 (9,8%) amostras e a nPCR em 22 (8,6%) amostras. Todas as amostras positivas nos esfregaços sangüíneos foram também positivas pela técnica de PCR.

A detecção mais precoce de DNA de *B. bigemina* foi feita pela técnica de nPCR em amostra colhida de um bezerro aos 51 dias de vida. Dos 17 animais amostrados, três não apresentaram infecções detectáveis pelos testes diagnósticos empregados ao longo de todo o experimento. O maior número de amostras positivas foi detectado na colheita realizada no mês de setembro, quando os bezerros tinham entre 223 e 246 dias. Nessa ocasião cinco amostras foram positivas pelo teste da

PCR e três pelo teste da nPCR. Na última colheita (janeiro de 2005), o DNA de *B. bigemina* foi detectado em apenas três animais, todos pela técnica de nPCR.

Anticorpos anti-*B. bigemina* foram detectados em 88,2% (15) dos bezerros com menos de 24 horas de nascimento e em 94,1% (16) dos animais aos nove meses de idade (Tabela 6).

Tabela 4. Parasitemia (%) de *Babesia bigemina* em função da idade de 17 bezerros da raça Nelore naturalmente infectados, no município de São Manuel, SP.

Animal	Parasitemia (dias)
15	0,2 (100); 0,1(119)
18	1,8 (244)*
20	0,2 (86)
24	1,3 (339)*

* Infecção concomitante por *Anaplasma marginale*.

5.3. Frequência de infecções por *Anaplasma marginale*

Nos exames de esfregaços sangüíneos, corpúsculos intraeritrocitários de *Anaplasma marginale* (Figura 3) foram detectados em 29 (11,37%) amostras oriundas de 14 animais (Tabela 7). A maior parasitemia de *A. marginale* foi de 26%.

O DNA de *A. marginale* (Tabela 8) foi detectado em 103 (40,3%) amostras provenientes de 17 bezerros. Destas, 83 foram detectadas pela PCR e 21 pela nPCR. Todas as amostras positivas no esfregaço sangüíneo foram também positivas pela PCR.

A primeira detecção de DNA de *A. marginale* foi feita pela técnica de PCR em um bezerro com menos de 24 horas de nascido. Em janeiro de 2005, na 15ª colheita, todos os bezerros apresentaram diagnóstico positivo, com a seguinte distribuição: 11 animais pelo esfregaço sangüíneo, 16 bezerros pela técnica de PCR e em um bezerro pela técnica de nPCR.

Anticorpos anti-*A. marginale* foram detectados em 94,1% (16) dos bezerros com menos de 24 horas de nascimento e em 100% (17) dos animais aos nove meses de idade (Tabela 9).

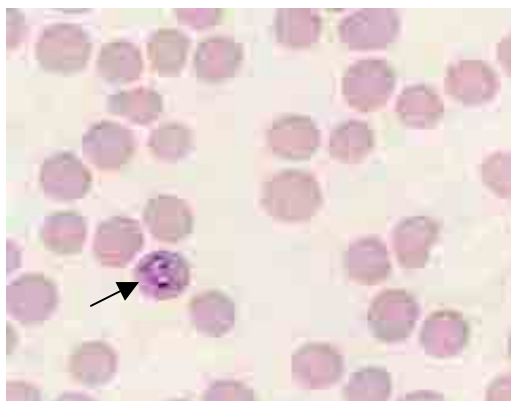


Figura 2: Merozoítas de *Babesia bigemina* (seta) em esfregaço de sangue corado por Giemsa.



Figura 3: Corpúsculos intra-eritrocitários de *Anaplasma marginale* (setas) em esfregaço de sangue corado por Giemsa.

Tabela 2. Detecção de DNA de *Babesia bovis* pelos métodos de PCR e nPCR em amostras de sangue de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.

Animal	Colheita															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	0	0
+ Amostras positivas																
- Amostras negativas																

Tabela 3. Detecção de anticorpos anti- *Babesia bovis* pelo método de ELISA-I em amostras de soro de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.

Animal	Colheita														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
18	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
22	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
23	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
31	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Total	14	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	15	17	15	11
+ Amostras positivas															
- Amostras negativas															

Tabela 5. Detecção de DNA de *Babesia bigemina* pelos métodos de PCR e nPCR em amostras de sangue de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.

Animal	Colheita															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
20	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
25	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	0	0	1	1	4	3	4	3	3	4	8	5	5	3	3	3
+ Amostras positivas																
- Amostras negativas																

Tabela 6. Detecção de anticorpos anti- *Babesia bigemina* pelo método de ELISA-I em amostras de soro de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.

Animal	Colheita																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
11	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	
13	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
14	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
15	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
17	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
19	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
20	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
22	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
23	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
24	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
31	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	
32	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
33	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
Total	15	3	3	4	5	5	3	6	4	7	9	10	16	14	15	15	
+ Amostras positivas																	
- Amostras negativas																	

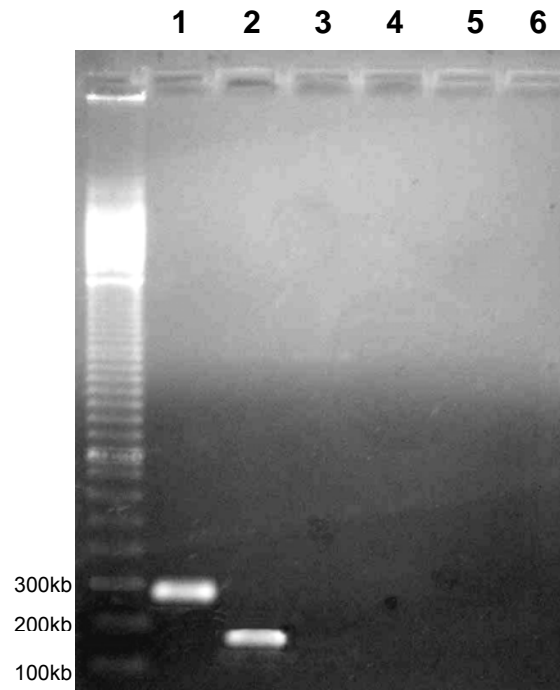


Figura 4: Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Babesia bigemina* pelas técnicas de PCR e nPCR (canaletas 1 e 2), amostra PCR negativa (canaleta 3); amostra nPCR negativa (canaleta 4); e controle PCR e nPCR negativo (canaletas 5 e 6).

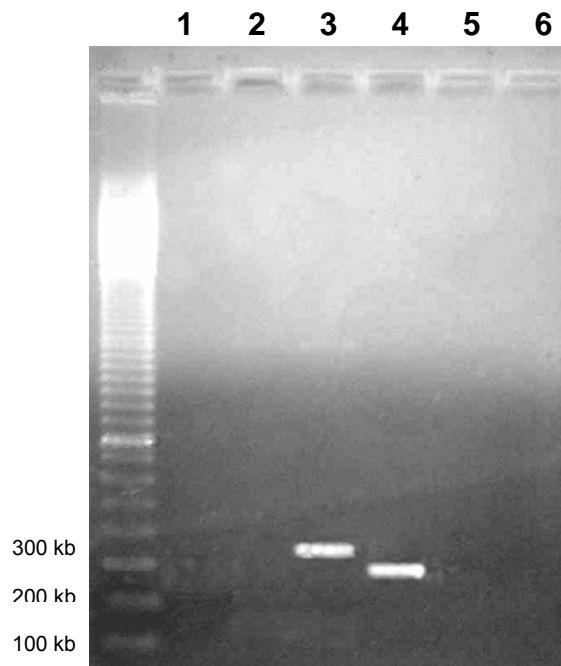


Figura 5: Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Babesia bovis* pelas técnicas de PCR e nPCR (canaletas 3 e 4), amostra PCR negativa (canaleta 1); amostra nPCR negativa (canaleta 2); e controle PCR e nPCR negativo (canaletas 5 e 6).

Tabela 7. Parasitemia (%) de *Anaplasma marginale* em 17 bezerros da raça Nelore, naturalmente infectados, no município de São Manuel, SP.

Animal	Parasitemia (idade/dias)
11	3,2 (300); 4 (367)
12	3,8 (300); 3,8 (334); 4 (367)
13	2,2 (297); 3,8 (364)*
15	1,9 (297); 3,1 (331); 2,1 (364)
17	2,9 (364)
18	2,6 (244)*
19	3,2 (244)*
20	1 (229); 4,9 (331); 1,3 (361)
21	4,9 (243); 3 (270); 3,2 (363)
23	26 (200); 12 (336); 4 (369)
24	8,2 (59); 11,3 (305); 8,2 (339); 6,8 (372)*
25	7,9 (277)
32	6,8 (377)
33	3,8 (378)

* Infecção concomitante por *Babesia bigemina*.

Tabela 8. Detecção de DNA de *Anaplasma marginale* pelos métodos de PCR e nPCR em amostras de sangue de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.

Animal	Colheita																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR	PCR	nPCR
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
22	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
23	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
24	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
31	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Total	1	1	5	3	6	5	5	3	2	5	11	11	16	14	14	16	14	17
+ Amostras positivas																		
- Amostras negativas																		

Tabela 9. Detecção de anticorpos anti- *Anaplasma marginale* pelo método de ELISA-I em amostras de soro de 17 bezerros da raça Nelore ao longo do primeiro ano de vida, no município de São Manuel, SP.

Animal	Colheita														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
12	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
13	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
14	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
17	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
18	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
22	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
23	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
24	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
31	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
32	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
33	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Total	16	3	3	1	0	8	4	4	4	4	5	13	17	16	13

+ Amostras positivas
- Amostras negativas

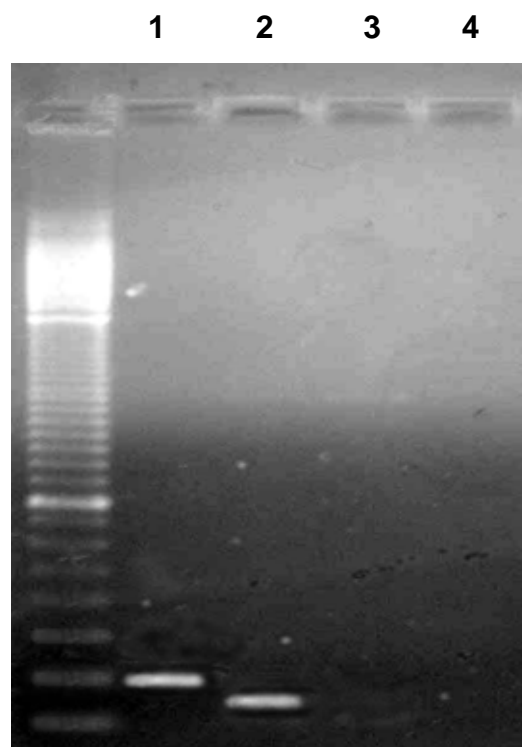


Figura 6: Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Anaplasma marginale* pelas técnicas de PCR e nPCR (canaletas 1 e 2), amostra negativa (canaleta 3); controle negativo (canaleta 4).

5.4. Parâmetros Clínicos e Hematológicos

Ao longo de todo o experimento, os parâmetros clínicos avaliados no exame físico dos bezerros, tais como comportamento, peso, temperatura, e coloração de mucosas, não revelaram indícios de ocorrência de doença hemolítica. No entanto, em épocas distintas, quatro animais apresentaram parâmetros hematimétricos indicativos de doença hemolítica.

5.4.1. Pesagem dos bezerros

O peso médio dos animais ao nascimento foi de 31,8kg, variando de 25 kg até 41 kg. Ao final dos 12 meses o peso médio dos animais era de 200 kg, variando de 150 kg até 239 kg. A evolução do ganho de peso dos bezerros durante o ano do experimento é apresentado na figura 7(A e B).

5.4.2. Contagem de Eritrócitos

A média da contagem de eritrócitos nas amostras de sangue negativas para hemoparasitas está apresentada na tabela 10.

Figura 7(A e B): Evolução do peso em função da idade de bezerros da raça Nelore criados no município de São Manuel-SP.

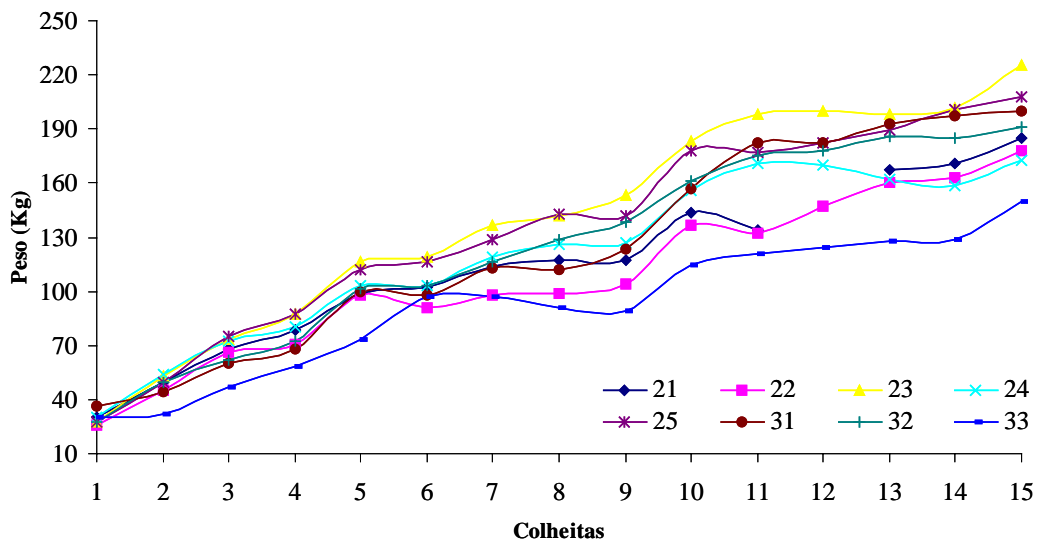
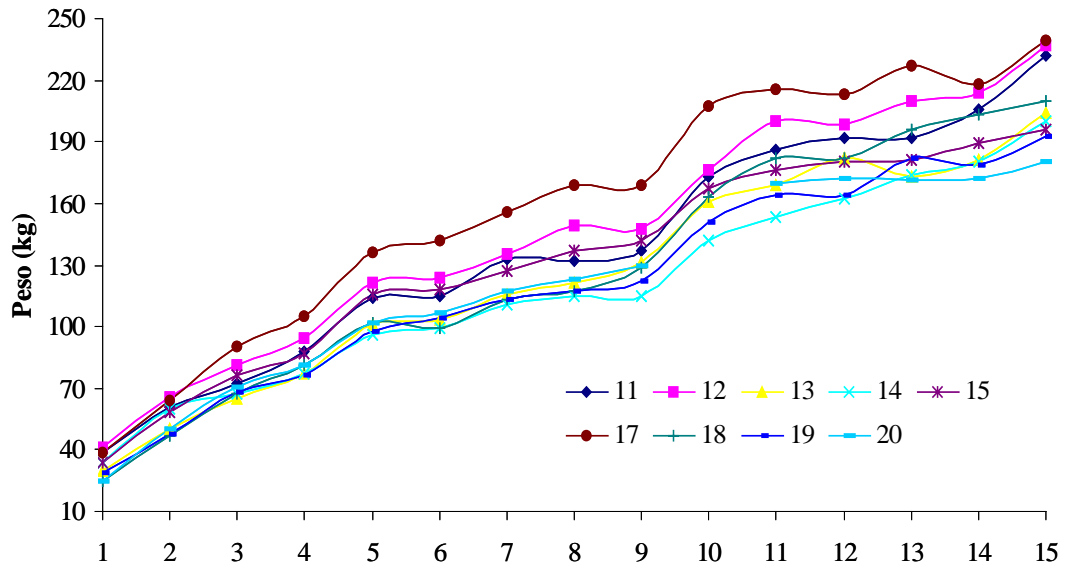


Tabela 10. Valores médios e desvios-padrão do número de eritrócitos em amostras de sangue negativas para *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em função da idade de 17 bezerros da raça Nelore, no município de São Manuel, SP.

Idade (dias)	Eritrócitos/ μL ($\times 10^6$) \pm DP	Número animais
<1	7,9 \pm 0,9	15
15-30	9,6 \pm 0,8	16
38-55	9,6 \pm 0,6	12
53-70	8,7 \pm 0,3	12
73-90	8,9 \pm 0,8	8
87-105	9,1 \pm 0,6	10
107-130	9,6 \pm 0,4	10
123-146	8,0 \pm 1,5	12
158-181	8,7 \pm 0,9	12
192-215	9,2 \pm 0,8	9
223-246	7,2 \pm 0,6	3
258-281	9,5 \pm 1,1	6
285-308	5,8*	1
313-336	8,5 \pm 0,4	3
343-369		0

*Valor absoluto

Na tabela (11) estão relacionados os valores de contagem de eritrócitos dos animais em cujos esfregaços foram encontrados hemoparasitas. Apenas dois bezerros, em diferentes ocasiões, apresentaram contagens de eritrócitos abaixo dos valores de referência. A contagem de eritrócitos do bezerro 21 foi de $4,3 \cdot 10^6$ eritrócitos/ μL aos 243 dias e do bezerro 24, de $3,2 \cdot 10^6$ eritrócitos/ μL aos 305 dias. Em ambos foi detectada a presença de *A. marginale* sendo as parasitemias de 4,9% no bezerro 21 e de 11,3% no bezerro 24. Neste último detectou-se também a presença de DNA de *B. bovis* e *B. bigemina* pela PCR.

Tabela 11. Idade, contagem total de eritrócitos e parasitemia de *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* nas amostras de sangue de bezerros da raça Nelore, criados no município de São Manuel, SP.

Animal	Idade (dias)	Eritrócitos (x10 ⁶)	Parasitemia (%)
11	300	7,4	3,2 (<i>A. marginale</i>)
11	367	7,1	4,0 (<i>A. marginale</i>)
12	300	7,4	3,8 (<i>A. marginale</i>)
12	334	6,8	6,8 (<i>A. marginale</i>)
12	367	6,9	7,4 (<i>A. marginale</i>)
13	297	6,3	4,2 (<i>A. marginale</i>)
13	364	6,1	6,8 (<i>A. marginale</i>)
15	100	10,0	0,2 (<i>B. bigemina</i>)
15	119	10,5	0,1 (<i>B. bigemina</i>)
15	297	7,5	1,9 (<i>A. marginale</i>)
15	331	6,4	4,1 (<i>A. marginale</i>)
15	364	7,5	2,1 (<i>A. marginale</i>)
17	364	6,7	4,9 (<i>A. marginale</i>)
18	244	6,1	5,6 (<i>A. marginale</i>); 1,4 (<i>B. bigemina</i>)
19	244	7,7	3,2 (<i>A. marginale</i>)
20	86	7,7	0,2 (<i>B. bigemina</i>)
20	297	7,1	1,0 (<i>A. marginale</i>)
20	331	5,5	4,9 (<i>A. marginale</i>)
20	364	6,0	1,3 (<i>A. marginale</i>)
21	243	4,3	4,9 (<i>A. marginale</i>)
21	270	7,1	3,0 (<i>A. marginale</i>)
21	363	6,3	3,2 (<i>A. marginale</i>)
23	200	5,9	26,0(<i>A. marginale</i>)
23	336	5,7	12,0 (<i>A. marginale</i>)
23	369	6,6	4,0 (<i>A. marginale</i>)
24	59	9,2	8,2 (<i>A. marginale</i>)
24	305	3,2	11,3 (<i>A. marginale</i>)
24	339	5,6	8,2 (<i>A. marginale</i>); 1,3 (<i>B. bigemina</i>)
24	372	5,8	6,8 (<i>A. marginale</i>)
25	277	5,2	11,9 (<i>A. marginale</i>)
32	377	6,5	9,8 (<i>A. marginale</i>)
33	378	7,4	3,8 (<i>A. marginale</i>)

5.4.3. Concentração de hemoglobina

As médias dos valores da concentração de hemoglobina nas amostras de sangue negativas para hemoparasitas dos 17 bezerros, estão apresentadas na tabela 12.

Tabela 12. Valores médios e desvios-padrão da concentração de hemoglobina em função da idade, nas amostras de sangue negativas para hemoparasitas de 17 bezerros da raça Nelore, no município de São Manuel, SP.

Idade (dias)	Hemoglobina g/dL \pm DP	Número animais
<1	12,3 \pm 1,4	15
15-30	13,9 \pm 1,4	16
38-55	12,9 \pm 0,8	12
53-70	12,0 \pm 1,1	12
73-90	11,9 \pm 0,7	8
87-105	11,9 \pm 1,1	10
107-130	12,8 \pm 0,9	10
123-146	13,1 \pm 1,1	12
158-181	13,5 \pm 1,1	12
192-215	13,0 \pm 1,0	9
223-246	11,2 \pm 1,4	3
258-281	14,0 \pm 1,9	6
285-308	11,3*	1
313-336	12,4 \pm 0,05	3
343-369		0

* Valor absoluto

Na tabela (13) estão relacionados os valores de concentração de hemoglobina dos animais em cujos esfregaços sanguíneos foram encontrados hemoparasitas. Em três bezerros os valores de concentração de hemoglobina ficaram abaixo dos valores de referência. A concentração de hemoglobina foi de 7,2 g/dL na amostra de sangue do bezerro 13, colhida antes de 24 horas após o seu nascimento; no bezerro 21, de 7,7 g/dL na amostra colhida aos 243 dias e no bezerro 24, de 6,6 g/dl na amostra colhida aos 305 dias. Nessas ocasiões foi detectada a presença de corpúsculos de *A. marginale* nos bezerros 21 e 24 cujas parasitemias eram de 4,9% e 11,3%, respectivamente. O DNA de *B. bovis* foi detectado pela PCR nas amostras provenientes dos animais 13 e 24.

Tabela 13. Idade, concentração de hemoglobina e parasitemia de *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* nas amostras de sangue de bezerros da raça Nelore, criados no município de São Manuel, SP.

Animal	Idade (dias)	Hemoglobina (g/dL)	Parasitemia (%)
11	300	10,0	3,2 (<i>A. marginale</i>)
11	367	11,5	4,0 (<i>A. marginale</i>)
12	300	13,3	3,8 (<i>A. marginale</i>)
12	334	11,5	6,8 (<i>A. marginale</i>)
12	367	10,8	7,4 (<i>A. marginale</i>)
13	297	12,6	4,2 (<i>A. marginale</i>)
13	364	9,8	6,8 (<i>A. marginale</i>)
15	100	12,7	0,2 (<i>B. bigemina</i>)
15	119	13,6	0,1 (<i>B. bigemina</i>)
15	297	12,3	1,9 (<i>A. marginale</i>)
15	331	12,2	4,1 (<i>A. marginale</i>)
15	364	11,3	2,1 (<i>A. marginale</i>)
17	364	10,8	4,9 (<i>A. marginale</i>)
18	244	10,2	5,6 (<i>A. marginale</i>); 1,4 (<i>B. bigemina</i>)
19	244	11,2	3,2 (<i>A. marginale</i>)
20	86	12,4	0,2 (<i>B. bigemina</i>)
20	297	10,0	1,0 (<i>A. marginale</i>)
20	331	10,0	4,9 (<i>A. marginale</i>)
20	364	10,9	1,3 (<i>A. marginale</i>)
21	243	7,7	4,9 (<i>A. marginale</i>)
21	270	11,0	3,0 (<i>A. marginale</i>)
21	363	10,0	3,2 (<i>A. marginale</i>)
23	200	8,0	26,0 (<i>A. marginale</i>)
23	336	10,8	12,0 (<i>A. marginale</i>)
23	369	9,9	4,0 (<i>A. marginale</i>)
24	59	12,2	8,2 (<i>A. marginale</i>)
24	305	6,6	11,3 (<i>A. marginale</i>)
24	339	9,4	8,2 (<i>A. marginale</i>) 1,3 (<i>B. bigemina</i>)
24	372	9,8	6,8 (<i>A. marginale</i>)
25	277	10,6	11,9 (<i>A. marginale</i>)
32	377	10,6	9,8 (<i>A. marginale</i>)
33	378	12,0	3,8 (<i>A. marginale</i>)

5.4.4. Volume Globular

As médias dos valores do volume globular (VG) das amostras de sangue negativas para hemoparasitas dos 17 bezerros, estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 14. Valores médios e desvios-padrão do volume globular (%) em amostras de sangue negativas para *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em função da idade de 17 bezerros da raça Nelore, criados no município de São Manuel, SP.

Idade (dias)	VG (%) \pm DP	Número de animais
<1	37,1 \pm 4,5	15
15-30	40,9 \pm 3,1	16
38-55	40,2 \pm 2,7	12
53-70	35,0 \pm 2,0	12
73-90	34,5 \pm 1,9	08
87-105	36,6 \pm 3,3	10
107-130	37,2 \pm 2,6	10
123-146	37,8 \pm 3,1	12
158-181	38,2 \pm 3,1	12
192-215	37,1 \pm 3,4	09
223-246	34,0 \pm 4,5	03
258-281	42,3 \pm 5,6	06
285-308	34,0*	01
313-336	38,0 \pm 2	03
343-369		0

* Valor absoluto

Na tabela (15) estão relacionados os valores do volume globular dos animais em cujos esfregaços sanguíneos foram encontrados hemoparasitas. Em quatro bezerros os valores do volume globular ficaram abaixo dos valores de referência, sendo de 20% na amostra colhida do bezerro 13 com menos de 24 horas após o nascimento; de 23% na amostra colhida aos 200 dias do bezerro 23; de 23% na amostra colhida aos 243 dias do bezerro 21 e de 20% na amostra colhida aos 305 dias do bezerro 24. Nas amostras de sangue dos bezerros 21 e 24 foi diagnosticada a presença de *A. marginale* com parasitemia de 4,9% e 11,3%, respectivamente. O DNA de *B. bovis* foi detectado pela PCR nas amostras provenientes dos animais 13 e 24, e na amostra de sangue do bezerro 23 a presença de DNA de *A. marginale* foi detectada pela PCR.

Tabela 15. Idade, volume globular (%) e parasitemia de *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* nas amostras de sangue de bezerros da raça Nelore criados no município de São Manuel, SP.

Animal	Idade (dias)	Volume Globular (%)	Parasitemia (%)
11	300	30	3,2 (<i>A. marginale</i>)
11	367	36	4,0 (<i>A. marginale</i>)
12	300	40	3,8 (<i>A. marginale</i>)
12	334	38	6,8 (<i>A. marginale</i>)
12	367	33	7,4 (<i>A. marginale</i>)
13	297	38	4,2 (<i>A. marginale</i>)
13	364	29	6,8 (<i>A. marginale</i>)
15	100	41	0,2 (<i>B. bigemina</i>)
15	119	41	0,1 (<i>B. bigemina</i>)
15	297	37	1,9 (<i>A. marginale</i>)
15	331	37	4,1 (<i>A. marginale</i>)
15	364	35	2,1 (<i>A. marginale</i>)
17	364	34	4,9 (<i>A. marginale</i>)
18	244	28	5,6 (<i>A. marginale</i>)
18	244	28	1,4 (<i>B. bigemina</i>)
19	244	33	3,2 (<i>A. marginale</i>)
20	86	34	0,2 (<i>B. bigemina</i>)
20	297	30	1,0 (<i>A. marginale</i>)
20	331	28	4,9 (<i>A. marginale</i>)
20	364	31	1,3 (<i>A. marginale</i>)
21	243	23	4,9 (<i>A. marginale</i>)
21	270	33	3,0 (<i>A. marginale</i>)
21	363	30	3,2 (<i>A. marginale</i>)
23	200	23	26,0 (<i>A. marginale</i>)
23	336	33	12,0 (<i>A. marginale</i>)
23	369	31	4,0 (<i>A. marginale</i>)
24	59	39	8,2 (<i>A. marginale</i>)
24	305	20	11,3 (<i>A. marginale</i>)
24	339	28	8,2 (<i>A. marginale</i>)
24	339	28	1,3 (<i>B. bigemina</i>)
24	372	30	6,8 (<i>A. marginale</i>)
25	277	32	11,9 (<i>A. marginale</i>)
32	377	32	9,8 (<i>A. marginale</i>)
33	378	35	3,8 (<i>A. marginale</i>)

5.4.5. Contagem total de Leucócitos

As médias e desvios-padrão da contagem total de leucócitos nas amostras negativas para *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* de 17 bezerros estão apresentadas na tabela 16.

Tabela 16. Valores médios e desvios-padrão da contagem total de leucócitos (μL), de acordo com a idade de bezerros da raça Nelore, negativos para *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*, criados no município de São Manuel, SP.

Idade (dias)	Leucócitos(μL) \pm DP	Número de animais
<1	11141 \pm 3858	15
15-30	11346 \pm 2151	16
38-55	13291 \pm 3297	12
53-70	10272 \pm 2304	12
73-90	10725 \pm 1799	08
87-105	12240 \pm 2517	10
107-130	13505 \pm 3564	10
123-146	12441 \pm 2769	12
158-181	11400 \pm 2706	12
192-215	10889 \pm 2401	09
223-246	11062 \pm 3495	03
258-281	8364 \pm 2264	06
285-308	3832*	01
313-336	12932 \pm 2992	03
343-369		0

* Valor absoluto

Na tabela 17 estão relacionados os valores da contagem total de leucócitos nas amostras de sangue dos animais em cujos esfregaços sangüíneos foram encontrados hemoparasitas. Em 66 amostras de sangue, os valores da contagem total de leucócitos ficaram fora do intervalo dos valores de referência. Em 1 dessas amostras foi detectada parasitemia de *B. bigemina* e em 10 outras, parasitemia de *A. marginale*.

Tabela 17. Idade, número total de leucócitos e parasitemia em amostras de sangue de bezerros da raça Nelore, criados no município de São Manuel, SP.

Animal	Idade (dias)	Leucócitos (μL)	Parasitemia (%)
11	300	5250	3,2 (<i>A. marginale</i>)
11	367	12390	4,0 (<i>A. marginale</i>)
12	300	14963	3,8 (<i>A. marginale</i>)
12	334	14700	6,8 (<i>A. marginale</i>)
12	367	14385	7,4 (<i>A. marginale</i>)
13	297	9240	4,2 (<i>A. marginale</i>)
13	364	8610	6,8 (<i>A. marginale</i>)
15	100	12900	0,2 (<i>B. bigemina</i>)
15	119	10800	0,1 (<i>B. bigemina</i>)
15	297	8820	1,9 (<i>A. marginale</i>)
15	331	8033	4,1 (<i>A. marginale</i>)
15	364	9500	2,1 (<i>A. marginale</i>)
17	364	9000	4,9 (<i>A. marginale</i>)
18	244	5565	5,6 (<i>A. marginale</i>) 1,4 (<i>B. bigemina</i>)
19	244	12075	3,2 (<i>A. marginale</i>)
20	86	10100	0,2 (<i>B. bigemina</i>)
20	297	9922	1,0 (<i>A. marginale</i>)
20	331	8820	4,9 (<i>A. marginale</i>)
20	364	7900	1,3 (<i>A. marginale</i>)
21	243	10500	4,9 (<i>A. marginale</i>)
21	270	12757	3,0 (<i>A. marginale</i>)
21	363	7800	3,2 (<i>A. marginale</i>)
23	200	10920	26,0 (<i>A. marginale</i>)
23	336	8400	12,0 (<i>A. marginale</i>)
23	369	12590	4,0 (<i>A. marginale</i>)
24	59	9100	8,2 (<i>A. marginale</i>)
24	305	3832	11,3 (<i>A. marginale</i>)
24	339	7350	8,2 (<i>A. marginale</i>) 1,3 (<i>B. bigemina</i>)
24	372	11600	6,8 (<i>A. marginale</i>)
25	277	10657	11,9 (<i>A. marginale</i>)
32	377	13500	9,8 (<i>A. marginale</i>)
33	378	16600	3,8 (<i>A. marginale</i>)

5.5. População de *Boophilus microplus*

Formas imaturas de carrapatos *Boophilus microplus* foram encontradas pela primeira vez em março de 2004 em um bezerro com cerca de 50 dias de idade. A partir de então, estágios imaturos desses carrapatos foram detectados nos bezerros ao longo de todo o experimento, excetuando o mês de outubro de 2004 (Figura 8). Nos meses de julho e setembro de 2004 todos os animais (17) encontravam-se parasitados por carrapatos, sendo em sua maioria formas imaturas. Os carrapatos eram encontrados predominantemente na região inguinal, úbere, saco escrotal e períneo.

No que se refere às formas adultas, foram encontradas e colhidas 27 teleóginas de *B. microplus* parasitando 10 bezerros, nas seguintes ocasiões no ano de 2004: uma em abril, duas em julho, 11 em agosto, 10 em setembro. Em janeiro de 2005 foram colhidas as outras 3 teleóginas.

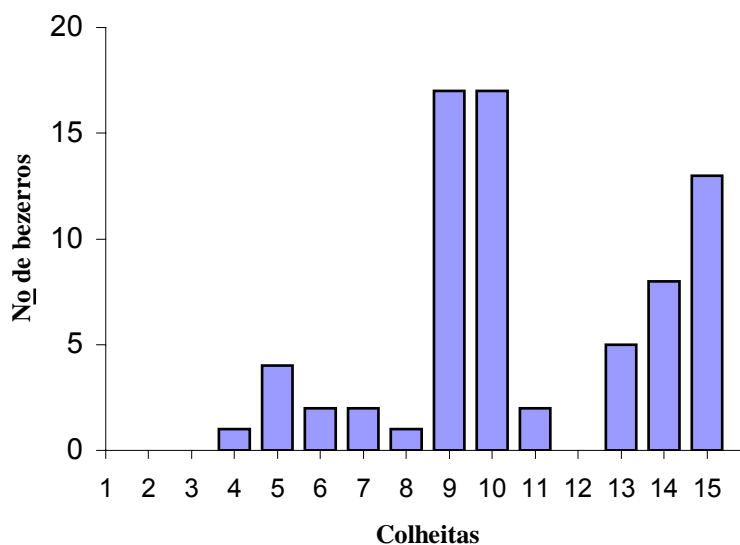


Figura 8: Número de bezerros Nelore parasitados por *Boophilus microplus* ao longo de ano, criados no município de São Manoel, SP.

5.6. Frequência de infecções por *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em teleóginas de *Boophilus microplus*.

Nenhuma forma evolutiva de *Babesia* spp. foi observada nos exames diretos de hemolinfa, assim como não foi detectado DNA de *B. bovis* nas teleóginas colhidas. O DNA de *B. bigemina* foi detectado em apenas duas teleóginas, ambas colhidas no mês de setembro de 2004. O DNA de *A. marginale* foi detectado em 18 teleóginas colhidas nos meses de abril (1), julho (1), agosto (7) e setembro (6) de 2004 e em janeiro (3) de 2005 (Tabela 18).

Tabela 18. Frequência de infecções por *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* diagnosticadas pela nPCR em teleóginas de *Boophilus microplus* colhidas de bezerros Nelore criados no município de São Manuel-SP.

Infecção Animal	Infecção das teleóginas					Negativo	Total
	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bigemina</i> <i>A. marginale</i>			
<i>B. bovis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. bigemina</i>	0	0	2	0	0	0	2
<i>A. marginale</i>	0	0	6	1	4	11	
<i>B. bigemina</i> <i>A. marginale</i>	0	0	5	0	1	6	
<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>A. marginale</i>	0	0	0	1	1	2	
Negativo	0	0	3	0	3	6	
Total	0	0	16	2	9	27	

6. DISCUSSÃO

As técnicas moleculares de diagnóstico têm constituído uma importante ferramenta na investigação epidemiológica, especialmente, no caso das enfermidades parasitárias, pois possibilitam detectar infecções incipientes bem como a identificação de portadores assintomáticos, que têm grande importância na manutenção de endemias. A utilização dessas técnicas no estudo das infecções por *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale* é promissora, tanto por possibilitar a ratificação de saberes estabelecidos, como por ampliar o entendimento sobre a dinâmica dessas infecções, de forma a possibilitar uma abordagem mais segura para o controle e profilaxia dessas enfermidades.

A situação epidemiológica de estabilidade endêmica, para *Babesia*, é gerada quando a taxa de inoculação dos parasitas é suficiente para infectar os bezerros antes que a resistência a esses parasitas desapareça, o que se dá entre seis e nove meses de idade (MAHONEY et al., 1981). Por outro lado, como a taxa de inoculação depende do número de carrapatos presentes e de sua própria taxa de infecção, fatores que interferem na sobrevivência e na taxa de infecção de *B. microplus* podem ser responsáveis pela redução da taxa de inoculação (GUGLIELMONE, 1995) e conseqüentemente, do surgimento de um quadro de instabilidade enzoótica.

Ainda de acordo com GUGLIELMONE (1995), os fatores que podem dar origem à situação de instabilidade endêmica incluem: condições climáticas marginais para o desenvolvimento do carrapato e controle intensivo de carrapatos. Além disso, considera-se que em regiões favoráveis ao desenvolvimento do vetor e na ausência de controle do vetor, situações de instabilidade poderiam, teoricamente, ocorrer em rebanhos que apresentam elevados níveis de resistência ao carrapato.

São vários os autores que consideram que a raça dos bovinos pode influenciar a ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos (BOCK et al., 1999^b; JONSSON et al., 2000), com destaque, principalmente, para a elevada resistência dos bovinos zebuínos à infestação por *B. microplus*.

A fazenda de origem dos animais do presente experimento foi escolhida pelo fato de explorar exclusivamente bovinos da raça Nelore por cerca de duas décadas. Considerando ser essa uma raça extremamente resistente ao *B. microplus*, os dados obtidos com o emprego de técnicas moleculares de detecção dos parasitas da TPB poderiam esclarecer se a maior resistência desses animais, que se manifesta tanto em termos de dificultar o desenvolvimento dos carrapatos bem como dos agentes por eles transmitidos (MADRUGA et al. 1984), seria suficiente para sobrepujar as condições climáticas que nessa região são amplamente favoráveis ao desenvolvimento dos carrapatos e em uma propriedade que não utiliza métodos de controle de carrapatos e de hemoparasitas.

A primeira evidência de que os agentes da TPB ocorrem de forma endêmica estável na propriedade em que esse trabalho foi realizado, foi a constatação de um equilíbrio na relação parasita-hospedeiro, característico de regiões de estabilidade enzoótica. Esse equilíbrio evidenciou-se inicialmente pela ausência de sinais clínicos característicos da TPB, como apatia, prostração, perda de peso, hemoglobinúria no caso de babesiose e icterícia no caso de anaplasmosse (KESSLER & SCHENK, 1998^b), confirmando-se pelo fato de que ao longo de um ano de experimento, apenas em um pequeno número de amostras de sangue foram observadas alterações nos parâmetros hematológicos relacionados à patogenia desses parasitas, tais como: contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume globular. No entanto, mesmo nesses casos, não foi possível

estabelecer uma associação entre as alterações hematológicas e a presença de hemoparasitas.

Considerando que a anemia é proporcional à parasitemia (RADOSTITIS, 2000) e ocorre em função de alterações hemodinâmicas resultantes da hemólise intravascular disseminada e também de mecanismos como seqüestro e lise de eritrócitos normais e parasitados (ARAGON, 1976, ALFONSO et al., 1996), é possível que os níveis de parasitemia apresentados pelos animais avaliados estivessem abaixo do limiar necessário para produzir doença clínica. De acordo com COLEMAN, et al. (2001) a presença de animais com baixos níveis de parasitemia é um dos fatores que favorecem a instalação e manutenção de um quadro de estabilidade endêmica.

Mesmo no caso dos dois animais em que os parâmetros hematológicos indicativos de anemia foram detectados concomitantemente com uma ou mais espécies de hemoparasitas, os animais se recuperaram sem que houvesse necessidade de tratamento. Embora não se possa afirmar categoricamente, essas alterações poderiam estar associadas à infecção recente por um ou mais agentes da TPB, pois de acordo com MENDONÇA et al. (2002), bezerros Nelore experimentalmente infectados com *B. bigemina* apresentaram alterações na contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume globular, dois e quatro dias após a inoculação, porém cerca de 16 dias depois, esses valores retornaram próximos aos níveis anteriores.

A leucocitose observada em um grande número de amostras do presente trabalho é uma alteração freqüentemente relatada em bovinos submetidos a infecções experimentais por *B. bigemina* (MENDONÇA et al. 2002), *B. bigemina* e *B. bovis* (KOHAYAGAWA et al. 1990) e *A. marginale* (ALFONSO et al. 1996). No

entanto, não seria prudente atribuir essa leucocitose à infecção por hemoparasitas, pois alterações nas contagens de leucócitos podem estar relacionadas a uma série de fatores, como infecções por agentes virais, fungos, bactérias, helmintos e outros protozoários.

Como os animais eram mantidos em pasto, sob regime de criação extensiva, e não se observou uma associação na detecção simultânea de leucocitose e a presença de *Babesia* spp. e/ou *A. marginale*, não é possível precisar a contribuição dessas infecções na ocorrência de leucocitose.

De um modo geral, as manifestações clínicas de TPB são mais raras em animais zebuínos, como o Nelore e seus cruzamentos (BOCK et al., 1997), sendo essa resistência ainda mais evidente quando esses animais são nascidos em áreas endêmicas para os agentes da TPB e não compartilham pastagens com animais de origem européia (MADRUGA et al., 1984; SOARES et al., 2000; SOUZA et al., 2000). Essa parece ser a situação da propriedade estudada, já que ao longo de um ano de experimento, não foram observados casos clínicos de babesiose e/ou anaplasmose nos bezerros.

No entanto, há que se destacar que nessa propriedade há registros de ocorrência de TPB, inclusive com óbito tanto de bezerros como de bovinos adultos. Esse fato não se contrapõe a uma situação de endemia estável, pois de acordo com COLEMAN et al. (2001), são dois os critérios mínimos para se classificar uma situação como sendo de endemia estável: primeiro que a enfermidade clínica é mais provável (ou mais grave) em animais adultos que em animais jovens; segundo, que a infecção inicial diminui a probabilidade de infecções subseqüentes ou a probabilidade de que as infecções subseqüentes resultem em enfermidade clínica. Portanto, considerando as avaliações clínicas dos animais ao longo do primeiro ano

de vida, e também o histórico da propriedade, tem-se mais uma indicação de que os agentes da TPB se mantêm na propriedade sob a forma de endemia estável, a despeito da resistência dos animais aos carrapatos.

No que se refere à resistência dos animais do rebanho aos carrapatos, algumas constatações suportam a idéia de que ela se apresenta em níveis elevados. Em primeiro lugar, há que se destacar que embora a propriedade esteja localizada em uma região cujas condições climáticas propiciam a ocorrência de parasitismo por carrapatos ao longo de todo o ano (FONSECA et al., 1997), não se utiliza nenhum método de controle para *B. microplus* na propriedade. Esses dados indicam fortemente que, mesmo sob condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento dos carrapatos, a resistência dos animais pode ser decisiva na dinâmica das infestações. Constatações semelhantes foram feitas por WAMBURA et al. (1998), que concluíram ser a raça dos bovinos um fator determinante do nível de infestações dos animais de um rebanho.

De acordo com as informações disponíveis, de modo geral, sob uma mesma condição de exposição às formas de vida livre, bovinos de raças zebuínas puras (*Bos taurus indicus*) albergam apenas 10 a 20% dos carrapatos que parasitam os taurinos puros (*Bos taurus indicus*) (JONSSON, 2006).

Outro dado que atesta a elevada resistência dos animais experimentais ao carrapato é a constatação de que, embora o parasitismo tenha sido observado ao longo da maioria dos meses do ano, predominaram nos bezerros formas imaturas de *B. microplus* de forma que apenas 27 teleóginas foram encontradas nesse período.

Portanto, a estimativa dos níveis populacionais de carrapatos a partir do parasitismo de animais jovens pode fornecer uma subestimação dessa população, já

que existe uma associação estreita entre idade dos bovinos e número de carrapatos adultos que albergam.

UTECH et al. (1978) verificaram que bezerros jovens apresentam menor susceptibilidade aos carrapatos que os animais mais velhos. Fato semelhante foi assinalado por OLIVEIRA (2002) que ao investigar a dinâmica das infecções por *B. bigemina* em bovinos mestiços leiteiros constatou que os bezerros albergavam uma população de carrapatos significativamente inferior à das vacas de um mesmo rebanho.

De acordo com MAHONEY et al. (1981), os bezerros respondem somente por 25% da população total de carrapatos em uma propriedade. Dessa forma, é razoável supor que o parasitismo dos bezerros pelas formas imaturas do carrapato ao longo da maior parte do ano tenha sido garantido pelas fêmeas que se ingurgitam nos animais adultos do rebanho.

Tendo em vista as considerações de UILENBERG (1995), de que a elevada resistência dos animais de origem zebuína, teoricamente, seria suficiente para reduzir a taxa de inoculação de *Babesia* necessária à manutenção da estabilidade endêmica, amostras de soro dos bezerros foram colhidas ao longo de todo o ano, para a pesquisa de anticorpos específicos contra os agentes da TPB, já que a probabilidade de ocorrência de surtos pode ser estimada, indiretamente, pela avaliação da proporção de bezerros infectados através da detecção dos níveis de anticorpos específicos na população (MAHONEY et al., 1973, FAO, 1984).

A grande maioria dos estudos epidemiológicos sobre tristeza parasitária bovina no Brasil é baseada em testes sorológicos, sendo o ensaio de imunoadsorção enzimático indireto (ELISA-I) uma das técnicas mais comumente utilizadas. Além da objetividade proporcionada pela leitura automática, é uma

técnica que permite a análise de um grande número de amostras em um curto intervalo de tempo (MADRUGA et al., 2001).

Ao se analisar os resultados dos exames de ELISA para os três hemoparasitas, constata-se que anticorpos específicos foram detectados na maioria dos animais imediatamente após o nascimento (82% para *B. bovis*; 88% para *B. bigemina*; 94% para *A. marginale*). Esses anticorpos, de origem colostrar, explicam os baixos níveis de parasitemia e a ausência de enfermidade clínica nos bezerros nos primeiros meses de vida, sendo esta uma característica clássica de região endêmica (MAHONEY & ROSS, 1972; GUGLIELMONE, 1995).

A detecção de elevado número de animais soropositivos após os nove meses de idade (100% para *B. bovis*; 94% para *B. bigemina*; 100% para *A. marginale*), muito provavelmente é consequência do desenvolvimento de imunidade ativa, indicando haver uma taxa de inoculação suficiente para manutenção da estabilidade. Em síntese, a detecção desses anticorpos, nessas duas ocasiões críticas, constitui uma forte evidência de que a transmissão desses parasitas ocorre em níveis suficientes para que os anticorpos possam ser transferidos para os bezerros via colostro e também em níveis suficientes para induzir imunidade ativa na maioria dos animais, antes que percam a resistência etária aos agentes da TPB, por volta dos nove meses de idade (UILENBERG, 1995).

Em grande parte do território nacional predominam áreas de estabilidade endêmica para os agentes da TPB, nas quais a ocorrência de casos clínicos é inesperada. Entretanto, casos de babesiose em bezerros foram atribuídos à existência de uma “janela imunológica”, (MADRUGA et al. 1984), entre 28 e 56 dias após o nascimento dos bezerros para *B. bigemina* e entre 56 e 84 dias, no caso de *B. bovis*.

No presente trabalho, o período em que não foram detectados anticorpos no soro dos animais foi mais longo que o obtido por esses autores, porém pode corresponder a essa “janela imunológica”. A não ocorrência de enfermidade clínica durante esse período em que não foram detectados anticorpos nos bezerras do presente experimento pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao baixo desafio pelos carrapatos. No entanto, há autores que consideram que a resistência dos animais jovens às infecções por *B. bovis*, *B. bigemina* (BROWN et al., 2006, ZINTL et al., 2005) e *A. marginale* (UILENBERG, 1995), independe da imunidade materna.

As técnicas de diagnóstico sorológico têm sido extremamente úteis na investigação da epidemiologia das babesioses e da anaplasmoze, servindo inclusive de base para a proposição de modelos matemáticos destinados a avaliar os riscos de ocorrência de enfermidade e para a proposição de medidas de controle em diferentes regiões ecológicas (SOLORIO-RIVERA et al., 1999).

Apesar da elevada sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos, uma das principais limitações é que eles apenas indicam a exposição ao agente, não informando sobre o estágio da infecção (WAGNER et al., 1992). Com isso, não permitem identificar os animais que no início da infecção ainda não desenvolveram resposta imune e nem distinguir os animais soropositivos que estão de fato infectados dos que eliminaram a infecção. Do ponto de vista epidemiológico, é importante identificar os animais verdadeiramente infectados, pois eles constituem a principal fonte de infecção para os carrapatos.

A detecção microscópica de hemoparasitas em esfregaços de sangue é considerada a melhor técnica diagnóstica para animais clinicamente afetados, porque é um exame de baixo custo e que, por permitir a observação de detalhes morfológicos do parasita, é absolutamente específico. No entanto, a execução

desses exames requer pessoas treinadas para determinar as espécies envolvidas, principalmente, quando as parasitemias por *B. bovis* e *B. bigemina* são muito baixas, dificultando a identificação específica (BÖSE et al., 1995).

No presente estudo, merozoítas de *B. bovis* não foram detectados em esfregaços sangüíneos ao longo do primeiro ano de vida dos bezerros. Além da sensibilidade intrínseca do método de esfregaço ser baixa, no caso de *B. bovis* tem-se ainda o inconveniente dos baixos níveis de parasitemia comumente apresentados por bovinos portadores da infecção (JACKSON et al. 2001). Assim sendo, a visualização de merozoítas é mais provável em sangue de bovinos com sintomatologia clínica (RODRIGUES et al., 2005).

Uma das explicações para as baixas parasitemias nas infecções por *B. bovis* é a predileção dessa espécie pelos capilares viscerais, fazendo com que os merozoítas ocorram em pequeno número na circulação periférica (CALDER et al., 1996). Segundo COOKE et al. (2005), esse fenômeno de “visceralização” observado na infecção por *B. bovis* é conseqüência de alterações morfológicas observadas nos eritrócitos bovinos parasitados, nos quais observa-se a formação de protuberâncias na membrana celular; essas estruturas foram denominadas de “stellate protusions” por AIKAWA et al. (1985).

A maior resistência dos animais jovens, especialmente de bovinos de raças zebuínas à infecção por *B. bovis* (BOCK et al., 1997), é outra causa de baixas parasitemias, podendo ser outro fator responsável pelo fato de não terem sido encontrados merozoítas dessa espécie no sangue dos bezerros. Essa pode ser, inclusive, a explicação para o fato de nossos resultados serem distintos dos de OLIVEIRA et al. (2005) que encontraram merozoítas de *B. bovis* em 11% (3/27) dos

bezerros mestiços leiteiros (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) criados em região com as mesmas características climáticas, também no Estado de São Paulo.

O encontro de merozoítas de *B. bigemina* nos esfregaços sangüíneos de quatro animais, corresponde a 1,96% das amostras de sangue colhidas dos 17 bezerros ao longo de um ano. Apesar de estudos conduzidos na América do Sul haverem demonstrado que a prevalência *B. bigemina* é maior que a de *B. bovis* (YOUNG, 1988), ao menos em termos de soroprevalência, o encontro de merozoítas de *B. bigemina* em maior número de animais não deve ser interpretado como reforço dessa afirmação, visto que no caso de *B. bovis* a baixa sensibilidade da técnica de esfregaço é ainda mais significativa por causa da biologia do protozoário.

A detecção de corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* foi feita em um número significativo de animais (14), oito dos quais em mais de uma ocasião. A maior eficiência desse método em detectar a presença dessa rickettsia pode ser atribuída ao fato de que nas infecções iniciais, 10 a 90% dos eritrócitos podem ser parasitados. Embora na maioria das vezes os animais que se recuperam da infecção convertam-se em portadores crônicos, nos quais o parasita persiste em níveis muito baixos, a detecção de *A. marginale* em mais de uma ocasião revela que os baixos níveis de parasitismo nem sempre se encontram abaixo do limiar de detecção microscópica. De acordo com as considerações de KIESER et al. (1990), a multiplicação cíclica dessa rickettsia pode estar relacionada à geração de variantes antigênicas.

A exceção de um animal cuja primeira detecção de *Anaplasma* se deu aos dois meses de idade, na maioria dos animais os corpúsculos de *A. marginale* só foram detectados a partir do mês de julho, quando os animais tinham pelo menos seis meses de idade. Esses resultados são comparáveis aos obtidos em Minas

Gerais (MELO et al., 2001) onde foi detectada a infecção quando os animais tinham seis a sete meses de idade, quando se encontravam mais vulneráveis à doença, já que a susceptibilidade aumenta com a idade e com o fim da proteção colostrálica.

Uma das principais limitações das técnicas de detecção microscópica dos agentes da TPB nos hospedeiros vertebrados é a sua baixa sensibilidade em detectar os protozoários quando as parasitemias são baixas, como, por exemplo, nas fases iniciais da infecção e quando os animais se convertem em portadores (CALDER et al., 1996). Em se tratando de estudos epidemiológicos essa limitação torna-se ainda mais drástica, pois a identificação dos animais portadores é indispensável para quantificar as fontes de infecção para os hospedeiros invertebrados desses agentes.

A PCR empregada no presente trabalho para detectar as infecções por *Babesia* spp. e *A. marginale*, é considerada uma técnica capaz de detectar parasitemias extremamente baixas, com sensibilidade 100 vezes maior que os limites da microscopia óptica, detectando cerca de 10 pg de DNA. Além disso, a sensibilidade poder ser ampliada ainda mais com o uso de uma segunda amplificação pela "nested" PCR (BÖSE et al., 1995). Além dessas vantagens é uma metodologia que também possibilita a discriminação das espécies envolvidas (ALMERIA et al., 2001). Tais características têm sido ressaltadas em diversos trabalhos científicos em que essas técnicas foram utilizadas na investigação de infecções por *Babesia* spp. (FIGUEROA et al., 1996; ALMERIA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005; COSTA-JUNIOR et al., 2006) e *Anaplasma* (FIGUEROA et al., 1996; OSAKI et al., 2002).

Utilizando a técnica de PCR, a presença de DNA de *B. bovis* (1 animal) e de *A. marginale* (1 animal) foi detectada em animais com menos de 24 horas de

nascimento, evidenciando a ocorrência de transmissão congênita por esses dois hemoparasitas. Embora a transmissão congênita de *A. marginale* e de diferentes espécies de *Babesia* seja amplamente admitida, as poucas descrições de transmissão vertical, tanto de *Babesia* (BARBOSA et al., 1994, BRACARENSE et al., 2001, YERUHAM et al., 2003) como de *Anaplasma* (NORTON et al., 1983, ZAUGG, 1985, RIBEIRO et al., 1996), registradas na bibliografia, restringem-se a casos cujo diagnóstico foi feito pela detecção dos parasitas no sangue ou em órgãos de animais que morreram em virtude das infecções ou de animais com graves manifestações de enfermidade hemolítica.

NORTON et al. (1983) consideraram que no caso de *A. marginale* a infecção transplacentária poderia ser a causa de muitas das perdas neonatais não diagnosticadas de bezerros. No entanto, para alguns autores a transmissão congênita desses hemoparasitas é um evento raro (OSAKI et al., 2002), de pouca importância epidemiológica e que no caso de *Babesia* provavelmente envolveria alterações patológicas da placenta (YERUHAM et al., 2003).

Embora a utilização das técnicas moleculares de diagnóstico seja ainda incipiente na investigação da epidemiologia das hemoparasitoses de bovinos, existe pelo menos mais um registro de transmissão congênita de *B. bovis*, no Brasil (OSAKI et al., 2002). Nos dois casos relatados por esses autores, os animais eram assintomáticos e a detecção do parasita só foi possível pela amplificação de DNA (nPCR). Com isso, esses registros podem ser os primeiros a consubstanciar a hipótese de que a transmissão congênita desses hemoparasitas seja bem mais freqüente e, conseqüentemente, possa ter um papel muito mais expressivo na epidemiologia dessas parasitoses do que o atualmente admitido.

Além de haver propiciado a detecção de infecções congênitas, os resultados obtidos pela amplificação de DNA indicam que o número de bezerros nelore infectados pelas três espécies dos hemoparasitas estudados é significativamente maior que o detectado pelo exame direto das amostras de sangue.

Apesar da alta sensibilidade e especificidade das técnicas baseadas em amplificação do DNA (PCR/nPCR), casos de falso-negativos podem ocorrer, principalmente em consequência da presença de substâncias inibidoras da polimerase, presentes comumente em amostras de sangue e em alguns materiais biológicos (HAYDEN, 1991).

No presente experimento, a possibilidade de ocorrência de falso-negativos foi prevenida pela utilização de uma coluna especial para a extração das amostras de DNA, que propicia a obtenção de amostras com baixa contaminação por substâncias que possam inibir a reação de amplificação. No entanto, mesmo com esses procedimentos a ocorrência de resultados falso-negativos não pode ser excluída devido a outros fatores. No presente trabalho, os possíveis resultados falso-negativos devem ser atribuídos ao limiar de sensibilidade de cada técnica utilizada que se situa em torno de 0,00003% de eritrócitos parasitados nas reações de PCR e de 0,0000003% nas reações de nPCR, respectivamente.

Uma evidência de que ocorreram resultados falso-negativos em função do limiar de sensibilidade das técnicas de amplificação de DNA é a constatação de que das sete amostras positivas para *B. bovis*, 3 necessitaram de uma segunda amplificação pela nPCR; no caso de *B. bigemina*, das 47 amostras positivas, 22 foram detectadas pela técnica de nPCR.

Essa constatação indica que as parasitemias por *Babesia* podem ocorrer em níveis abaixo do limiar de sensibilidade da PCR, já que quase metade das amostras

em que foram detectadas o DNA dos parasitas, a detecção foi realizada exclusivamente pela técnica de nPCR. Como a reação de nPCR não apresenta sensibilidade de 100%, não é possível descartar a possibilidade de resultados falso-negativos também com essa técnica.

Devido à elevada sensibilidade dos testes baseados em amplificação de DNA, a ocorrência de falso-positivos tem sido constatada e relacionada, principalmente, à contaminação por aerossóis de DNA amplificado (amplicons). Para se evitar essa contaminação foram adotadas medidas preventivas como execução de cada etapa da técnica em ambientes distintos e exclusivos, a esterilização dos materiais utilizados e estabelecimento de áreas isoladas dentro do laboratório, munidas de lâmpadas UV para a realização dos procedimentos.

Para verificação da eficácia dessas medidas, em cada bateria de reações foi incluída uma amostra sem DNA para controle da contaminação por amplicons. Dessa forma, é improvável que as taxas de infecções detectadas nos hospedeiros vertebrados possam estar sobreestimadas.

No presente estudo, o número de amostras positivas para *B. bigemina* foi maior que o de *B. bovis*, independentemente do método utilizado. Contudo, esse resultado não deve ser interpretado como evidência de que na propriedade a prevalência de *B. bigemina* seja mais elevada, principalmente, porque, a partir de outubro de 2004, quando os animais tinham entre 258 e 281 dias de vida, o número de bovinos soropositivos para as duas espécies de *Babesia* foi semelhante. Esse dado, além de comprovar que ambas as parasitoses ocorrem de forma endêmica estável, demonstra a utilidade dos métodos sorológicos na investigação epidemiológica desses hemoparasitas. Isso porque, somente pela sorologia foi possível constatar que essas duas espécies requerem níveis distintos de exposição

para produzir taxas semelhantes de infecção, como freqüentemente se observa em áreas em que as duas espécies ocorrem sob a forma de estabilidade enzoótica (SOARES et al., 2000; SOUZA et al., 2000; BARROS et al., 2005).

Um quadro distinto desse apresentado pelas duas espécies de *Babesia* foi observado em relação à detecção de infecções por *A. marginale*. Nesse caso, o número de amostras sorologicamente positivas foi semelhante ao de amostras nas quais se detectou o DNA do parasita. A detecção freqüente de corpúsculos de *Anaplasma* em exames diretos de esfregaços sangüíneos, em várias ocasiões com parasitemias elevadas, indicam que a densidade dos hemoparasitas nas amostras é responsável pelo elevado número de amostras positivas pelas técnicas de amplificação de DNA. Esses resultados se explicam pela própria biologia da rickettsia: após as infecções primárias, os parasitas persistem no organismo dos hospedeiros (KIESER et al., 1990), produzindo ciclos de rickettsemia a intervalos de aproximadamente 5 semanas (ERICKS et al. 1993).

A freqüência de infecções por *Babesia* spp. e *A. marginale*, nas teleóginas de *B. microplus* colhidas dos bezerros durante um ano, foi investigada utilizando a técnica de esfregaços de hemolinfa e a de nPCR. Como na nPCR os produtos da amplificação da PCR são submetidos a uma nova amplificação, aumenta-se o limiar de sensibilidade, diminuindo-se a possibilidade de resultados falso-negativos de forma a se detectar, no laboratório, resultados mais próximos da realidade (BOSE et al., 1995; COSTA-JUNIOR et al., 2006).

No que se refere à pesquisa de infecção nos carrapato, é necessário que se faça uma ressalva quanto ao número de teleóginas colhidas ao longo de um ano de experimento. De acordo com as informações disponíveis sobre a dinâmica das populações de *B. microplus* na Região Sudeste, o parasitismo dos bovinos ocorre

ao longo de todo o ano, com maiores infestações sendo observadas no período de outubro a abril (FONSECA et al., 1997). Dessa forma, o fato de terem sido obtidas apenas 27 teleóginas ao longo de um ano pode ser atribuído à elevada resistência dos animais aos carrapatos. Além de se tratar de uma raça altamente resistente aos carrapatos, é também sabido que bovinos jovens são também mais resistentes que os adultos. UTECH et al. (1978) verificaram que os bezerros jovens são menos susceptíveis aos carrapatos que os animais mais velhos, o mesmo tendo sido observado por OLIVEIRA et al (2005) ao trabalhar com bovinos leiteiros no Estado de São Paulo.

Em função do pequeno número de carrapatos coletados, os dados relativos à infecção dos carrapatos obtidos foram analisados com reserva já que não podem ser comparados quantitativamente com o de outros autores que trabalharam com número significativo de teleóginas. Apesar dessa ressalva, é provável que o fato de não terem sido detectadas formas evolutivas de *Babesia* spp. no exame direto da hemolinfa das teleóginas possa ser atribuído inicialmente à ausência de parasitemia de *B. bovis* e às baixas parasitemias de *B. bigemina* no hospedeiro vertebrado. Essas parasitemias, por sua vez, podem ser influenciadas por diferentes variáveis, como idade, raça, e intensidade de controle de carrapatos. Com isso, indiretamente, estas variáveis podem interferir na taxa de infecção por *Babesia* spp. em fêmeas de *Boophilus*. De acordo com RIEK (1964, 1966) poucas teleóginas se infectam em bovinos com baixa parasitemia. OLIVEIRA et al. (2005) observaram uma associação positiva entre a parasitemia do hospedeiro vertebrado e a presença de esporocinetos na hemolinfa de teleóginas e SANTOS et al. (1998) relataram que no caso de *B. bigemina* a parasitemia no hospedeiro vertebrado também influencia a transmissão transovariana do protozoário.

No que se refere à detecção de DNA de *Babesia*, apenas o DNA de *B. bigemina* foi detectado, mesmo assim em apenas duas das 27 teleóginas colhidas. A maioria dos autores que investigaram aspectos da transmissão de *Babesia* spp. utilizaram a técnica de esfregaço de hemolinfa para detectar as infecções de teleóginas alimentadas em animais experimentalmente infectados. Esses autores observaram que as infecções por *B. bigemina* em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* foram mais frequentes do que as infecções por *B. bovis* (RIEK, 1964; 1966; MAHONEY & MIRRE, 1971; 1977), o que de certa forma também foi observado no presente trabalho.

Além da parasitemia, OLIVEIRA-SEQUEIRA et al. (2005) observaram que as infecções por *Babesia* nos carrapatos eram também influenciadas pela idade dos animais. Estes autores constataram que a frequência de infecções por *B. bovis* em teleóginas ingurgitadas em bezerros era menor do que em teleóginas alimentadas em vacas adultas, ocorrendo o oposto em relação a *B. bigemina*.

Embora as técnicas de biologia molecular venham sendo amplamente utilizadas para investigar as interações entre carrapatos e *A. marginale*, poucos estudos foram dedicados a investigar quantitativamente a frequência de carrapatos infectados, especialmente, em condições naturais. No presente trabalho, o DNA de *A. marginale* foi detectado em 18 teleóginas (18/27) das quais 13 haviam sido colhidas em agosto e setembro de 2004, meses em que o número de teleóginas que parasitavam os bezerros também foi maior (11 e 10, respectivamente).

A detecção de DNA de *A. marginale* nessas teleóginas, na proporção encontrada, constitui uma evidência de que o isolado que circula nos animais da região investigada é altamente infectante para *B. microplus*. Entretanto, embora não constitua evidência de que possam ser transmitidos transovarianamente para ovos e

larvas, a habilidade de um determinado isolado infectar os tecidos dos carrapatos é condição determinante para que seja transmitido por estes artrópodes (de la FUENTE et al., 2001).

É importante destacar que a extração de DNA dos carrapatos foi realizada 15 dias após a colheita das teleóginas, e que, por isso, o material amplificado foi considerado como sendo derivado do desenvolvimento do parasita nos tecidos da teleógina e não de material presente no sangue ingerido pelo artrópode.

Considera-se que, em termos epidemiológicos, a transmissão biológica de *A. marginale* é indispensável, pois assegura que bovinos portadores constituam uma fonte constante de infecção para os carrapatos, independentemente do nível de rickettsemia. Dessa forma, AGUIRRE et al. (1994) verificaram serem necessários apenas três carrapatos adultos alimentados quando ninfas em bezerro com menos de 1% de parasitemia para transmitir *A. marginale* para outro bezerro. De modo semelhante, SCOLES et al. (2005) verificaram serem necessários apenas 3 exemplares de *D. andersoni* para transmitir *A. marginale* após haverem se alimentado em animal com rickettsemia 300 vezes inferior ao utilizado sem sucesso na tentativa de promover a transmissão mecânica por *Stomoxys calcitrans*. Portanto, de acordo com estes autores, como a transmissão mecânica, por insetos hematófagos, depende dos níveis de parasitemia, ela só seria possível durante a fase aguda da infecção.

Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de transmissão mecânica por insetos hematófagos na região, pois existem cepas de *A. marginale* incapazes de infectar carrapatos, cuja transmissibilidade pode estar relacionada à capacidade dessas cepas de interagir de forma distinta com os vetores mecânicos (SCOLES et al., 2005). Por isso, como não foi realizada a

caracterização genotípica do DNA colhido dos bezerros e das teleóginas, os dados do presente trabalho não possibilitam avaliar de forma precisa a real dimensão da participação de *B. microplus* na epidemiologia de *A. marginale* nessa região.

A utilização de técnicas tradicionais de investigação epidemiológica em associação com técnicas de diagnóstico molecular produziu, no presente trabalho, alguns resultados que se contrapõem a alguns conceitos ou expectativas a respeito da epidemiologia dessas parasitoses e outros que confirmam o saber estabelecido. Em primeiro lugar, não confirmam a expectativa de que a elevada resistência de bovinos *Bos taurus indicus* possa dar origem a uma situação de instabilidade endêmica (UILEMBERG, 1995). De acordo com esse autor, a estabilidade, pelo menos no que diz respeito às babesioses, depende da taxa de inoculação e portanto do número de carrapatos. No entanto, recentemente GU et al. (2003) constataram que a prevalência de infecções por *Plasmodium falciparum* em comunidades africanas pode ser elevada e estável, mesmo em áreas de baixa taxa de transmissão, onde as pessoas são expostas a poucas picadas infectantes por ano. Segundo esses autores, a associação entre elevadas prevalências e baixa taxa de transmissibilidade estaria relacionada aos baixos índices de recuperação, ou seja, ao caráter crônico das infecções por esses parasitas. Não seria surpreendente que essa pudesse ser mais uma das características comuns entre os parasitas dos gêneros *Babesia* e *Plasmodium*.

Os vários aspectos clínicos e epidemiológicos compartilhados pelos três agentes da denominada “Tristeza Parasitária dos Bovinos” têm levado a generalizações que nem sempre correspondem à realidade, mesmo quando essas generalizações se restringem às duas espécies de *Babesia*. No caso de *A. marginale* a situação é ainda mais complexa, mesmo porque, muitos dos fatores

envolvidos na epidemiologia e na transmissão dessa rickettsia não estão estabelecidos.

No presente trabalho os resultados revelaram que as características epidemiológicas das infecções pelos três hemoparasitas dos bovinos satisfazem os critérios propostos por COLEMAN et al. (2001) para classificar a ocorrência como sendo de estabilidade endêmica, porém, cada uma dessas espécies parece utilizar diferentes estratégias para produzir uma situação que HAY (2001) classificou como paradoxal: “nessa situação, a diminuição da frequência de infecção pode desencadear o aumento do número de casos de enfermidade clínica”.

7. Conclusões

A investigação clínico-epidemiológica das infecções por *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* (agentes da TPB) durante o primeiro ano de vida de bezerros da raça Nelore, possibilitou as seguintes conclusões:

1. As infecções dos bovinos ocorrem sob forma de endemia estável na propriedade estudada, apesar da frequência do parasitismo pelos três agentes variar tanto nos hospedeiros vertebrados como nos carrapatos vetores.
2. A resistência dos bezerros da raça Nelore, nascidos em área endêmica, faz com que as infecções naturais pelos agentes da TPB não produzam alterações significativas nos parâmetros clínico-hematológicos indicativos de anemia, dispensando com isso a instituição de tratamento específico.
3. Na propriedade investigada, a criação exclusiva de bovinos da raça Nelore, por mais de 20 anos, não foi suficiente para alterar a característica epidemiológica de ocorrência dos agentes da TPB na região.
4. A baixa frequência de infecções por *B. bovis* e *B. bigemina* em teleóginas de *B. microplus* que se ingurgitaram nos bezerros Nelore, associada à elevada frequência de animais com sorologia positiva para esses agentes, indica que os bovinos adultos sejam os principais responsáveis pela infecção dos carrapatos em níveis suficientes para manter o estado de endemia estável.
5. A utilização das técnicas de PCR/nPCR para o diagnóstico de infecções por *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* possibilitou a detecção de infecções

transplacentárias por ambos os agentes, indicando que essa via possa ter uma importância epidemiológica mais expressiva que a até então admitida.

8. Referências Bibliográficas

AGUIRRE DH, GAIDO AB, VINABAL AE, DE ECHAIDE ST, GUGLIELMONE AA. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. Parasite. v.1, n.4, p.405-7, 1994.

AIKAWA M, UDEINYA IJ, RABBEGE J, DAYAN M, LEECH JH, HOWARD RJ, MILLER LH. Structural alteration of the membrane of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. J. Protozool., v.32, n.3, p.424-9, 1985.

ALFONSO, J; MEDINA, R; FAZZINO, F; CABALLERO, H. Câmbios clínicos y hematológicos em becerros infectados com *Anaplasma marginale*. Acta Cien. Venez. v.47, p.50-7, 1996.

ALMERIA, S. CASTELLA, J; FERRER, D; ORTUÑO, A; ESTRADA-PEÑA, A; GUTIERREZ J.F. Bovine piroplasmosis in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. Vet. Parasitol. v.99, p.249-59, 2001.

ARAGON, R.S. Bovine babesiosis: a review. Vet. Bull., v.46, p.903-17, 1976.

BANNOR, T.T. Babesiosis in neonatal calves: a case report. Bull Anim Health Prod. v.24, n.3, p.267-9, 1976.

BARBET AF. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. Vet Parasitol. v.57 n.1-3, p.43-9, 1995.

BARBOSA, M.F.R., COSTA, J.O., TAFURI, W.L. Transmissão congênita de *Babesia bovis*: relato de um caso autóctone em Minas Gerais – Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zoo. v.46, p.519-526, 1994.

BARKER, R.H; DNA probe diagnosis of parasitic infections. Exp. Parasitol. v. 70, p.494-99, 1990.

BARREIRA, J.D; ROSSI, M.E; SILVA, G.V.O; PIRES, F.A; MASSARD, C.L. Caracterização morfológica e aspectos biológicos das formas evolutivas de *Babesia bigemina* (Smith ; Kilborne, 1983) (Protozoa:Babesiidae) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Rev. Bras. Parasitol. Vet. v.14, n.1, p.1-6, 2005.

BARREIRA, J.D; ROSSI, M.E; PIRES, F.A; SILVA, G.V.O; MASSARD, C.L. Dinâmica da infecção de *Babesia bovis* (Babes, 1888, Starcovici, 1893) em fêmeas ingurgitadas e ovos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Ciê. Rur. v.35, n.5, p. 1131-5, 2005.

BARROS, S.L.; MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; MENK, C.F.; ALMEIDA, M.A., MELO, E.P.S.; KESSLER, R.H.; Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of Bahia, Brazil, by enzyme linked immunosorbent assays. Mem. Inst. Osw. Cruz. v.100, n.6, p.613-617, 2005.

BARTLAKOWIAK, J. Molecular methods in the diagnosis of infectious diseases Przeegl Epidemiol.v.57, n.2, p.381-9, 2003.

BOCK, R; JACKSON, L; DE VOS, A. J; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. Parasitol. v.129, p.247-69, 2004.

BOCK, R.E; KINGSTON, T.G; DE VOS, A.J. Effect of breed on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J. v.77, n.11, p.748-51, 1999^a.

BOCK, R.E; KINGSTON, T.G; DE VOS, A.J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J. v.77, n.7, p.461-4, 1999^b.

BOCK, R.E; DE VOS, A.J; KINGSTON, T.G; McLELLAN, D.J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. Aust. Vet. J. v.75, n.5, p.337-40, 1997.

BÖSE, R; JORGENSEN, W.K; DALGLIESH, R.J; FRIEDHOFF, K.T; de VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. Vet. Parasitol. v.57, p.61-74, 1995.

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

BROWN, W.C; NORIMINE, J; KNOWLES, D.P; GOFF, W.L. Immune control of *Babesia bovis* infection. Vet. Parasitol. v. 138, n. 1-2, p. 75-87, 2006.

BUENNING, G.M. & FIGUEROA, J.V. Use of polymerase chain reaction in bovine babesiosis research. Ann N Y Acad Sci. v.23, p. 128-132, 1996.

CALDER, J.A.M; REDDY, G.R; CHIEVES, L; COURTNEY, C.H; LITTLE, R; LIVENGOOD, J.R; NORVAL, R.I; SMITH, C; DAME, J. Monitoring *Babesia bovis* infection in cattle by using PCR-Based tests. J. Clin. Microb. V.34, n.11, p. 2748-55, 1996.

CAFRUNE, M.M.; AGUIRRE, D.H. experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. Res. Vet. Science, v.58, p.284-85, 1995.

CEN-AGUILAR, J.F; RODRIGUÉZ-VOVAS, R.I; DOMINGUEZ-ALPIZAR, J.L; WAGNER, G.G. Studies on the effect of infection by *Babesia* sp. on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. Vet. Parasitol. v.78, p.253-7, 1998.

COLEMAN, P.G., PERRY B.D., WOOLHOUSE M.E. Endemic stability- a veterinary idea applied to human public health. Lancet. v.357, n.94, p.1284-6, 2001.

COOKE, B.M.; MOHANDAS, N; COWMAN, A.F; COPPEL, R.L. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. Vet. Parasitol. v.132, p.273-95, 2005.

COSTA-JUNIOR, L.M; RABELO, E.M.L; MARTINS-FILHO, O.A; RIBEIRO, M.F.B; Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. Vet. Parasitol. v. 139, n. 1-3, p. 231-236, 2006.

COSSÍO-BAYÚGAR R, RODRIGUEZ SD, GARCIA-ORTIZ MA, GARCIA-TAPIA D, ABOYTES-TORRES R. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, Mexico. Prev Vet Med. v.32, n. 3-4, p.165-70, 1997.

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. Pesq. Vet. Bras. v.26, n.2, p.74-8, 2006.

DE LA FUENTE J, TORINA A, CARACAPPA S, TUMINO G, FURLA R, ALMAZAN C, KOCAN KM. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. Vet Parasitol. v. 133, n. 4, p.357-62, 2005 (a).

De LA FUENTE J; LEW A; LUTZ H; MELI ML; HOFMANN-LEHMANN R; SHKAP V; MOLAD T; MANGOLD AJ; ALMAZAN C; NARANJO V; GORTAZAR C; TORINA A; CARACAPPA S; GARCIA-PEREZ AL; BARRAL M; OPORTO B; CECI L; CARELLI G; BLOUIN EF; KOCAN, KM. Genetic diversity of anaplasma species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. Anim Health Res Rev. v.6, n.1, p.75-89, 2005 (b).

DE LA FUENTE, J., J. C. GARCIA-GARCIA, E. F. BLOUIN, AND K. M. KOCAN. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle

pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. Int. J. Parasitol. v.31, p.145-153, 2001.

DOWSETT, K.F; DIMMOCK, C.K; HILL, M.W. Haemolytic disease in new born calves. Aust Vet J.v.54, n.2, p.65-7, 1978

EGELI, A.K. Babesiosis in a six-day-old calf. Vet Rec. v.139, n.14, p.344-5, 1996.

ERIKS IS, STILLER D, PALMER GH. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. J Clin Microbiol. v.31, n.8, p.2091-6, 1993.

FAO. Ticks and tick-borne diseases control. A practical field manual. v.II, Rome, p. 301-621, 1984.

FIGHERA, R.A. Anemias hemolíticas infecciosas. IN: FIGHERA, R.A. Anemia em Medicina Veterinária. O autor, p.65-70, 2001.

FIGUEROA, J.V; ALVAREZ, J.A, CANTO, G.J, RAMOS, J.A, MOSQUEDA, J.J, BUENING, G.M. Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. Ann. N. Y. Acad. Science, v.23, n.791, p.117-27, 1996.

FIGUEROA JV, BUENING GM. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. Vet Parasitol. v.57, n.1-3, p.75-92, 1995.

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

FIGUEROA, J.V; CHIEVES, L.P; JOHNSON, G.S; BUENING, G.M. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. J. Clin. Microb. v.30, n.10, p. 2576-82, 1992.

FONSECA, A.H; PEREIRA, M.J.S; MAFRA, C.L. Dinâmica populacional do carrapato *Boophilus microplus* em São Miguel do Anta- MG, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., v.6, n.2, supl.1, p.121, 1997.

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

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. IN: RISTIC, M Babesiosis of domestical animals and man. Florida, p.23-52, 1988.

FUTSE JE, UETI MW, KNOWLES DP JR, PALMER GH. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. J. Clin. Microbiol. v.41, n.8, p.3829-34, 2003.

GALE KR, DIMMOCK CM, GARTSIDE M, LEATCH G. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. Int. J. Parasitol. v.26, n.10, p.1103-9, 1996.

GOFF, W.L; WAGNER, G.G; CRAIG, T.M; LONG, R.F; The bovine immune response to tick-derived *Babesia bovis* infection: Serologic studies of isolated immunoglobulins. Vet. parasitol. v.11, p. 109-20, 1982.

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.

GOMES, A.; HONER, M.R; SCHENCK, M.A; CURVO, J.B.E; Populations of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Ibagé and Nellore x European crossbreds in Brazilian savanna. Trop. Ani. Health Prod. v.21, p. 20-24, 1989.

- GONÇAVES-RUIZ, P.M; PASSOS, L.M; PATARROYO, J.H; RIBEIRO, M.F. Antigenic characterization of morphologically distinct *Anaplasma marginale* isolates using a panel of monoclonal antibodies. Vet Parasitol. v.29, n.107, p.169-77, 2002.
- GRISI, L; MASSARD, C.L; MOYA-BORBA, G.E; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. Hora Vet. v.125, p.8-10, 2002.
- GU W, KILLEEN GF, MBOGO CM, REGENS JL, GITHURE JI, BEIER JC. An individual-based model of *Plasmodium falciparum* malaria transmission on the coast of Kenya. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. v.97, n.1, p.43-50, 2003.
- GUGLIELMONE, A.A; GAIDO, A.B; AGUIRRE, D.H; CAFRUNE, M.M. Some quantitative aspects of natural babesial infection in the haemolymph of *Boophilus microplus* engorged Female ticks. Parasite. V.4, p.337-41, 1997.
- GUGLIELMONE, A.A; GAIDO, A.B; MANGOLD, A.J. Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged females ticks. Vet. Parasitol. v.61, p. 15-20, 1996.
- GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America, Vet. Parasitol. v.57, p. 109-19, 1995.
- GUGLIELMONE, A.A. The level of infestation with the vector of cattle babesiosis in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.87,n. 3, p.133-7, 1992.
- HART, L.T; MORRIS, N.G; BESSIN, R; LEPRINCE D.J; TODD, W.J; ENRIGHT, F.M; LUTHER, D.G. Single step technique for staining *Anaplasma marginale* in bovine blood smears. Am. Journal Vet. Res., v.53, n.10, p.1732-3, 1992.
- HAY, S.I. The paradox of endemic stability. Trends in Parasit., v. 17, n. 7, p. 310, 2001.

HAYDEN, J.D; HO, S.A; HAWKEY, P.M; TAYLOR, G.R; QUIRKE, P. The promises and pitfalls of PCR. Vet. Med. Microbiol., v.2, p.129-37, 1991.

JACKSON L.A., WALDORN, S.j., WEIER H.M., NICOL, C.L., COOKE, B.M. *Babesia bovis*: Culture of laboratory adapted parasite lines and clinical isolates in a chemically defined medium. Exp. Parasitol., v.99, p.168-174, 2001.

JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. Vet. Parasitol., v.137, p.1-10, 2006.

JONSSON, N,N; MATSCHOSS, A.L; PEPPER, P.; GREEN, P.E; ANSELL, J. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*).Vet Parasitol., v.17,n.89, p.297-305, "2000.

KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. Pesq. Vet. Bras., v.21, n.4, p.177-9, 2001.

KESSLER, R.H. & SCHENK, M.A.M. Tristeza parasitária dos bovinos: conceito, Etiologia, Transmissão, Epidemiologia, Diagnóstico e Controle. In: Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos. EMBRAPA Gado de Corte. p.47-68, 1998^a.

KESSLER, R.H. & SCHENK, M.A.M. Diagnóstico parasitológico da tristeza parasitária bovina. In: Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos. EMBRAPA Gado de Corte. p.81-90, 1998^b.

KIESER, S.T; ERIKS, I.S; PALMER, G.H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. Infect Immun. v.58, n.4, p.1117-9, 1990.

KOCAN KM, YOSHIOKA J, SONENSHINE DE, DE LA FUENTE J, CERAUL SM, BLOUIN EF, ALMAZAN C. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen

interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). J Med Entomol. v.42, n.5, p.864-74, 2005.

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. Parasitol., v.129, p.285-300, 2004.

KOCAN, K.M; de la FUENTE, J; GUGLIELMONE, A.A; MELÉNDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. Clin. Micro. Reviews, v.16, n.4, p.698-712, 2003.

KOCAN, K.M; DE LA FUENTE, J; BLOUIM E.F; GARCIA-GARCIA, J.C. Adaptations of the tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, for survival in cattle and ticks. Exp Appl Acarol., v.28, n.1-4, p.9-25, 2002.

KOCAN K.M., STILLER D., GOFF W.L., CLAYPOOL P.L., EDWARDS W., EWING S.A., MCGUIRE T.C., HAIR J.A. & BARRON S.J. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. Am. J. Vet. Res. v.53, n.4, p.499-507, 1992.

KOHAYAGAWA, A; KUCHEMUCK, M.R.G; PAPA, F.O; OLIVEIRA, M.R; ALMEIRDA, C.T; CURI, P.R. Alterações do leucograma de bovinos da raça Fleckvieh (*Bos taurus*) premunidos contra *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. Vet. Zootec., v.2, p. 47-57, 1990

MACHADO, R. Z. Estudo da Imunidade Celular e Humoral na Babesiose Bovina. Jaboticabal, 150 p., 1991. Dissertação (Livre docência) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MACKENSTEDT U, GAUER M, FUCHS P, ZAPF F, SCHEIN E, MEHLHORN H. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. Parasitol Res.v.81, n.7, p. 595-604,1995.

MADRUGA, C. R., MARQUES, A. P. C., ARAÚJO, F. R; UMAKI, A.C.S.; CROCCI, A.J.; QUEIROZ, R.A.. Avaliação de um ELISA para detecção de anticorpos contra *Babesia bigemina* em bovinos e sua aplicação em um inquérito sorológico no Brasil. Pesq. Vet. Bras., v.21, n.2, p.72-76, 2001.

MADRUGA, C.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 imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. Pesq. Vet. Bras., vol.20, no.4, p.167-170, 2000^a.

MADRUGA, C.R., MARQUES, A.P.C.; LEAL, C.R.B; CARVALHO, C.M.E.; ARAÚJO, F.R; KESSLER, R.H. Evaluation of a enzyme linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. Pesq. Vet. Bras., v.20, n.3, p. 109-112, 2000^b.

MADRUGA, C.R.; HORNER, M.R.; SCHENK, M.A.M. Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da tristeza parasitária bovina no Estado de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS : Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, p.1-7, 1987.

MADRUGA, C.R., AYCARDI, E., KESSLER, R.H., SCHENK, M.A.M., FIGUEIREDO, G.R., CURVO, J.B.E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. Pesq. Agropec. Bras., v. 19, n.9, p.1163-8, 1984.

MAHONEY, D.H; WRIGHT, I.G; GODGER, B.V; MIRRE, G.B; SUTHERST, R.W; UTECH, K.B. The transmission of *Babesia bovis* in herds of European and Zebu x European cattle infested with the tick *Boophilus microplus*. Aust. Vet. J., v.57, n.10, p.461-9, 1981

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. Ann. Trop. Med. Parasitol., v.67, p. 197-203, 1973.

MAHONEY, D.F; MIRRE, G.B. The selection of larvae of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). Res. Vet. Science. v. 23, p.126-7, 1977.

MAHONEY, D.F; MIRRE, G.B. Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Ann. Trop. Med. Parasitol., v.65, n.3, p.309-17, 1971.

MAHONEY, D.F; ROSS, D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. Aust. Vet. J., v.48, p.292-8, 1972.

McCOSKER, P.J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M., KRIER, J.P. (Eds). Babesiosis. New York: Academic Press, p.1-19, 1981.

McGUIRE TC, DAVIS WC, BRASSFIELD AL, McELWAIN TF, PALMER GH. Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3. J. Clin. Microbiol. v.29, n.4, p.788-93, 1991.

MELHORN, H. & SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. Adv. Parasitol., v.23, p.37-99, 1984.

MELO, V.S.P; PASSOS, L.M.F; FACURY-FILHO, E.J; SATURNINO, H.M; RIBEIRO, M.F. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy herds of the Metalúrgica Region, Minas Gerais. Pesq. Vet. Bras., v.21, n.4, p.146-50, 2001.

MENDONÇA, C.L; VIEIRA, D; KOHAYAGAWA, A; SCHENK, M.A; MADRUGA, C.R; AFONSO, J.A. Avaliação hematológica em bezerros Nelore infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., v.11, n.2, p.99-101, 2002.

[MOSQUEDA, J](#); [FALCON A](#), [ALVAREZ, J.A](#); [RAMOS J](#); [OROPEZA-HERNANDEZ L.F](#); [FIGUEROA J.V](#). *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are

specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. [Int J Parasitol.](#), v.34, n.11, p.1229-36, 2004.

MOURA, A.; VIDOTTO, O; YAMAMURA, M.H; VIDOTTO, M.C; PEREIRA, A.B.da L. Studies on the *Anaplasma marginale* THEILER, 1910 infection in *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887), using 'nested" PCR. [Rev. Bras. Parasitol. Vet.](#), v.12, n.1, p.27-32, 2003.

MULLIS, K. FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. [Methods Enzymol.](#) v.55, p. 335-50, 1987.

MURASE, T; UEDA,T; YAMAMOTO, O; TAJIMA, M; MAEDE, Y. Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected by *Babesia gibsoni*. [J. Vet. Med. Sci.](#), v.58, p. 259-61, 1996.

NORTON, J.H; PARKER, R.J; FORBES-FAULKNER, J.C. Neonatal anaplasmosis in a calf. [Vet. Rec.](#) v.100, n.3, p.58, 1983.

OLIVEIRA, M.C.S; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G; ARAÚJO Jr., J.P; AMARANTE, A.F.T; OLIVEIRA, H.N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. [Vet. Parasitol.](#) v.130, p.61-7, 2005.

OLIVEIRA JB, MADRUGA CR, SCHENK MA, KESSLER RH, MIGUITA M, ARAUJO FR. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. [Mem. Inst. Oswaldo Cruz.](#) v. 98, n.3, p.395-400, 2003.

OLIVEIRA, M.C.S; Avaliação da taxa de infecção por *Babesia bigemina* em bovinos mestiços leiteiros e em fêmeas e ovos de *Boophilus microplus* provenientes de área endêmica do Estado de São Paulo. Botucatu. 2002. 96p. Tese (Doutorado em Medicina veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., OLIVEIRA, M.C.S., ARAÚJO Jr., J.P., AMARANTE, A.F.T., PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. Int. J. Parasitol., v.35, p.105-111, 2005.

OSAKI, S.C., VIDOTTO, O., MARANA, E.R.M., VIDOTTO, M.C., YOSHIHARA, E., PACHECO, R.C., IGARASHI, M., MINHO, A.P. Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça Nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., v.11, n.2, p.77-83, 2002.

OTIM, C; WILSON, A.J; CAMPBELL, R.S. A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. Aust Vet J., v. 56, n.6, p.262-6, 1980.

PAINE GD, MILLER AS. Anaplasmosis in a newborn calf. Vet Rec. v.15 n.3. p.58, 1977.

PALMER GH, BROWN WC, RURANGIRWA FR. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. Micro. Infect., v.2, n.2, p.167-76, 2000.

PANDEY, N.N., MISHRA, S.S. Studies on clinical symptoms and percentage parasitaemia on experimental *Babesia bigemina* infection in cow calves. Indian. Vet. J., v.55, p.139-143, 1978.

PARKER, R.J; SHEPHERD, R.K; TRUEMAN, K.F; JONES, G.W; KENT, A.S; POLKINGHORNE, I.G. Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. Vet Parasitol., v.17, n.3, p.205-13, 1985.

PASSOS, L.M; LIMA, J.D. Diagnóstico de anaplasmosose bovina congênita em Minas Gerais. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.36, p.743-44, 1984.

POTGIETER, F.T; VAN RENSBURG, L. The persistence of colostral *Anaplasma marginale* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. Ond. J. Vet. Res., v.54, n.4, p.557-60, 1987.

POTGIETER FT, SUTHERLAND B, BIGGS HC. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. Onderstepoort J Vet Res. v.48, n.2, p.119-122, 1981.

POTGIETER, F.T & ELS, H.J. Light electron microscopic observations on the development of small merozoites of *Babesia bovis* in *Boophilus microplus* larvae. Ond. J. Vet. Res., v.43, n.3, p.123-8, 1976.

QUINTÃO-SILVA, M.G; RIBEIRO, M.F.B; Infection rate of *Babesia* spp. sporozoites in engorged *Boophilus microplus* from an area of enzootic stability in the State of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Osw. Cruz., v.98, n.8, p.999-1002, 2003.

RADOSTITS, O.M., GAY,C.C., BLOOD.D.C., HINCHCLIFF, K.W. Veterinary Medicine. 9th ed. W.B. Saunders, London, 1877p., 2000.

REITER, R. & WEILAND, E. Recently developed methods for the detection of babesial infections. Trans R Soc Trop Med Hyg., v.83, p.21-3. 1989.

REYNA-BELLO A, CLOECKAERT A, VIZCAINO N, GONZATTI MI, ASO PM, DUBRAY G, ZYGMUNT MS. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. Clin Diagn Lab Immunol. v.5, n.2, p.259-62, 1998.

RIBEIRO MF, PASSOS LM, GUIMARAES AM. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais State, Brazil. Vet Parasitol. v.1, n.4, p.271-7, 1997.

RIBEIRO, M.F.B; LIMA, J.D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. Vet. Parasitol. v.61, n.1-2, p.31-9, 1996.

RIBEIRO, M.F.B; LIMA, J.D; PATARROYO, J.H.S. Attempted transmission of *Anaplasma marginale* by infected *Boophilus microplus*. Braz. J. Vet. Ani. Sci. v.48, p. 397-402, 1996.

RIBEIRO, M. F. B. ; LIMA, J. D. ; GUIMARAES, A. M. ; SCATAMBURLO, M. A. ; MARTINS, N. E. . Transmissão congênita da anaplasmosse bovina. Arq. Bras. de Med. Vet. e Zootec., v. 47, n. 3, p. 297-304, 1995.

RIEK, R.F. The cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa : Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust. J. Agric. Res., v.17, p.247-54, 1966.

RIEK, R.F. The cycle of *Babesia bigemina* (Smith & kilborne , 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust. J. Agric. Res., v.15, p.802-21, 1964.

RISTIC M, CARSON CA. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. Adv. Exp. Med. Biol.v.93, p.151-88, 1977.

RODRIGUES, A., RECH, R.R., BARROS, R.R., FIGHERA, R.A., BARROS, C.S.L. Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. Ciê. Rur., Santa Maria, v.35 ,n.1, p.121-125, 2005.

SANTOS, T.R.B; GONZALES, J.C; CHIES, J.M; FARIAS, N.A.R. Transmissão transovariana de *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) por partenóginas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Rev. Bras. Parasitol. Vet. v.7, n.1, p.7-10, 1998.

SARTOR, I.F.; FACCINI, J.L.H.; KUCHEMUCK, M.R.G.; CURI, P.R. Estudo comparativo da resistência ao carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARI) Em bovinos das raças Gir, Holandesa e mestiços ½ Gir-Holandês. Rev. Vet. e Zoot. UNESP, São Paulo, 4,p.25-33, 1992.

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, n.4, p.668-75, 2005.

SHIMADA MK, YAMAMURA MH, KAWASAKI PM, TAMEKUNI K, IGARASHI M, VIDOTTO O, VIDOTTO MC. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. Ann N Y Acad Sci. v. 1026, p.95-102, 2004.

SMITH RD, MOLINAR E, LARIOS F, MONROY J, TRIGO F, RISTIC M. Bovine babesiosis: pathogenicity and heterologous species immunity of tick-borne *Babesia bovis* and *B bigemina* infections. Am. J. Vet. Res. v.41, n.12, p.1957-65, 1980.

SOARES, C.O; Princípios, padronização e validações de provas sorológicas. IN: MADRUGA, C.R; ARAÚJO, F.R; SOARES, C.O; Imunodiagnóstico em medicina veterinária. EMBRAPA GADO DE CORTE, Campo Grande. 145-76, 2001.

SOARES, C.O; SOUZA, J.C; MADRUGA, C.R; MADUREIRA, R. C; MASSARD, C.L; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. Pesq. Vet. Bras., v.20, n.1, p.26-30, 2000.

SOLORIO-RIVERA, J.L; RODRIGUEZ-VIVAS, R.I; PEREZ-GUTIERREZ, E; WAGNER, G. Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalence in cattle from eastern Yucatan, Mexico. Prev Vet Med., v.11, n.3-4, p.261-9, 1999.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C. R., CUNHA, N. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. Pesq. Vet. Bras., v.20, n.2, p.75-9, 2000.

SPARAGANO, O.A.E; ALLSOPP, M.T.E.P; MANK, R.A; RIJPKEMA, S.G.T; FIGUEROA, J.V; JONGEJAN, F. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A Review. Exper. Appl. Acarol., v.23, p. 929-60, 1999.

STILLER, D; COAN, D.J. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. Vet. Parasitol., v. 57, n.1-3, , p. 97-108, 1995.

TEGLAS M, MATERN E, LEIN S, FOLEY P, MAHAN SM, FOLEY J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. Vet Parasitol. v.15 n.131, p.119-27, 2005.

TIZARD, I.R. Imunologia Veterinária: Uma Introdução. 6ª Ed. ROCA. São Paulo, 2002. 548p.

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

UILENBERG, G. *Babesia*- A historical overview. Vet. Parasitol., v. 138, n.1-2, p. 3-10, 2006.

UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. Vet. Parasitol., v. 57, n.1-3 p.19-41, 1995.

UTECH, K.B.W; SEIFERT, G.W; WHARTON, R.H. Breeding australian illawarra shorthorn cattle for resistance to *Boophilus microplus*. I. Factors affecting resistance. Aust. J. Agric. Res., v.29, p.411-22, 1978.

VIDOTTO, O. & MARANA, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmose bovina. Ciê. Rur., v.31, n.2, p.361-8, 2001.

VIDOTTO O, MCELWAIN TF, MACHADO RZ, PERRYMAN LE, SUAREZ CE, PALMER GH. *Babesia bigemina*: identification of B cell epitopes associated with parasitized erythrocytes. Exp Parasitol. v. 81, n.4, p.491-500, 1995.

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 *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Rev. Bras. Parasitol. Vet., v.11, n.2, p.71-6, 2002.

WAGNER, G; CRUZ, D; HOLMAN, P; WAGHELA, S. PERRONE, J; SHOMPOLE, S; RURANGIRWA, R. Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. Mem. Inst. Osw. Cruz, v.87, supl.III, p.193-9, 1992.

WAMBURA, P. N; GWAKISA, P. S; SILAYO, R. S; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. Vet. Parasitol., v.77, p.63-70, 1998.

YERUHAM, I; AVIDAR, Y; AROCH, I; HADANI, A; Intra-uterine Infection with *Babesia bovis* in a 2-day-old Calf. J. Vet. Med. Infect. Dis. Vet. Public. Health., v.50, n.2, p.60-2, 2003.

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

ZAUGG, J.L. Bovine anaplasmosis: Transplacental transmission as it relates to stage of gestation. Am. J. Vet. Res., v. 46, p. 570-572, 1985.

ZINTL A, GRAY JS, SKERRETT HE, MULCAHY G. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. Parasite Immunol. v.27, n.4, p.115-20, 2005.