

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ



LUCIMAR SOUZA AMORIM

**DIAGNÓSTICO DOS AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA
BOVINA E OS FATORES ASSOCIADOS NO MUNICÍPIO DE
IBICARAÍ, BA**

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Dezembro de 2011

LUCIMAR SOUZA AMORIM

**DIAGNÓSTICO DOS AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA
BOVINA E OS FATORES ASSOCIADOS NO MUNICÍPIO DE
IBICARAÍ, BA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade e Genética Animal

Orientador: Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Dezembro de 2011

LUCIMAR SOUZA AMORIM

**DIAGNÓSTICO DOS AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA
BOVINA E OS FATORES ASSOCIADOS NO MUNICÍPIO DE
IBICARAÍ, BA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

APROVADA: 13 de dezembro de 2011

Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau
UESC - BA
(Orientador)

Prof. Dr. Alexandre Dias Munhoz
UESC - BA

Prof. Dr. Walter Flausino
UFRRJ -RJ

DEDICATÓRIA

À minha esposa, Fabiana, e a minha filha
Anna Beatriz, por toda compreensão,
incentivo, amor e carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda luz e proteção para cumprir mais esta etapa em minha vida.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, pela oportunidade da realização do curso.

Ao meu orientador, Dr. Amauri Arias Wenceslau, por todos os ensinamentos, amizade e incentivo.

Ao coordenador do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Professor Dr. George Rego Albuquerque, por seu apoio e orientações científicas.

Aos colegas e estagiários de laboratórios da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo carinho, amizade e apoio nas atividades.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos funcionários e técnicos do Hospital Veterinário da UESC, pela receptividade, carinho e apoio nas atividades.

Ao colega e amigo, MSc. Fábio Santos Carvalho pela amizade e incentivo na realização dos trabalhos no laboratório

À colega e amiga Sônia Lopo pela amizade e auxílio nas escolhas das propriedades para a realização das coletas deste trabalho

Aos proprietários por permitirem a realização de coletas das amostras de sangue necessário ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a concretização desse trabalho.

DIAGNÓSTICO DOS AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA E OS FATORES ASSOCIADOS NO MUNICÍPIO DE IBICARAÍ, BA

RESUMO

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de doenças causadas por infecções com *Babesia bigemina* e *B.bovis* e *Anaplasma marginale*, transmitidas por carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e *A. marginale* também por moscas hematófagas e fômites. Estas infecções ocorrem em países tropicais e subtropicais localizados em regiões a 32° S e 32° N de latitude, de acordo com a ecologia dos vetores que encontram plenas condições de desenvolvimento neste tipo de clima. No Brasil, a TPB ocorre em caráter endêmico e é responsável por alta morbidade e mortalidade nos rebanhos e, conseqüentemente, por importantes prejuízos econômicos na pecuária de leite e corte. O impacto econômico é uma conseqüência de perdas diretas, com a redução do ganho de peso, mortalidade, baixa produção de leite e perdas indiretas com aplicação de medidas de controle e medicamentos. No país, observa-se uma grande variedade de fatores epidemiológicos influenciando sua ocorrência, tais como: clima, práticas de manejo, controle de carrapato e introdução de bovinos susceptíveis. Objetivou-se com este estudo verificar as frequências dos agentes etiológicos para a TPB, comparar os métodos de diagnósticos diretos esfregaço sanguíneo e nestedPCR e avaliar os fatores de risco. Foram coletadas 309 amostras de sangue de bovinos leiteiros mestiços em seis propriedades produtoras de leite no município de Ibicaraí no sul da Bahia. As frequências observadas, no diagnóstico por nestedPCR (nPCR), para os agentes etiológicos foram 63,1% para *A.marginale*, 34% *B.bigemina* e 20,4% *B.bovis*. Verificou-se diferença significativa ($P<0,01$) na comparação entre os dois métodos de diagnósticos, nPCR e esfregaço sanguíneo. Na avaliação dos fatores de risco para os agentes

etiológicos do complexo da TPB, verificou-se que os fatores trânsito de animais, realização de exames para hemoparasitas, uso de biocarrapatograma, tipo de bezerreiros existentes, raças, área de pastagens, sistema de criação, sexo e presença de moscas hematofagas, não apresentaram associação significativa com a frequência de animais infectados por ambos os patógenos analisados por nPCR. Enquanto que os fatores de riscos presença de carrapato e idade dos animais apresentaram associação significativa ($P < 0,01$).

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*; *Babesia bovis*; *B. bigemina*; Esfregaço sanguíneo; Fatores de risco; nPCR.

DIAGNOSTIC OF AGENTS OF TRISTEZA PARASITIC BOVINE AND ASSOCIATED FACTORS IN THE CITY OF IBICARAÍ, BA

ABSTRACT

The Tristeza Parasitic Bovine (TPB) is a complex of diseases caused by infection with *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *B. bovis* and transmitted by ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *A. marginale* also by bloodsucking flies and fomites. These infections occur in tropical and subtropical regions located in the 32° S and 32° N latitude, according to the ecology of vectors that are fully capable of developing this kind of weather. In Brazil, the TPB occurs in endemic and is responsible for high morbidity and mortality in flocks, and consequently, important economic losses in the dairy and beef cattle. The economic impact is a consequence of direct losses, with reduced weight gain, mortality, low milk production and indirect losses to the application of control measures and medications. In the country, there is a wide variety of epidemiologic factors influencing their occurrence, such as climate, management practices, control of tick and introduction of risk cattle. The objective of this study verify the frequency of etiologic agents to TPB, compare the diagnostic methods and direct blood smear nestedPCR (nPCR) and evaluate the risk factors. We collected 309 blood samples from crossbred dairy cattle in six milk-producing farms in the municipality of Ibicaraí in southern Bahia. The frequencies observed in diagnostic nPCR for the etiologic agents were 63.1% for *A. marginale*, 34% and 20.4% *B. bigemina* e *B. bovis*. There was significant difference ($P < 0.01$) when comparing the two diagnostic methods, nPCR and blood smears. In the evaluation of risk factors for the etiologic agents of the complex of TPB, it was found that the factors movement of animals, exams hemoparasites, biocarrapatograma use, type of hutch existing, breeds, pasture area, breeding system, gender and presence of bloodsucking flies, were not significantly associated with the frequency of animals infected with

both pathogens analyzed by nPCR. While the presence of risk factors for tick and age of the animals showed a significant association ($P < 0.01$).

Key-words: *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *B. bigemina*; Blood smear; nPCR; risk factors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados das amostras de DNA total de sangue dos bovinos mestiços com o *primer* do gene *dgat1*; M - Marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder); Colunas: 1 – 17 - amostras positivas; 18 - controle negativo..... 23
- Figura 2 Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados da espécie *Anaplasma marginale*. M - marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder); Colunas: 1 - controle positivo; 2 a 5 - amostras positivas para *Anaplasma marginale*; 6 - controle negativo..... 24
- Figura 3 Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados de *Babesia bovis*. M - Marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder); Colunas: 1 - controle negativo; 2 - controle positivo; 3-5 - amostras negativas; 6-8 - amostras positivas para *Babesia bovis*..... 24
- Figura 4 Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados de *Babesia bigemina*. M - Marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder), Colunas: 1 - controle negativo; 2 - amostra positiva para *Babesia bigemina*; 3 e 4 - amostras negativas..... 25
- Figura 5 Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados de nPCR de *Babesia bovis*. M - Marcador de peso molecular 50 Pb; Colunas: 1 - controle positivo; 2, 8, 20 - amostras positivas para *Babesia bovis*; 3-7 e 9-19 - amostras negativas..... 25
- Figura 6 Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados de

| | | |
|----------|--|----|
| | nPCR de <i>Babesia bigemina</i> . M - Marcador de peso molecular 50 Pb; Colunas: 1 - controle negativo; 2 - controle positivo; 3 -7 - amostras positivas para <i>Babesia bigemina</i> | 26 |
| Figura 7 | Esfregaço sanguíneo evidenciando hemácias parasitadas por <i>Anaplasma marginale</i> (indicado pelas setas), em bovinos naturalmente infectados no município de Ibicaraí, BA. Objetiva de 100x..... | 27 |
| Figura 8 | Esfregaço sanguíneo evidenciando hemácias parasitadas por <i>Babesia</i> sp. (indicado pelas setas), em bovinos naturalmente infectados no município de Ibicaraí, BA. Objetiva de 100x..... | 27 |
| Figura 9 | Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificadores de <i>Anaplasma marginale</i> . M - Marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder); Colunas: 1 - controle negativo; 2-7 - amostras positivas para <i>Anaplasma marginale</i> provenientes de extração de DNA das amostras de carrapatos coletados nas seis propriedades..... | 28 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Primers utilizados na detecção de <i>A. marginale</i> (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998), <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> (FIGUEROA et al., 1993)..... | 22 |
| Tabela 2 | Freqüência dos agentes etiológicos do complexo da Tristeza Parasitaria Bovina no município de Ibicaraí, BA..... | 28 |
| Tabela 3 | Comparação entre PCR e Esfregaço sanguíneo de <i>Anaplasma marginale</i> e <i>Babesia sp.</i> em rebanhos bovinos leiteiros mestiços no município de Ibicaraí, BA..... | 29 |
| Tabela 4 | Fatores de risco para os agentes etiológicos do complexo da Tristeza Parasitária Bovina em rebanhos bovinos leiteiros mestiços no município de Ibicaraí, BA..... | 31 |
| Tabela 5 | Reagentes e volumes utilizados na PCR – <i>Babesia sp.</i> e <i>Anaplasma</i> | 50 |
| Tabela 6 | Reagentes e volumes utilizados na nested-PCR – <i>Babesia sp.</i> e <i>Anaplasma</i> | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| bp | Pares de base |
| °C | Graus Celsius |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DNTP's | Desoxirribonucleotídeos trifosfatados |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) |
| G | Força da gravidade |
| Km ² | Quilômetros quadrados |
| Mm | Milimol |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| Mm | Micrometro |
| µL | Microlitro |
| mg/L | Microgramas/MI |
| mL | Mililitro |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| PCR | Reação em Cadeia Polimerase |
| Ph | Potencial de hidrogênio |
| TPB | Tristeza parasitária bovina |

SUMÁRIO

| | | |
|--------|--|-----|
| | RESUMO..... | vii |
| | ABSTRACT..... | ix |
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. | Tristeza Parasitária Bovina..... | 3 |
| 2.1.1. | Babesiose bovina | 3 |
| 2.1.2. | Anaplasmosse | 8 |
| 2.1.3. | Diagnóstico..... | 11 |
| 3. | OBJETIVOS..... | 13 |
| 3.1. | Objetivo geral..... | 13 |
| 3.2. | Objetivos específicos..... | 14 |
| 4. | CAPÍTULO | 14 |
| | COMPARAÇÃO ENTRE O DIAGNÓSTICO DIRETO E MOLECULAR E AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO DOS AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA NO MUNICÍPIO DE IBICARAÍ, BA..... | 15 |
| | RESUMO..... | 15 |
| | ABSTRACT..... | 16 |
| 4.1. | Introdução..... | 17 |
| 4.2. | Material e Métodos..... | 18 |
| 4.2.1. | Área de estudo..... | 18 |
| 4.2.2. | Processamento Laboratorial..... | 19 |
| 4.2.3. | Extração de DNA genômico..... | 20 |
| 4.2.4. | Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)..... | 21 |
| 4.2.5. | Análise estatística..... | 22 |
| 4.3. | Resultados | 23 |
| 4.4. | Discussão..... | 32 |
| 5. | CONCLUSÕES..... | 34 |

| | | |
|--------|---|----|
| 6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 35 |
| 7. | APÊNDICES | 47 |
| 7.1. | Questionário de coleta de dados..... | 47 |
| 7.1.1. | Questionário Epidemiológico..... | 47 |
| 7.1.2. | Questionário para coletas de dados individuais dos animais..... | 48 |
| 7.2. | Procedimentos para extração de DNA..... | 49 |
| 7.2.1. | Extração com Fenol/Clorofórmio..... | 49 |
| 7.3. | Procedimentos para eletroforese..... | 50 |
| 7.4. | Coloração do gel..... | 50 |
| 7.5. | Reação de PCR e nPCR..... | 50 |

1. INTRODUÇÃO

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) compreende um complexo de doenças, que tem como agentes parasitários dois protozoários do gênero *Babesia*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a bactéria *Anaplasma marginale* (ALMEIDA et al., 2006; GUEDES JÚNIOR et al., 2008). Ambas as espécies de protozoários são transmitidas exclusivamente pelo carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, enquanto que *A. marginale* pode também ser transmitido por moscas hematófagas (GUGLIELMONE, 1995; GUEDES JÚNIOR et al., 2008). A ocorrência da TBP está diretamente relacionada à distribuição dos vetores, que encontram condições ideais para desenvolvimento nos países de clima tropical e subtropical, situados entre os paralelos 32°N e 32°S, onde se inclui o Brasil (JULIANO et al., 2007).

A babesiose e a anaplasmose encontram-se na maior parte do território brasileiro caracterizada por estabilidade endêmica, onde os bovinos encontram-se naturalmente imunizados (KESSLER et al. 1983). Entretanto, esta situação epidemiológica não impede que esta enfermidade cause prejuízos significativos. O percentual de animais doentes e a taxa de mortalidade dependerão de alguns fatores associados, tais como: presença de vetores no ambiente, manejo, estado nutricional e doenças concomitantes (GONÇALVES, 2000). Estas enfermidades apresentam uma grande importância econômica, considerando-se o grande número de animais expostos ao risco de infecção. As perdas econômicas são, principalmente, devido à mortalidade e elevada morbidade em bovinos primo-infectados. Estima-se que no Brasil as perdas econômicas podem ultrapassar US\$ 500 milhões anuais, considerando a mortalidade e as perdas indiretas, dentre estas a produção de leite, a diminuição do ganho de peso e os custos do controle e profilaxia (ALMEIDA et al., 2006).

Avanços no campo da biologia molecular tornaram possível o uso de técnicas de amplificação do DNA dos agentes parasitários como forma de diagnóstico. O diagnóstico molecular de hemoparasitos permite identificar

diretamente o agente, até mesmo em pequenas quantidades circulantes, e apresentam alta sensibilidade e especificidade quando comparado à outras técnicas de diagnóstico, a exemplo dos esfregaços sanguíneos. Dentre as técnicas de diagnóstico molecular, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada para demonstrar a presença/ausência de *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp em bovinos portadores assintomáticos (BRITO et al., 2006). A alta especificidade e sensibilidade analítica da PCR tornaram esta técnica uma ferramenta valiosa na realização estudos epidemiológicos, permitindo o planejamento de medidas de controle eficazes, principalmente em casos de infecções latentes nos bovinos (FIGUEROA et al.,1992).

O estado da Bahia apresenta situação epidemiológica de estabilidade da TPB, semelhante à verificada na maioria do território brasileiro, com áreas de instabilidade enzoótica restritas apenas ao semi-árido, onde as condições climáticas não são favoráveis ao desenvolvimento do carrapato (ARAÚJO et al 1998). Na região sul da Bahia, apenas os municípios de Ilhéus e Itabuna foram caracterizados, através de testes sorológicos, como áreas de estabilidade enzoótica para *B. bovis* e *B. bigemina* (Araújo et al., 1997). Em relação ao município de Ibicaraí, não há trabalhos na literatura que descrevem a situação epidemiológica, mesmo sendo um município de destaque na microbacia leiteira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Tristeza Parasitária Bovina

2.1.1. Babesiose bovina

As babesioses são causadas por protozoários parasitas intra-eritrocitários do gênero *Babesia*, que infecta um grande número de animais domésticos e selvagens e com potencial zoonótico. Esta doença é transmitida pelo carrapato *R. microplus* e é distribuída mundialmente. O maior impacto econômico da babesiose ocorre na pecuária bovina, e as duas principais espécies que acometem os bovinos são *Babesia bovis* e a *B. bigemina* (BOCK et al., 2004).

Inicialmente, as babesias foram caracterizadas por Babes, na Romênia em 1888, após observar microrganismos no interior de eritrócitos de bovinos com sinais de hemoglobinúria enzoótica, a qual denominou de *Hematococcus bovis* (KUTTLER, 1988). Smith e Kilborne, em 1893, relataram a presença de parasitas semelhantes em eritrócitos de bovinos acometidos de “Febre do Texas”, no sudoeste dos Estados Unidos, e os denominaram de *Pyrosoma bigeminum*, pelo seu formato em pêra. Estes autores foram os primeiros a relatarem a transmissão da doença do carrapato *Boophilus annulatus* para o bovino (BOCK et al., 2004). No mesmo ano Starcovici, revisando estes trabalhos, alterou os nomes dos parasitas para *Babesia bovis* (*Hematococcus bovis*) e *Babesia bigemina* (*Pyrosoma bigeminum*) por se tratarem de parasitas relacionados (UILENBERG, 2006). Após a publicação destes trabalhos, a babesiose bovina foi identificada em várias partes do mundo (BOCK et al., 2004).

Em 1903, Lignières descreveu pela primeira vez a presença de *Babesia* na Argentina, ressaltando a observação de amostras do parasita com morfologia distinta. Uma amostra foi denominada *Pyroplasma argentinum* e, mais tarde, *Babesia argentina* (= *B. bovis*) e a outra *Babesia bigemina*

(UILENBERG, 2006). No Brasil, em 1906, Carini relatou a presença de um parasita semelhante à *B. bovis* ao analisar parasitas causadores da tristeza parasitaria em São Paulo (SEIQUEIRA et al., 2005). Na década de 30, inúmeras espécies de *Babesia* já haviam sido descritas, porém existiam divergências entre os pesquisadores quanto à classificação e nomenclatura do gênero. Vários nomes foram propostos, mas apenas na década de 70, com o desenvolvimento dos métodos imunológicos, da microscopia eletrônica e do estudo mais aprofundado do ciclo de vida do parasita, é que houve uma uniformização da classificação (MAHONEY, 1975).

O gênero *Babesia*, com mais de 100 espécies descritas, encontra-se classificado no reino Protocista, subreino Protozoa, filo Sporozoa ou Apicomplexa, classe Piroplasma, ordem Piroplasmorida, família Babesiidae (RUPPERT; BARNES, 1996). Entre as espécies descritas, apenas *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. jakimovi*, *B. occultans* e *B. ovata* são parasitas de bovinos (UILENBERG, 2006). No entanto, no Brasil e demais países da América Latina apenas duas destas espécies, *B. bigemina* e *B. bovis*, são encontradas infectando bovinos (OSAKI et al., 2002).

As babesias são tipicamente piriformes, mas podem ser redondas, alongadas ou em forma de charuto. As diversas espécies foram agrupadas em dois grupos, as pequenas babesias e as grandes babesias. As pequenas babesias possuem corpos piriformes medindo de 1,0 a 2,5 µm de comprimento, a exemplo da *B. bovis*, cujos piroplasmas medem 1,5 x 2,0 µm. Ao passo que as grandes babesias medem de 2,5 a 5,0 µm de comprimento, a exemplo da *B. bigemina*, cujos piroplasmas medem 2,0 x 4,5 µm (URQUHAT et al., 1996). O ciclo biológico das babesias depende de dois hospedeiros, o bovino, onde ocorre somente a reprodução assexuada do protozoário, e o carrapato, onde ocorre tanto a reprodução assexuada como a sexuada (FRIEDHOFF; SMITH, 1981).

O ciclo sexual desenvolve-se do intestino do carrapato, após a fêmea ingerir sangue parasitêmico do bovino. Via hemolinfa as formas sexuadas invadem todos os órgãos do invertebrado, como ovários, tubos de malpighi, em um processo contínuo de divisão assexuada. Os gametas, aos pares, se unem para formar um zigoto esférico; dando origem a um quineto móvel que irá se dividir assexuadamente nas células epiteliais do intestino, formando os

esporoquinetos (TRINDADE et al., 2011). Esses invadem as glândulas salivares, que passam por uma nova divisão assexuada, formando os esporozoítos infectantes, que serão inoculados no novo hospedeiro vertebrado (MARTINS, 2002). *B. bovis* é transmitida pelas larvas dos carrapatos, enquanto os estádios de ninfas e adultos transmitem *B. bigemina* (TRINDADE et al., 2011). Através da infecção dos ovários, os quinetos passam aos ovos e larvas, configurando a transmissão transovariana. Na transmissão de estágio-para-estágio, os quinetos novamente alcançam as glândulas salivares do próximo estágio do carrapato, quando começam a alimentação e amadurecem, tornando-se formas infectantes (URQUHAT et al., 1996).

No momento do repasto sanguíneo os protozoários, na forma de esporozoítos, penetram no organismo do hospedeiro pela saliva dos carrapatos infectados, e via corrente sanguínea atingem as hemácias (FARIAS, 2007). Estes esporozoítos se transformam em trofozoítos, que através de esquizogamia (fissão múltipla) formam os merozoítos. Os merozoítos se multiplicam através de uma divisão binária (fissão múltipla), rompem a célula parasitada e penetram em outra hemácia íntegra para continuar sua multiplicação (MARTINS, 2002; BOCK et al., 2004). Após alguns ciclos de replicação, parte dos merozoítos se transforma em gametócitos masculinos ou femininos que continuarão o ciclo da *B. bovis* e *B. bigemina* no organismo do carrapato (UILENBERG, 2006). Como consequência da merogonia o hospedeiro bovino poderá ou não apresentar a doença clínica, dependendo de vários fatores entre os quais, a virulência do parasito, a quantidade de inóculo e o nível de resistência do hospedeiro (MUÑOZ, 2005).

A destruição de eritrócitos por *Babesia* spp. continua até que o hospedeiro morra ou, por tratamento ou processo imunológico, elimine ou diminua o parasito, passando a ser um portador assintomático (JOYNER; DONNELLY, 1979). A destruição dos eritrócitos é responsável pela anemia. A hemoglobina liberada é transformada em pigmento biliar e o excedente é depositado nos tecidos, resultando a icterícia. O excesso de hemoglobina é eliminado pela urina, causando a hemoglobinúria (SPANEL-BOROWOSKI; FENYVES, 1994). *Babesia bigemina* é uma espécie considerada pouco patogênica, normalmente associada quadros de anemia leves à moderada. Já *Babesia bovis* é altamente patogênica, capaz de causar processos

inflamatórios generalizados e obstrução da microcirculação por eritrócitos parasitados em órgãos como o cérebro e pulmões levando a disfunção dos mesmos (MAHONEY, 1975).

A babesiose bovina apresenta distribuição mundial, onde a presença do carrapato é fundamental para sua disseminação, sendo mais importante nas regiões tropicais e subtropicais que apresentam condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do vetor (CANTÚ-MARTÍNEZ et al., 2008). Além disso, outros fatores podem influenciar a transmissão de babesiose bovina, entre eles: raça, idade, manejo, uso de carrapaticidas e presença de agricultura na região (GUIMARÃES et al., 2011).

Na literatura são descritas três situações epidemiológicas distintas para a babesiose bovina: áreas consideradas livres da doença, onde a condição climática não é favorável à manutenção da população de carrapatos e os animais são totalmente desprotegidos, sem anticorpos, por não terem contato com *Babesia* spp.; área de instabilidade enzoótica, que em determinadas épocas do ano às condições climáticas impedem o desenvolvimento da vida livre do carrapato, desta forma não há transmissão contínua dos protozoários aos bovinos, que passando a fase jovem sem serem inoculados não desenvolvem imunidade específica adequada e tornam-se adultos sensíveis; e as áreas de estabilidade enzoótica, onde as condições climáticas são favoráveis a presença dos carrapatos, bem como sua multiplicação, assim os animais são continuamente inoculados a partir do nascimento (primoinfecção), desenvolvendo uma imunidade específica suficiente para torná-los imunes. (MAHONEY; ROSS, 1972; KESSLER et al., 1983; FOLLY et al., 2009).

Nas áreas de estabilidade enzoótica existe equilíbrio entre imunidade e doença, onde 75% dos animais com idade acima de nove meses são portadores de hemoparasitos. Nestas áreas, os bezerros recebem proteção passiva de anticorpos presentes no colostro, aproximadamente, até quatro meses de idade. A proteção pode persistir por até seis meses de idade para *B. bovis* e de três a quatro meses para *B. bigemina* (GONÇALVES, 2000). Após a primoinfecção, os animais permanecem sorologicamente positivos por um período de quatro anos para *B. bovis* e, pelo menos, dois a três anos para a *B. bigemina* (WRIGHT et al., 1990).

A maior parte do território brasileiro caracteriza-se por estabilidade enzoótica, devido à constante transmissão dos agentes. Araújo et al. (1997) caracterizaram as quatro microrregiões da Bahia, Feira de Santana, Jequié, Ilhéus-Itabuna e Vitória da Conquista, como sendo de estabilidade enzoótica, com soroprevalência média de 95% para *B. bovis* e 97% para *B. bigemina*. Situações epidemiológicas semelhantes foram encontradas por: Barros et al. (2005) em Euclides da Cunha e Senhor do Bonfim, BA, com soroprevalência de 86 e 95,5 % para *B. bovis*, respectivamente, e de 90,8 e 91,3 % para *B. bigemina*, respectivamente; Guimarães et al. (2011) no sul do estado de Minas Gerais, com soropositividade de 94% para *B. bovis*; Guedes Júnior et al. (2008) no nordeste do Pará, com soroprevalência de 99,2% para *B. bigemina* e 98,8% *B. bovis*; e Trindade et al. (2010), na região de Araguaína, Tocantins, com soropositividade de 90,5% para *B. bigemina* e 91,7% para *B. bovis*.

Entretanto, regiões como o sertão e o sul do Brasil, em que as condições edafoclimáticas não favorecem o desenvolvimento do *R. microplus*, são caracterizadas pela instabilidade enzoótica. Nestas regiões a doença tem um significado maior, dado ao prejuízo econômico que ela causa por mortalidade e morbidade, devido à transmissão esporádica ou irregular dos protozoários (TRINDADE et al., 2011). Vidotto et al. (1997), Souza et al., (2000a), Barros et al. (2005) e Costa et al., (2011) relataram áreas de instabilidade para a região de Londrina, PR, mesorregião norte Fluminense, RJ, Uauá e Juazeiro, BA e sertão da Paraíba, respectivamente.

Nos bovinos, a prevalência da babesiose é diferente quando se analisa o fator idade dos hospedeiros, sendo mais comum nos animais mais jovens. Madruga et al. (2000), no Mato Grosso do Sul, observaram que a maior frequência de babesiose ocorria na faixa etária de 30 a 120 dias, e que 100% dos animais estavam positivos para *B. bovis* aos 87 dias.

Conforme D'Andrea et al., (2006), dependendo da raça explorada, manejo, níveis de infestações do carrapato *R. microplus*, áreas consideradas estáveis podem tornar-se instáveis e vice-versa. Certas práticas de manejo, como a diminuição das populações de carrapato por excesso de uso de acaricidas, conseqüentemente diminuindo a transmissão de hemoprotozoários, ou até mesmo por falhas no tratamento com o aumento da taxa de infecção do

carrapato, podem acarretar surtos de babesiose se os animais não estiverem devidamente protegidos.

2.1.2. Anaplasmosose

A anaplasmosose é uma doença infecciosa causada por bactérias intraeritrocíticas obrigatórias do gênero *Anaplasma*. Duas espécies deste gênero podem acometer os bovinos: *Anaplasma centrale* Theiler, 1911, agente da anaplasmosose benigna, com pouca importância e pouca distribuição e; *Anaplasma marginale* Theiler, 1910, responsável pela doença maligna, com ampla distribuição geográfica (SOUZA et al., 2000b). A transmissão ocorre, biologicamente, por carrapatos e, mecanicamente, por moscas e fômites. Apresenta importância econômica em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo, por determinar perdas econômicas na pecuária devido à mortalidade, redução do peso e da produção de leite e custos com tratamentos (MELO et al., 2007).

Em 1910, na África do Sul, Sir Arnold Theiler ao pesquisar lâminas sanguíneas de bovinos, com doença similar à Febre do Texas, descobriu alguns “pontos” marginais que seriam os agentes responsáveis pela doença, e os denominou como gênero *Anaplasma*, espécie *A. marginale*. Theiler descobriu que a babesiose e a anaplasmosose eram doenças distintas, mas que poderiam existir no mesmo animal, conseguindo separar os dois agentes através de infecções puras com *A. marginale*. Essas descobertas sugeriram que alguns dos bovinos que Smith e Kilborne haviam trabalhado estavam infectados com *Babesia* e *Anaplasma* (KOCAN et al., 2010).

O gênero *Anaplasma* pertence à ordem Rickettsiales (ARAÚJO et al., 2003), que foi reclassificada, baseando-se em análises genéticas dos genes 16S rRNA, groESL e genes que codificam proteínas de superfície. Os organismos foram atribuídos a uma das duas famílias: Anaplasmataceae e Rickettsiaceae. Os organismos designados para a família Rickettsiaceae são parasitas intracelulares obrigatórios que crescem livremente no citoplasma de células eucarióticas, enquanto que os classificados na família Anaplasmataceae, são parasitas intracelulares obrigatórios encontrados

exclusivamente dentro de vacúolos ligados à membrana citoplasmática da célula do hospedeiro (KOCAN et al., 2010).

Anaplasma marginale apresenta-se como corpúsculos intraeritrocitários, visualizados em microscopia óptica como pequenos pontos escuros, de localização periférica, variando entre 0,1µm a 0,8µm. Os sinais clínicos da anaplasmosose podem incluir febre, perda de peso, aborto, letargia, icterícia, e muitas vezes a morte. (SOUZA et al., 2000a).

A transmissão de *A. marginale* pode ser efetuada tanto mecanicamente, por artrópodes ou fômites, quanto biologicamente por carrapatos. A transmissão mecânica por artrópodes tem sido relatada para dípteros do gênero *Tabanus* e *Stomoxys* e várias espécies de mosquitos, que realizam a transferência direta de sangue de bovinos portadores para susceptíveis. Ao passo que por fômites, a inoculação do agente acontece por agulhas contaminadas com sangue infectado durante a vacinação ou pequenos procedimentos cirúrgicos, como castração, marcação por tatuagem, entre outros (KOCAN et al., 2010). No Brasil o principal transmissor biológico é *R. microplus* (CARELLI et al., 2007), ocorrendo neste a transmissão transtadial e transovariana (KESSLER, 2001; BROWMAN, 2006). Além disso, verifica-se uma transmissão pelo carrapato macho, que se infecta em bovino portador e transmite, posteriormente, para outro bovino sensível (KESSLER, 2001). Já nos bovinos pode acontecer transmissão congênita ou transplacentária (KESSLER, 2001).

O carrapato, durante o repasto sanguíneo, injeta o agente patogênico no sangue circulante do animal. Nos bovinos *A. marginale* penetra na hemácia sob forma de corpúsculo inicial, devido a uma invaginação da membrana, dando origem a um vacúolo, depois dessa invasão, ocorre multiplicação por divisão binária, formando um corpúsculo de inclusão, que deixará a hemácia, sem rompimento da mesma, e invadirá outras células, propagando o ciclo. A incubação ou período pré-patente pode variar de 7 a 60 dias, com uma média de 28 dias. Após a infecção eritrocítica é detectado um aumento no número de hemácias parasitadas, essas hemácias são posteriormente fagocitadas por células do sistema reticuloendotelial, resultando em desenvolvimento de anemia e icterícia, sem que apresente hemoglobinemia ou hemoglobinúria (TRINDADE et al., 2011).

O ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* em carrapatos é complexo e coordenado com o ciclo de alimentação carrapato, inicia com a ingestão pela fêmea de sangue parasitêmico do bovino. Após o desenvolvimento do patógeno nas células do intestino do carrapato, muitos outros tecidos acabam sendo infectados, incluindo as glândulas salivares, envolvidas na transmissão de *A. marginale* para o gado durante a alimentação (KOCAN et al., 2010).

Anaplasmose bovina ocorre mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, é uma das principais doenças que afetam a produção bovina em muitos países. (FELSHEIM et al., 2010). É uma doença endêmica no México, América Central e América do Sul, bem como nas ilhas do Caribe, com distribuição semelhante às babesioses (GUGLIELMONE, 1995). Padrões epidemiológicos semelhantes são esperados nas regiões entre os paralelos 32° Sul e 32° Norte, onde o principal vetor de *A. marginale* o *R. microplus*, é amplamente difundido. O conceito de estabilidade/instabilidade enzoótica proposto por Mahoney e Ross (1972) também pode ser aplicado no estudo de anaplasmose bovina (BRITO et al., 2010).

Em área de estabilidade enzoótica para *A. marginale*, os bezerros tendem a se infectarem nos primeiros dias de vida, onde a presença dos vetores é persistente durante todo o ano, entretanto, apresentam uma maior resistência devido à absorção de anticorpos maternos, através do colostro (VIDOTTO; MARANA, 2001). Após a primoinfecção, os animais permanecem sorologicamente positivos por um período de oito meses (WRIGHT et al., 1990). Apesar de menos susceptíveis, os bezerros parecem ser a principal fonte de infecção de *A. marginale* pois mesmo sem a constatação de sinais clínicos, eles apresentam parasitemias superiores a 0,3% (ZAUGG et al., 1986).

A estação do ano influencia a ocorrência da infecção primária, uma vez que animais nascidos na estação seca apresentam maiores risco de anaplasmose, quando expostos às elevadas taxas de transmissão durante a estação chuvosa subsequente. Isso porque grande número de bezerros já não possui a imunidade passiva conferida pelo colostro (HERRERO et al., 1998). O percentual de animais doentes, bem como a taxa de mortalidade, pode depender de algumas condições epidemiológicas, tais como: número de

vetores no ambiente, estado nutricional e doenças concomitantes (GONÇALVES, 2000).

No Brasil, os estudos para avaliar a prevalência da anaplasmoze bovina em diferentes regiões constataram que a infecção está disseminada pelo país, com áreas de instabilidade e estabilidade enzoóticas. Áreas de instabilidade enzoótica foram descritas por: Oliveira et al. (1992) no estado de Sergipe, com 12,3 % de amostras positivas pelo esfregaço sanguíneo; Marana et al. (2009) na região Centro-Sul do Paraná e Guedes Júnior et al. (2008) no nordeste do Pará, com soroprevalência de 58,7% e 68,3%, respectivamente. Já as áreas de estabilidade enzoótica descritas na literatura são: as microrregiões de Jequié, Itabuna e Vitória da Conquista com soroprevalência de 92,7 %, 93,7% e 95,1%, respectivamente (ARAÚJO et al., 1998); a região do semi-árido da Bahia com soroprevalência de 97% (BARROS et al., 2005); os estados de Rondônia e Acre com prevalência por diagnóstico molecular (PCR) de 98,6 e 92,4 %, respectivamente (BRITO et al., 2010); a mesorregião Norte Fluminense-RJ e a região de Londrina, PR com soropositividade de 91,1 e 92,2 %, respectivamente (SOUZA et al., 2000a, b).

2.1.3. Diagnóstico

Mundialmente, são apresentadas inúmeras técnicas de diagnóstico indireto e direto e suas respectivas padronizações para diagnosticar o complexo da TPB. O diagnóstico indireto utilizado para pesquisa de anticorpos contra os agentes do complexo da TPB é empregado em levantamentos epidemiológicos, possibilitando conhecer a porcentagem de animais infectados, o grau de proteção do rebanho bem como, a faixa etária mais acometida, dados esses necessários para estabelecimento de programas de controle dessa doença (TRINDADE et al., 2011). Vários são os testes sorológicos utilizados para a detecção da babesiose e anaplasmoze bovina, dentre eles pode-se destacar o teste da congutinação rápida (TCR), a aglutinação pelo látex, a hemaglutinação, fixação de complemento (FC) (MARANA et al., 2006), o teste do cartão (TC), a prova de imunofluorescência indireta (IFI) (SOUZA et al., 2001; MARANA et al., 2009), o ensaio imunoenzimático de adsorção indireto (iELISA) e ELISA por competição (cELISA) (MARANA et al., 2009).

Entretanto, estes testes que detectam anticorpos no soro têm uso limitado, pois indicam a exposição ao agente, mas não informações sobre o estágio da infecção (WAGNER et al. 1992).

O teste de FC é baseada em reações de anticorpos IgM, produzidos no início da infecção primária, apresenta baixa sensibilidade em animais com infecções crônicas (MARANA et al., 2006). No teste de IFI são utilizados como antígenos esfregaços sangüíneos com eritrócitos parasitados, apresenta boa sensibilidade, mas diferentes níveis de fluorescência, fluorescência inespecífica, rastros de pontos irregulares, fadiga e subjetividade do operador, são alguns inconvenientes apresentados pelo teste, que tem dificultado a sua padronização. O teste de ELISA é capaz de detectar e quantificar a presença de anticorpos em baixas concentrações, possui alta sensibilidade e especificidade, e permite o processamento de um grande número de amostras devido a utilização de um leitor específico (MARANA et al., 2009).

O diagnóstico direto pode ser realizado com base na visualização dos parasitos no interior das hemácias em esfregaços sanguíneos delgados corados pelo Giemsa ou amplificação do DNA do parasito pela técnica da PCR (VIDOTTO; MARANA, 2001). A pesquisa parasitológica, realizada por meio de esfregaços sangüíneos, constitui-se no método mais antigo e rotineiramente utilizado para o diagnóstico de hemoparasitos. Na fase aguda da doença, quando a parasitemia é alta, os parasitos são facilmente detectados nos eritrócitos de bovinos (FARIAS, 1995). Entretanto, quando os animais se recuperam, tornando-se portadores, com baixa parasitemia, a visualização do parasito, por esse método, torna-se extremamente difícil e falha, o parasito pode ser facilmente confundido com um artefato, de tal forma que a sensibilidade é baixa e resultados falso-negativos são comuns (BOSE et al., 1995). Nesse sentido, técnicas para detecção direta de antígenos, com alta sensibilidade e especificidade, foram desenvolvidas para detecção dos agentes do complexo da TPB (TRINDADE et al., 2011). Entre estas técnicas, as moleculares baseadas em PCR destacam-se e tem sido usada para detecção de animais portadores em estudos realizados sobre hemoparasitas em bovinos (FIGUEROA et al., 1992; AZAMBUJA et al., 1994; MUÑOZ, 2005; SANTANA et al., 2008; BRITO et al., 2010). A aplicação de testes baseados em PCR para o estudo da epidemiologia do complexo da TPB ainda é pouco aplicada, mesmo

tendo suas características, alta sensibilidade e especificidade, verificadas por vários autores na detecção de infecção em hospedeiros vertebrados e em carrapatos. (FIGUEROA et al., 1992; MELO et al., 2007; RAMOS et al., 2010).

A PCR é uma técnica para amplificação *in vitro* de seqüência específica de DNA, altamente sensível, desenvolvida para detectar pequenas quantidades de DNA de diferentes agentes em amostras de sangue ou tecidos. Pode ser empregada na pesquisa de hemoparasitas em bovinos e em artrópodes nos diversos estádios de desenvolvimento (STICH *et al.*, 1993). Devido à alta sensibilidade e especificidade da técnica da PCR, ela é utilizada para validar outras técnicas de diagnóstico e expedição de certificado para exportação de animais (BÖSE *et al.*, 1995). Uma modificação da técnica da PCR foi descrita por JACKSON *et al.* (1994), com a introdução de uma segunda reação de amplificação do DNA, a partir do produto da primeira reação, utilizando “*primers* internos”, denominando-a de nestedPCR (nPCR). Essa técnica utiliza, portanto, duas PCRs consecutivas, melhorando, desse modo a sensibilidade da técnica original. Uma nPCR, descrita por TORIONI de ECHAIDE *et al.* (1998), demonstrou ser capaz de detectar 30 eritrócitos infectados com *Anaplasma* sp, por ml de sangue, o que corresponde a um aumento de 10 a 100 vezes na sensibilidade com relação ao teste da PCR tradicional.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar através das técnicas de esfregaço sanguíneo e nested-PCR os agentes responsáveis pelo complexo da Tristeza Parasitária Bovina e os fatores associados no município de Ibicaraí, BA.

3.2. Objetivos específicos

- Comparar as técnicas de esfregaço sanguíneo e nested-PCR no diagnóstico do complexo da Tristeza Parasitária Bovina no município de Ibicaraí, BA.
- Otimizar o protocolo para extração do DNA total para uso no diagnóstico molecular da TPB;
- Identificar a presença dos agentes do Complexo da Tristeza Parasitária Bovina nos carrapatos;
- Determinar a frequência dos agentes do Complexo da Tristeza Parasitária Bovina no município de Ibicaraí, BA;
- Avaliar os fatores associados ao Complexo da Tristeza Parasitária Bovina no local de estudo.

4. CAPÍTULO

A metodologia e os resultados serão apresentados em forma de capítulo que constituirá o artigo científico que será publicado em periódico científico.

COMPARAÇÃO ENTRE O DIAGNÓSTICO DIRETO E MOLECULAR E AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO DOS AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA NO MUNICÍPIO DE IBICARAÍ, BA

Resumo

Realizou-se o diagnóstico direto por esfregaço sanguíneo e nPCR em 309 amostras de sangue de bovinos mestiços leiteiros provenientes do município de Ibicaraí, BA. A frequência observada no diagnóstico por lâminas de esfregaço sanguíneo foi 31,1% para *A. marginale* e 20,4% para *Babesia* sp.. Enquanto que no diagnóstico por nPCR foi 63% para *A. marginale*, 34% para *B. bigemina* e 20,4% *B. bovis*. Verificaram-se diferenças significativas ($P < 0,01$) na comparação entre os dois métodos de diagnósticos, nPCR e lâminas de esfregaço sanguíneo. Das 195 amostras de sangue positivas para *A. marginale* por nPCR, 49,2% apresentaram positivas em lâminas de esfregaço sanguíneo. A concordância ao teste KAPPA obtida foi de 0,41. Enquanto que das 134 amostras de sangue positivas para *Babesia* sp. por nPCR, 47% apresentaram positivas em lâminas de esfregaço sanguíneo. A concordância ao teste KAPPA obtida foi de 0,48. As amostras de carrapatos das seis propriedades analisadas por nPCR foram positivas apenas para *A. marginale*. Na avaliação dos fatores de risco para os agentes etiológicos do complexo da TBP verificou-se que os fatores de risco presença de carrapato e idade dos animais apresentaram associação significativa ($P < 0,01$) com a frequência de animais infectados por ambos os patógenos analisados por nPCR. Portanto, nas condições estudadas, a nPCR revelou-se uma boa ferramenta para diagnóstico dos agentes da TPB devido a sensibilidade e especificidade, quando comparado ao esfregaço sanguíneo. O município de Ibicaraí apresenta-se como uma área de estabilidade endêmica com prevalência comprovada através de nPCR, sendo *Anaplasma marginale* o principal agente da TPB.

Palavras-chave: Complexo TPB, Esfregaço sanguíneo; Fatores de risco; nPCR.

**COMPARISON BETWEEN DIRECT AND MOLECULAR DIAGNOSIS AND
EVALUATION OF RISK FACTORS OF PARASITIC AGENTS OF SADNESS
IN THE CITY OF BOVINE IBICARÍ, BA**

Abstract

Diagnosis direct was performed by blood smear and nestedPCR (nPCR) in 309 blood samples from crossbred dairy cattle from the city of Ibicarai, BA. The observed frequency in diagnostic blood smear slides was 31.1% for *A. marginale* and 20.4% for *Babesia sp.*. While the diagnostic nPCR was 63% for *A. marginale*, 34% and 20.4% *B. bigemina* and *B. bovis*, There were significant differences ($P < 0.01$) when comparing the two diagnostic methods, nPCR and blood smear slides. From 195 blood samples positive for *A. marginale* by nPCR, 49.2% had positive blood smears. The agreement obtained the Kappa test was 0.41. While the 134 positive blood samples for *Babesia spp.* by nPCR, 47% had positive blood smears. The agreement obtained the Kappa test was 0.48. Samples of ticks of the six properties were analyzed by nPCR positive only for *A. marginale*. In the evaluation of risk factors for the etiologic agents of the complex of TPB was found that the risk factors the presence of ticks and age of the animals showed a significant association ($P < 0.01$) with the frequency of animals infected with both pathogens analyzed by nPCR. Therefore, under the conditions studied, the nPCR proved to be a good tool for the diagnosis of agents of TPB due to sensitivity and specificity when compared to blood smear. The municipality of Ibicarai presents itself as a stable area with endemic prevalence confirmed by nPCR, being the main agent *Anaplasma marginale* of TPB.

Key words: Complex TPB, blood smear, nPCR, risk factors.

4.1. Introdução

No Brasil, os principais agentes etiológicos da Tristeza parasitária bovina (TPB) são *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910), *Babesia bovis* (BABES, 1888) e *B. bigemina* (SMITH; KILBORNE, 1893). O primeiro é uma bactéria pertencente à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae e os outros dois são protozoários pertencentes a família Babesiidae (DUMLER et al., 2001). Ambas as espécies de protozoários são transmitidas exclusivamente pelo carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, enquanto que *A. marginale* pode também ser transmitido mecanicamente por moscas hematófagas e fômites (GUGLIELMONE, 1995; GUEDES JÚNIOR et al., 2008).

A TPB encontra-se distribuída em quase todo o território brasileiro e sua ocorrência está diretamente relacionada à distribuição dos vetores, que encontram condições ideais para o seu desenvolvimento nos países de clima tropical e subtropical. Este complexo de doenças causa prejuízos e constitui fator limitante ao crescimento da bovinocultura, devido aos altos índices de morbidade e mortalidade nos animais (PEREIRA, 2006).

O perfil epidemiológico do complexo da TPB de uma região pode ser determinado a partir da avaliação de diversos fatores, como raça, idade, condições climáticas, estresse, manejo e tipo de pastagens, podendo variar entre livre, instável, e estável. As áreas livres são aquelas onde condições climáticas não são favoráveis ao desenvolvimento do vetor (BERTO et al., 2008). As áreas instáveis são aquelas onde as condições climáticas e/ou manejo da pecuária afetam a reprodução do carrapato em um determinado período do ano (KESSLER et al.1983; BARROS et al, 2005). E nas áreas estáveis, o carrapato está presente durante todo o ano, assim os animais são protegidos por anticorpos maternos obtidos através do colostro, e quando infectados durante os primeiros meses de vida desenvolvem sua própria imunidade ativa, resultando em menos casos clínicos da doença (MADRUGA et al, 1984;. GONÇALVES,2000; OSAKI et al, 2002). Alguns pesquisadores

têm chamado a atenção para a importância de se conhecer a situação epidemiológica de uma região por meio de estudos regionais, ou seja, indicando se há estabilidade ou instabilidade endêmica para determinada hemoparasitose e, conseqüentemente, mensurando a probabilidade de ocorrência de surtos de importância econômica da doença e a necessidade ou não da adoção de medidas preventivas (GUIMARAES et al 2011).

Na maioria das regiões do Brasil a situação epidemiológica da TPB é de estabilidade endêmica, com poucas áreas de instabilidade (ARTILES et al. 1995; ARAÚJO et al. 1998; GUIMARAES et al 2011). Situação semelhante é observada no estado da Bahia, onde as áreas de instabilidade se restringem ao semi-árido, devido às condições climáticas desfavoráveis ao desenvolvimento do vetor (ARAÚJO et al 1998).

O município de Ibicaraí localizado no sul da Bahia destaca-se por ser uma área de produção leiteira que fornece matéria-prima para as indústrias de laticínios localizadas no Estado. Em razão da importância do Complexo da TPB, associada à escassez de informações sobre a epidemiologia dessas doenças na região sul da Bahia, objetivou-se com este estudo comparar os métodos de diagnósticos diretos esfregaços sanguíneos e nPCR, determinar a freqüência e avaliar os fatores associados à infecção pelos agentes da TPB no rebanho leiteiro mestiço no município de Ibicaraí, BA.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Área de estudo

O trabalho foi realizado no município de Ibicaraí, localizado na região Sul da Bahia, com área total de 217.914 Km², na latitude 14°51'54" sul e longitude 39°35'15" oeste, e altitude média de 162 m. A vegetação é composta por floresta estacional semidecidual e ombrófila densa, o clima é característico da região cacaueteira, quente e úmido, com precipitações pluviométricas entre 1200 a 1400 mm/ano e temperatura média anual de 27 °C (SIDE, 2011). O município possui um rebanho bovino de, aproximadamente, 17.900 animais, sendo 4.500

animais de aptidão leiteira com uma produção média de 2,6 milhões L/ano (IBGE, 2010).

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com auxílio Epi Info 6.0, levando em conta o número total do rebanho, a possibilidade de detecção da doença de 80% (correspondente a doenças de ocorrência endêmica na população), intervalo de confiança de 95% e um erro estatístico de 5%. Este cálculo resultou em uma amostra (N) de 243 animais, sendo que foram coletadas amostras de sangue e carrapato de 309 animais mestiços, destes 169 adultos fêmeas e 140 bezerros de ambos os sexos e com idade entre 1 (um) e 270 dias

As coletas foram realizadas em seis propriedades com criação extensiva a pasto, com ou sem suplementação protéica, no período das águas de novembro de 2010 a fevereiro de 2011. As amostras de sangue (5 mL) foram coletadas por punção da veia coccígea, em *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA com o uso de agulhas descartáveis e acondicionadas em recipiente isotérmico, com gelo, e transportadas até o laboratório no mesmo dia para processamento.

Para a obtenção dos dados referentes aos fatores associados ao Complexo da Tristeza Parasitária foi aplicado um questionário, preenchido no ato das coletas, cuja finalidade foi levantar informações sobre: presença de carrapatos ou de moscas; trânsito de animais; realização de exames de hemoparasitas; uso de biocarrapatograma; tipo de bezerreiros existentes; raça dos animais; área de pastagens; sistema de criação; e sexo dos animais.

4.2.2. Processamento Laboratorial

As amostras de sangue coletadas foram utilizadas para a confecção de esfregaços sanguíneos fixados com metanol e coradas pela técnica de coloração de Giemsa. Para o diagnóstico direto, as lâminas foram observadas em microscópio óptico e fotomicrografadas utilizando-se microscópio Trinocular Olympus BX 51 acoplado com câmera fotográfica Olympus DP71.

4.2.3. Extração de DNA genômico

Um volume 300 µL de cada amostra de sangue foi aliquoteado em microtubos de 2 mL, no qual foi adicionado 500 µL de água destilada, homogeneizado no vórtex por 30 s., para rompimento de células, e centrifugado por 6 min. a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi eluído em TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 200 mM EDTA, pH 8,0, Proteinase K 120 µg/mL e 1% de Triton X-100). Cada amostra foi agitada suavemente no vórtex e incubadas em banho-maria a 50°C por cerca de 30 min.. Em seguida acrescentou-se SDS (0,5%), homogeneizou no vórtex por 30 s. e incubou no banho-maria por mais 30 min. O DNA genômico foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e clorofórmio, e precipitado com etanol 100% e acetato de amônio na proporção 1/10. O *pellet* foi lavado com etanol 85%, ressuspendido em 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e quantificado por espectrofotometria em absorvância de 260 nm e 280 nm. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C, em microtubos, para realização dos diagnósticos através da PCR.

Para verificar a viabilidade do DNA total, extraído de sangue dos bovinos mestiços, realizou-se uma reação com os *primers* específicos da região promotora gene *dgat1*, responsável pela produção de gordura do leite: *Forward* – 5'-TCA GGATCCAGAGGTACCAG-3' e *Reverse*, – 5'-GGGGTCCAAGGTTGATACAG-3' (KUHN et al., 2004).

As amostras de carrapato foram fixadas em álcool e armazenadas a -20°C em microtubos. Posteriormente, as amostras foram agrupadas por propriedade formando seis *pools* de carrapatos. As amostras de carrapato de cada propriedade foram homogeneizadas, e com auxílio de uma pinça retirou-se cinco sub-amostras com peso médio variando entre 270 a 290 mg, com intuito de aumentar a probabilidade de identificar o DNA dos parasitos nos carrapatos. As amostras de carrapato foram maceradas com auxílio de Nitrogênio líquido, seguido de extração de DNA genômico pelo mesmo protocolo usado para as amostras de sangue.

4.2.4. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para o diagnóstico molecular de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* foram realizadas reações de nPCR, utilizando-se os *primers* descritos na Tabela 1. As reações foram preparadas em volume de 25 µL, contendo 200 µM dNTP, 5,0 mM MgCl₂, 2 U de Taq DNA polimerase (Promega®), e 1,0x tampão de amplificação (fornecido pelo fabricante), 11 pmol de cada *primer* (Ana F e Ana R para *A. marginale*, BoF e BoR para *B. bovis* e BilA e BilB para *B. bigemina*) e 60 ng de DNA genômico. O protocolo de amplificação foi o seguinte: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, anelamento a 65 °C por 1 minuto para *A. marginale*, 55 °C por 1 minuto para *B. bovis* e 64 °C por 1 minuto para *B. bigemina* e extensão a 72 °C por 40 segundos, com uma etapa final a 72 °C por 5 minutos no termociclador MJ96G (Biocycler®). Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo.

Na segunda reação utilizou-se como DNA molde 2 µL do produto da primeira reação, apenas de amostras que não amplificaram, em uma reação de 25 µL utilizando-se os *primers* Ana F int e Ana R para *A. marginale*, BoFN e BoRN para *B. bovis* e BilAN e BilBN para *B. bigemina*, com protocolo de amplificação semelhante ao da primeira reação, alterando apenas as temperaturas de anelamento, que foram: 65 °C para *A. marginale* e *B. bovis*, e 69°C para *B. bigemina*. Os *amplicons* foram revelados após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Em todas as reações foram utilizados o controle positivo e o negativo. Como controle positivo foi usado o DNA de amostras comprovadamente positivas, para isso, primeiramente, selecionou-se amostras positivas pelo exame microscópico de lâminas de esfregaço sanguíneo. Estas amostras foram amplificadas com *primers* específicos para cada um dos três agentes (Tabela 1), e os fragmentos obtidos foram seqüenciados para comprovar a similaridade com os agentes de interesse. Já o controle negativo consistiu na realização da reação de PCR utilizando água ultra pura ao invés de DNA.

Tabela 1. *Primers* utilizados na detecção de *A. marginale* (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998), *B. bovis* e *B. bigemina* (FIGUEROA et al., 1993).

| Patógeno | Primer | Seqüência | Pares de Base |
|---------------------|---------------|------------------------------|----------------------|
| <i>B.bovis</i> | BoF | CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA | 350 |
| | BoR | CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA | |
| | BoFN | TCA ACA AGGTACTCTATATGGCTACC | 290 |
| | BoRN | CTACCGAGCAGA ACCTTCTTCACCAT | |
| <i>B. bigemina</i> | BiIA | CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC | 278 |
| | BiIB | CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG | |
| | BiIAN | CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC | 170 |
| | BiIBN | CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG | |
| <i>A. marginale</i> | Ana F | GCATAGCCTCCCCCTCTTTC | 458 |
| | Ana R | TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA | |
| | AnaFint | TACACGTGCCCTACCGACTTA | 345 |

4.2.5. Análise estatística

Foi utilizado o teste Qui-quadrado para avaliar a significância dos resultados entre os testes de diagnóstico (nPCR e esfregaço sanguíneo) e os fatores associados a Tristeza Parasitária Bovina, com um nível de confiança de 99%. O teste KAPPA foi usado como medida de concordância entre testes sob condição real de acordo com Trusfield, 1986.

4.3. Resultados

A amplificação do DNA total, extraído de sangue de bovinos mestiços, com *primers* específicos da região promotora do gene *dgat1* resultou em fragmentos de 145 pb, comprovando a viabilidade do DNA para uso no diagnóstico molecular da TPB (Figura 1).

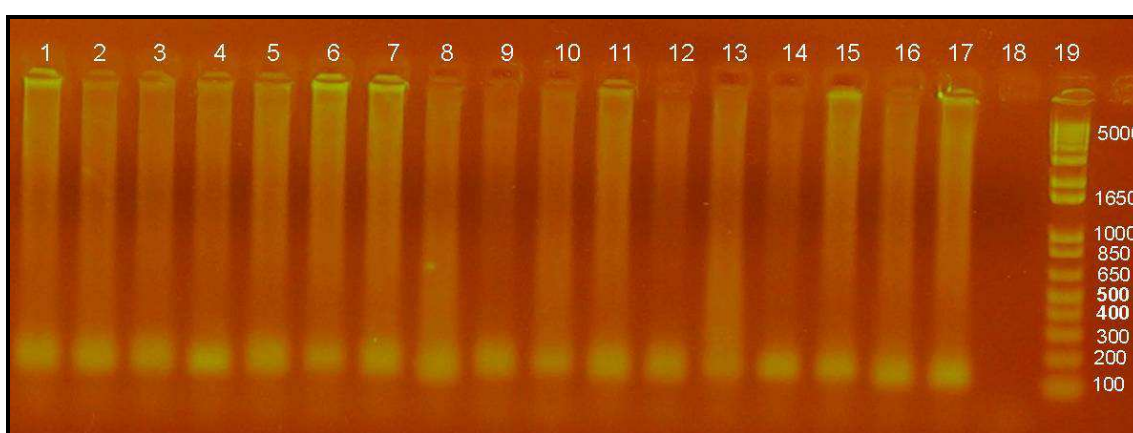


Figura 1. Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados das amostras de DNA total de sangue dos bovinos mestiços com o *primer* do gene *dgat1*; M - Marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder); Colunas: 1 – 17 - amostras positivas; 18 - controle negativo.

A amplificação da primeira PCR resultou em fragmentos de 458 pb para *A. marginale* (Figura 2), 350 pb para *B. bovis* (Figura 3) e 278 pb para *B. bigemina* (Figura 4). Ao passo que a amplificação da segunda reação resultou em fragmentos de 345 pb para *A. marginale*, 290 pb *B. bovis* (Figura 5) e 170 pb para *B. bigemina* (Figura 6). Os bovinos foram considerados como positivos, para um dos três agentes do complexo da TPB, quando as amplificações resultaram nos padrões de fragmentos descritos acima. Os controles positivos seqüenciados revelaram 99 e 100% de similaridade com amostras depositadas no GenBank, acessos: *A. marginale* (Genbank CP001079.1), *B. bovis* (Genbank JF588010.1) e *B. bigemina* (Genbak S45366.1).

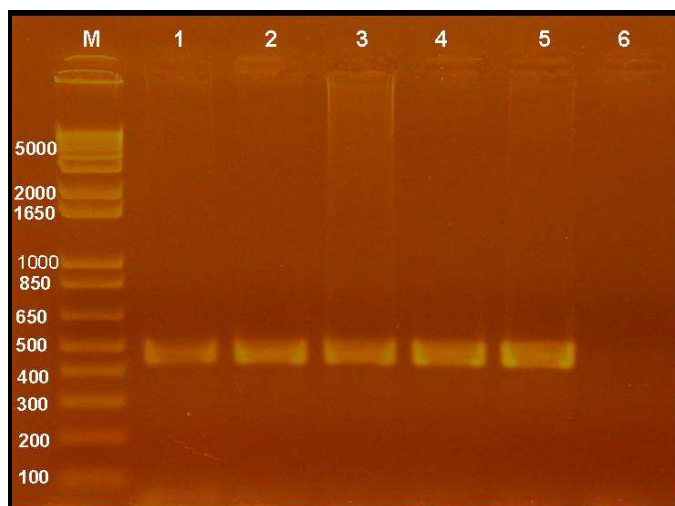


Figura 2. Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados da espécie *Anaplasma marginale*. M - marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder); Colunas: 1 - controle positivo; 2 a 5 - amostras positivas para *Anaplasma marginale*; 6 - controle negativo.

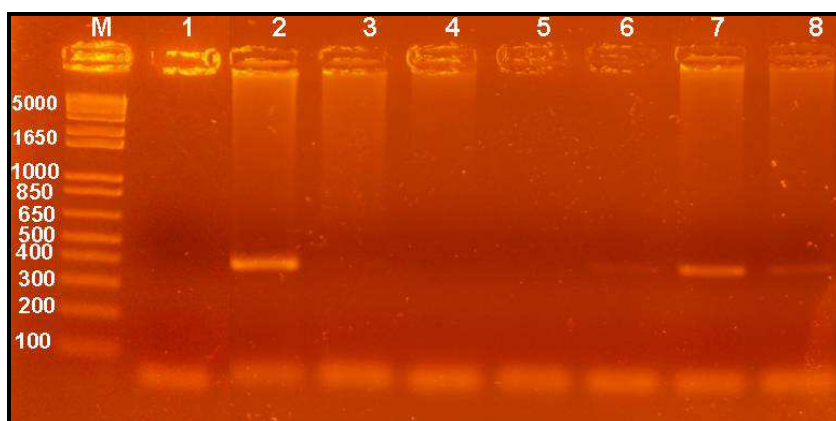


Figura 3. Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados de *Babesia bovis*. M - Marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder); Colunas: 1 - controle negativo; 2 - controle positivo; 3-5 - amostras negativas; 6-8 - amostras positivas para *Babesia bovis*.

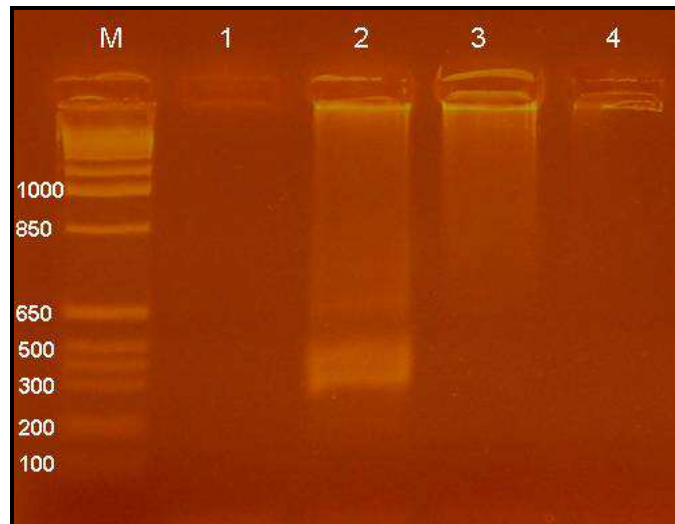


Figura 4. Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados de *Babesia bigemina*. M - Marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder), Colunas: 1 - controle negativo; 2 - amostra positiva para *Babesia bigemina*; 3 e 4 - amostras negativas.

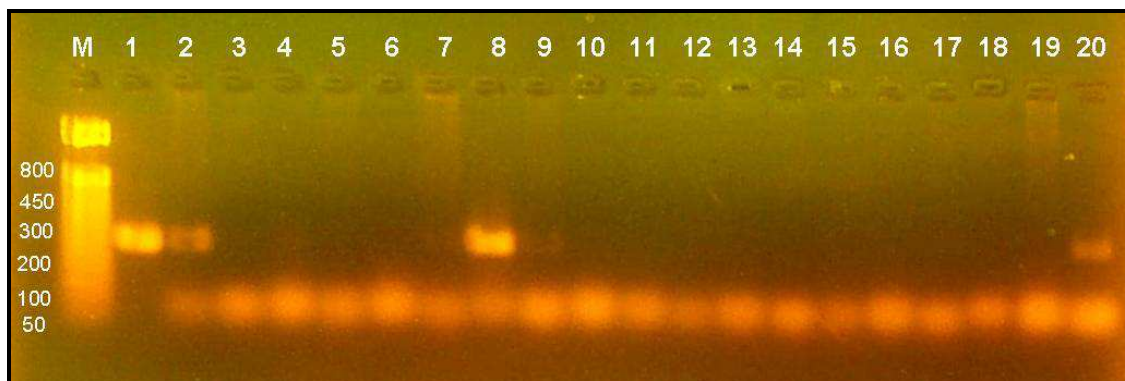


Figura 5. Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados de nPCR de *Babesia bovis*. M - Marcador de peso molecular 50 Pb; Colunas: 1 - controle positivo; 2, 8, 20 - amostras positivas para *Babesia bovis*; 3-7 e 9-19 - amostras negativas.

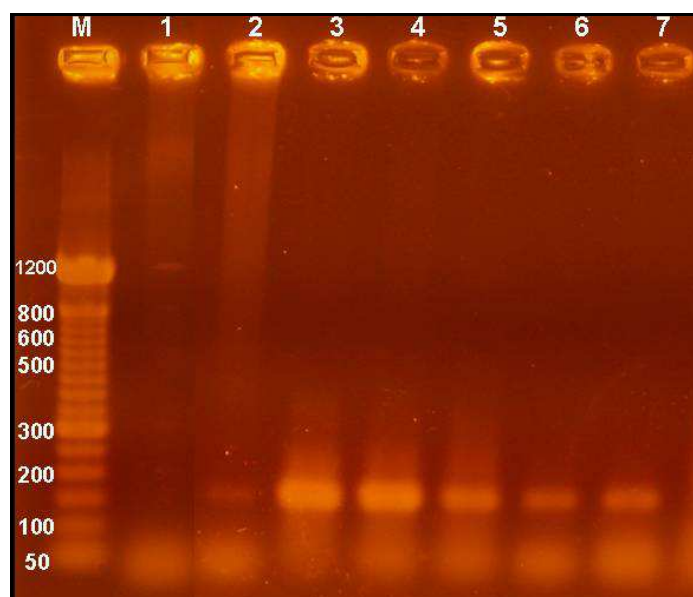


Figura 6. Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificados de nPCR de *Babesia bigemina*. M - Marcador de peso molecular 50 Pb; Colunas: 1 - controle negativo; 2 - controle positivo; 3 -7 - amostras positivas para *Babesia bigemina*.

A análise das 309 amostras de sangue de bovinos do município de Ibicaraí, BA, submetidas à nPCR, demonstrou que 195 (63,1%) foram positivas para *A. marginale*, 105 (34%) para *B. bigemina* e 63 (20,4%) para *B. bovis* (Tabela 2). Enquanto que nas lâminas de esfregaço sanguíneo, 96 (31,1%) foram positivas para *A. marginale* (Figura 7) e 63 (20,4%) para *Babesia* sp. (Figura 8).

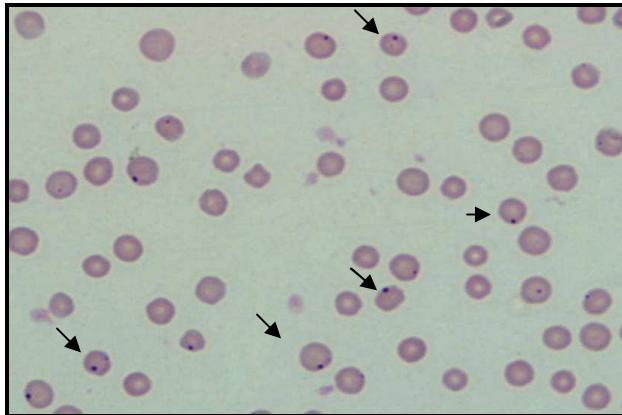


Figura 7. Esfregaço sanguíneo evidenciando hemácias parasitadas por *Anaplasma marginale* (indicado pelas setas), em bovinos naturalmente infectados no município de Ibicaraí, BA. Objetiva de 100x.

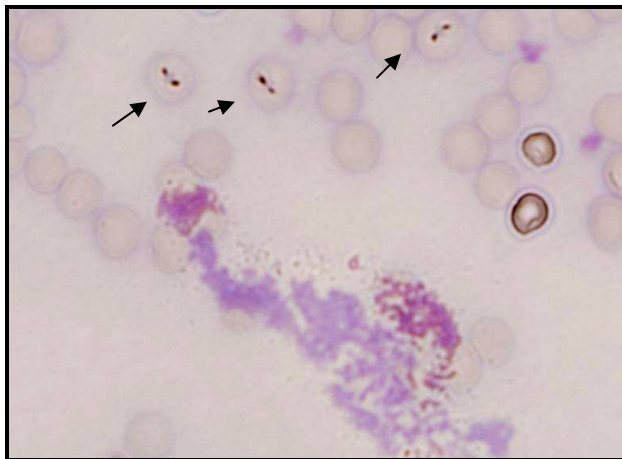


Figura 8. Esfregaço sanguíneo evidenciando hemácias parasitadas por *Babesia* sp. (indicado pelas setas), em bovinos naturalmente infectados no município de Ibicaraí, BA. Objetiva de 100x.

Neste estudo, 10% (31/309) dos animais analisados pela nPCR apresentavam-se infectados pelos três patógenos avaliados. As amostras de carrapatos das seis propriedades, analisadas por nPCR, foram positivas apenas para *A. marginale* (Figura 9).

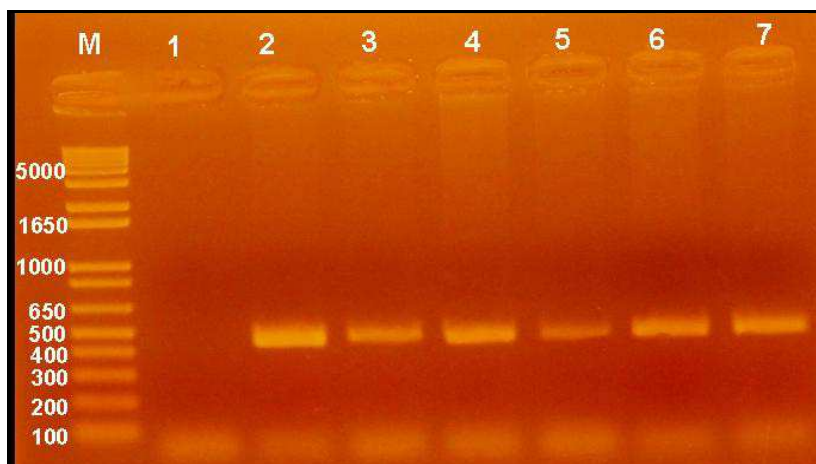


Figura 9. Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificadores de *Anaplasma marginale*. M - Marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder); Colunas: 1 - controle negativo; 2-7 - amostras positivas para *Anaplasma marginale* provenientes de extração de DNA das amostras de carrapatos coletados nas seis propriedades.

Tabela 2. Freqüência dos agentes etiológicos do complexo da Tristeza Parasitaria Bovina detectadas através da nPCR no município de Ibicaraí, BA.

| Agentes | Positivo | | Negativo | |
|----------------------------|----------|------|----------|------|
| | N | % | N | % |
| <i>Babesia bovis</i> | 63 | 20,4 | 246 | 79,6 |
| <i>Babesia bigemina</i> | 105 | 34 | 204 | 66 |
| <i>Anaplasma marginale</i> | 195 | 63,1 | 114 | 36,9 |

Verificaram-se diferenças significativas ($P < 0,01$) na comparação entre os dois métodos de diagnósticos, nPCR e lâminas de esfregaço sanguíneo. Das 195 amostras de sangue positivas para *A. marginale* por nPCR, 96 (49,2%) apresentaram positivas em lâminas de esfregaço sanguíneo (Tabela 3). A concordância ao teste KAPPA obtida foi de 0,41. Ao passo que das 134 (43,4%) amostras de sangue positivas para *Babesia* sp. por nPCR, 63 (47%) apresentaram positivas em lâminas de esfregaço sanguíneo (Tabela 3). A concordância ao teste KAPPA obtida foi de 0,48.

Tabela 3. Comparação entre PCR e Esfregaço sanguíneo de *Anaplasma marginale* e *Babesia* sp. em rebanhos bovinos leiteiros mestiços no município de Ibicaraí, BA.

| <i>Anaplasma marginale</i> | | | | |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|------------|
| Esfregaço sanguíneo | PCR | | Total | |
| | Positivo | Negativo | | |
| | Positivo | 96 (49,2%) | 0 (0%) | 96 (31,1%) |
| Negativo | 99 (50,8) | 114 (100%) | 213 (68,9%) | |
| Total | 195 (63,1%) | 114 (36,9%) | 309 (100%) | |

| <i>Babesia</i> sp. | | | | |
|----------------------------|-----------------|-----------------|--------------|------------|
| Esfregaço sanguíneo | PCR | | Total | |
| | Positivo | Negativo | | |
| | Positivo | 63 (47%) | 0 (0%) | 63 (20,4%) |
| Negativo | 71 (53%) | 175 (100%) | 246 (79,6%) | |
| Total | 134 (43,4%) | 175(56,6%) | 309 (100%) | |

Teste do X^2 ($P < 0,01$)

Na avaliação dos fatores associados para os agentes etiológicos do complexo da TBP no rebanho mestiço no município de Ibicaraí, BA, verificou-se que os fatores trânsito de animais, realização de exames de hemoparasitas, uso de biocarrapatograma, tipo de bezerreiros existentes, raça dos animais, área de pastagens, sistema de criação, sexo e presença de moscas, não apresentaram associação significativa ($P < 0,01$). Enquanto que, os fatores de risco presença de carrapato e idade dos animais apresentaram associação significativa ($P < 0,01$) com a frequência de animais infectados pelos patógenos analisados por nPCR (Tabela 4).

Tabela 4. Fatores associados para os agentes etiológicos do complexo da Tristeza Parasitária Bovina em rebanhos bovinos leiteiros mestiços no município de Ibicaraí, BA.

| Fatores de risco | <i>Babesia sp.</i> | | | <i>Anaplasma marginale</i> | | |
|---------------------------------|----------------------|----------|---------|----------------------------|----------|---------|
| | Amostras +/Total (%) | χ^2 | Valor p | Amostras +/Total (%) | χ^2 | Valor p |
| Presença de carrapato | | | | | | |
| Sim | 119/174 (68,4) | 98,44 | 0,00 | 132/174 (75,9) | 29,34 | 0,00 |
| Não | 15/135 (11,1) | | | 60/134 (44,8) | | |
| Trânsito de animais | | | | | | |
| Sim | 61/134 (45,5) | 0,30 | 0,57 | 83/134 (61,9) | 0,00 | 0,95 |
| Não | 73/175 (41,7) | | | 109/175 (62,3) | | |
| Exames de hemoparasitas | | | | | | |
| Sim | 21/61 (34,4) | 2,04 | 0,15 | 37/61 (60,7) | 0,01 | 0,90 |
| Não | 113/248 (45,6) | | | 155/248 (62,5) | | |
| Uso de biocarrapatograma | | | | | | |
| Sim | 21/61 (34,4) | 2,04 | 0,15 | 37/61 (60,7) | 0,07 | 0,90 |
| Não | 113/248 (45,6) | | | 155/248 (62,5) | | |
| Tipo de bezerreiros | | | | | | |
| Coletivo | 109/256 (42,6) | 0,21 | 0,64 | 160/256 (62,5) | 0,01 | 0,89 |
| Individual | 25/53 (47,2) | | | 32/53 (60,4) | | |
| Idade dos animais | | | | | | |
| Bezerros | 78/140 (55,7) | 14,98 | 0,00 | 108/140 (77,1) | 23,35 | 0,00 |
| Adulto | 56/169 (33,1) | | | 84/169 (49,7) | | |
| Raça dos animais | | | | | | |
| Mestiça | 109/256 (42,6) | 0,21 | 0,64 | 160/256 (62,5) | 0,01 | 0,89 |
| Girolando | 25/53 (47,2) | | | 32/53 (60,4) | | |
| Área de Pastagens | | | | | | |
| > 50 há | 73/175 (41,7) | 0,30 | 0,57 | 109/175 (62,3) | 0,00 | 0,95 |
| < 50 há | 61/134 (45,5) | | | 83/134 (61,9) | | |
| Sistema de Criação | | | | | | |
| Extensivo a pasto | 88/195 (45,1) | 0,48 | 0,48 | 123/195 (63,1) | 0,10 | 0,74 |
| Extensivo com suplementação | 46/114 (40,4) | | | 69/144 (60,5) | | |
| Sexo | | | | | | |
| Fêmeas | 93/243 (38,3) | 11,06 | 0,10 | 146/243 (60,1) | 1,65 | 0,19 |
| Macho | 41/66 (62,1) | | | 46/66 (69,7) | | |
| Presença de moscas | | | | | | |
| Sim | 58/146 (39,7) | 1,22 | 0,26 | 94/146 (64,4) | 0,42 | 0,51 |
| Não | 76/173 (46,6) | | | 98/163 (60,1) | | |

4.4. Discussão

No Brasil, as técnicas de diagnóstico molecular para investigar a epidemiologia do complexo da TPB ainda são pouco empregadas, com número reduzido de trabalhos publicados na área. Na Bahia, este é o primeiro estudo em que a técnica de nPCR foi usada para detectar a presença dos agentes do complexo da TPB em bovinos mestiços e carrapatos. Os padrões de amplificação encontrados neste estudo para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* (Figuras 2 e 3) foram semelhantes aos tamanhos descritos em outros trabalhos realizados com os mesmos conjuntos de *primers* (FIGUEROA et al., 1993; TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998; MOURA et al., 2003; BRITO et al., 2007).

A região sul da Bahia caracteriza-se como área de estabilidade enzoótica (ARAÚJO et al., 1997, 1998), de acordo com os conceitos de Mahoney e Ross (1972). Esta região apresenta condições climáticas que favorecem o desenvolvimento durante todo o ano do *R. microplus*, principal vetor dos agentes do complexo da TPB,.

Nas amostras das seis propriedades analisadas verificou-se 63,1% de positividade para *A. marginale*, por meio do diagnóstico por nPCR, resultado semelhante ao encontrado por Torione et al. (1998) em Oregon, com 64% de animais positivos, e inferior ao observado por Brito et al. (2010) em Rondônia e no Acre, que observaram 98,6 e 92,4% animais positivos, respectivamente, em animais com faixa etária entre 4 e 12 meses, utilizando PCR em ambos os trabalhos. Os resultados verificados por Brito et al. (2010) podem ser devido à faixa etária dos animais avaliados, diferente deste trabalho que avaliou bezerros e animais adultos, e encontrou relação significativa ($P < 0,01$) ao comparar a faixa etária dos animais com a presença de *A. marginale*.

As amostras positivas para *B. bigemina* apresentaram uma frequência de 34%, semelhante ao encontrado por Smeenk et al. (2000) com 35% de animais positivos no Zimbábue, e superior ao encontrado por Brito et al. (2007) que verificaram em Rondônia uma frequência de 3,09%, também utilizando

diagnóstico molecular por PCR. Ao passo que para *B. bovis* foi observado 20,4% de animais positivos, frequência semelhante à verificada por Martins et al. (2010) com 27% de animais positivos em Moçambique. Além disso, infecções mistas com hemoparasitos *B. bigemina* e *B. bovis* foram identificadas associados a carrapatos responsáveis por transmitir estas enfermidades aos bovinos (MARTINS et al., 2010).

Os trabalhos de investigação epidemiológica, realizados com as diferentes metodologias de sorologia, verificaram frequências para os agentes do complexo da TPB variando entre 80 a 100% em áreas de estabilidade enzoótica nas diferentes regiões do país (ARAÚJO et al., 1998; SOUZA et al., 2000a; TRINDADE et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2011). Estas frequências são superiores as encontradas neste estudo com diagnóstico molecular por nPCR. Porém, vale ressaltar que os testes sorológicos indicam apenas que houve exposição ao agente (WAGNER et al., 1992), mas não detectam o agente como ocorre no diagnóstico por nPCR (FIGUEROA et al., 1992; BRITO et al., 2010).

Como esperado, as frequências de *Babesia* sp. e *A. marginale* detectadas por amplificação do DNA, 43,4 e 63,1%, respectivamente, foram significativamente superior àquelas obtidas por exame microscópico de esfregaços sanguíneos, 20,4 e 31,1%, respectivamente ($P < 0,01$). Resultados semelhantes foram observados por Cassinia et al. (2011) ao comparar estas mesmas técnicas na detecção de *Babesia* sp. na Itália, com 21,6% de animais positivos detectados por PCR e 6,5% por esfregaço sanguíneo. O método de exame microscópico de esfregaços sanguíneos apresenta baixa sensibilidade, não detectando animais positivos nos estágios iniciais ou crônicos da infecção, quando o número de parasitas circulantes é muito baixo (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005). Sendo um procedimento adotado pelos médicos veterinários em regiões de incidências, para o acompanhamento de casos clínicos (SANTANA et al., 2008).

A determinação do perfil de estabilidade ou instabilidade de uma região depende da avaliação de diversos fatores, como os inerentes ao animal (raça, idade), e variações climáticas, estresse, manejo, tipo de pastagens e presença de vetores (GUIMARÃES et al., 2011). Nas áreas de estabilidade enzoótica a imunidade é adquirida cedo na vida da maioria dos animais de forma que a

doença clínica ocorre apenas raramente. Contudo, o manejo e as condições climáticas podem afetar o estado imunológico, tornando os animais susceptíveis. Alguns fatores podem afetar a presença do hemoparasito nos animais, a exemplo da presença de carrapatos e da idade dos animais, como verificado neste trabalho, onde estes dois fatores de risco apresentaram associação significativa com a presença de *A. marginale* e *Babesia* sp. (Tabela 4). A presença persistente de carrapatos durante todo o ano permite a inoculação contínua dos patógenos nos animais a partir do nascimento, desenvolvendo uma imunidade específica suficiente para torná-los imunes (FOLLY et al., 2009). Desta forma, os bezerros apresentam maior prevalência para os agentes do complexo da TPB, como observado por Madruga et al. (2000) no Mato Grosso do Sul, mesmo sem a constatação dos sinais clínicos (ZAUGG et al., 1986).

5. CONCLUSÕES

Nas condições estudadas, a nPCR revelou-se uma boa ferramenta para diagnóstico dos agentes da TPB devido a sensibilidade e especificidade, quando comparado ao esfregaço sanguíneo.

O protocolo otimizado para extração de DNA total foi eficiente para isolar DNA de qualidade para uso no diagnóstico molecular da TPB.

A utilização da nPCR em amostras de DNA total extraídas de carrapatos identificou com eficácia a presença de *Anaplasma marginale*.

O município de Ibicaráí apresenta-se como uma área de estabilidade endêmica com prevalência comprovada através de nPCR, sendo *Anaplasma marginale* o principal agente da TPB.

No município de Ibicaráí, os fatores associados à TPB, que apresentaram maior significância foram presença de carrapatos e idade dos animais quando comparado com a frequência observada dos agentes da TPB.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. B.; TORTELLI, F. P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J. L. M., SOARES, M. P.; FARIAS, N. A. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 237-242, 2006.

ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; ALMEIDA, M.A.O.; LEAL, C.R.B.; MIGUITA, M. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste da congutinação rápida. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. v. 6, n. 2, p.111-115, 1997.

ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; LEAL, C.R.B.; BASTOS, P.A.S.; MARQUES, A.P.C. Frequência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 243-6, 1998.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 139-148, 2003.

ARTILES J.; ALVES BRANCO F.P.; MARTINS J.R.; CORREA L.B.; SAPPER MF.M. Prevalência de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos no estado da Bahia. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**. v. 4, n. 2, p.187, 1995.

AZAMBUJA, C. J.; GAYO, V.; SOLARI, M.; SUAREZ, M.; STOLL, M. Biotechnology applied to the detection of infectious agents in cattle. Diagnosis of *Babesia bovis* by PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.3, n.1, p.1-4. 1994.

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

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

BERTO, R. S.; FAUSTINO, M. A. G.; MELO, L. E. H.; ALVES, L. C.; MADRUGA, C. R.; ALMEIDA, M. A. O.; RAMOS, C. A. N.; TENÓRIO, T. G. S.; SILVA, F. F. Frequência de anticorpos IgG anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos no Município do Paudalho, Zona da Mata do Estado de Pernambuco. **Revista Medicina Veterinária**, v. 2, n. 3, p. 9-12, 2008.

BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, sup. 51, p. S247-S269, 2004.

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

BRITO, L. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; MOURA, M. M. F.; NETTO, F. G. S.; CAVALCANTE, F. A.; MARIM, A. D.; SOUZA, G. C. R.; SILVA, J. L. Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos. EMBRAPA, 2006. Disponível em: <http://www.cpafro.embrapa.br/publicacoes/2006/bpd43_dnabovinos.pdf>. Acesso em: set. 2011.

BRITO, L. G. et al. Estratégias de prevenção e controle da tristeza parasitária bovina (TPB) a partir da avaliação molecular da infecção em rebanhos criados em diferentes regiões fisiográficas dos estados de Rondônia e Acre. Porto Velho: EMBRAPA, 2007. Disponível em:

http://www.cpafrro.embrapa.br/publicacoes/2007/cot329_tristezaparasitaria.pdf>

Acesso em: out. 2011. **Comunicado Técnico 329.**

BRITO, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; ROCHA, R.B.; SILVA NETTO, F.G.; MARIM, A.D.; SOUZA, G.C.R.; MOURA, M.M.F. *Anaplasma marginale* infection in cattle from southwestern Amazônia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 249-254, 2010.

BROWMAN, D. D. Artrópodes. In: _____. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. Barueri, SP: Manole, 2006. cap. 1, p. 1-81.

CANTÚ-MARTÍNEZ, M. A.; SALINAS-MELÉNDEZ, J. A.; ZARATE-RAMOS, J. J.; ÁVALOS-RAMÍREZ, R.; MARTÍNEZ-MUNOZ, A.; SEGURA-CORREA, J. C. Prevalence of antibodies against *Babesia bigemina* and *B. bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) in farms of northeastern Mexico. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 7, n. 2, p. 121-123, 2008.

CARELLI G.; DECARO N.; LORUSSO A.; ELIA G.; LORUSSO E.; MARI V.; CECI L.; BUONAVOGLIA C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**. v. 1241, n. 2, p. 107-114, 2007.

CASSINIA, R.; MARCERA, F.; REGALBONOA, F. A.; CANCRINIB. G.; GABRIELLI, B.S.; MORETTIC, A. R.; GALUPPID, M.P.; TAMPIERID, M.P.; PIETROBELLI, M. New insights into the epidemiology of bovine piroplasmoses in Italy. **Veterinary Parasitology**. doi:10.1016/j.vetpar.2011.08.004. 2011.

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

D'ANDREA L.A.Z.; SARTOR I.F.; MADRUGA C.R.; FREITAS S.B.Z.; KROLL L.B.; KRONKA S.N. Condição imunológica de bovinos das raças Holandesa e

Nelore frente a *Babesia bovis* e *B. bigemina* em duas regiões do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 74-78, 2006.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “EGH agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.51, p.2145-2165, 2001.

FARIAS, N.A. da R. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. **Agropecuária**, 1995. 80p.

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

FELSHEIM, R.F.; CHAVEZ, A.S.O.; PALMER, G.H.; CROSBY, L.; BARBET, A.F.; KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G. Transformation of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 167–174, 2010.

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; BUENING, G.M. Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. **Journal of Clinical Microbiology**. v.30, n.10, p. 2576-2582, 1992.

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

FOLLY, M. M.; PEREIRA, M. A. V. C.; EMMOTT, V. P.; VITA, G. F.; MADRUGA, R. Ocorrência de *Babesia* sp. em bezerros mestiços, por meio de testes sorológicos, em Campos dos Goyatacazes, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 44-51, 2009.

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

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

GUEDES JUNIOR, D. S.; ARAÚJO, F. R.; SILVA, F. J. M.; RANGEL, C. P.; BARBOSA NETO, J. D.; FONSECA, A. H. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the Northeastern region of the State of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

GUIMARÃES, A.M.; CARVALHO, A.H.O.; DAHER, D.O.; ROCHA, C.M.B.M.; HIRSCH, C. Soroprevalência e fatores de risco para *Babesia bovis* em rebanhos leiteiros na região sul de Minas Gerais. **Ciência Agrotécnica**, v. 35, n. 4, p. 826-832, 2011.

HERRERO, M. V. E.; PE´REZ, W. L.; GOFF, S.; TORIONI DE ESCHAIDE, D. P.; KNOWLES, T. F.; MCELWAIN, V.; ALVEREZ, A.; ALVAREZ, G. M. Prospective study for the detection of *Anaplasma marginale* Theiler, 1911 (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Costa Rica. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 849:226–233. 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. Bahia, 2010. Disponível em:

<<http://www.ibge.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/ppm2011.pdf>>.

Acesso em: 23 out 2011.

JACKSON, D.P.; HAIDEN, J.D.; QUIRKE, P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. In: MCPHERSON, M.J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G.R. **PCR - A practical approach**. v.1, p.29-50, 1994.

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

JULIANO, R. S.; MACHADO, R. Z.; FIORAVANTI, M. C. S.; ANDRADE, G. M.; JAYME, V. S. Soroepidemiologia da babesiose em rebanho de bovinos da raça curraleiro. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1387-1392, 2007.

KESSLER, R.H., MADRUGA, C.R., SHENCK, M.A.M. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babes, 1888, Starcovici, 1983) em bezerros do estado do Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 1225-1230, 1983.

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

KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 95-107, 2010.

KUHN, C.; THALLER, G.; WINTER, A. Evidence for multiple alleles at the dgat1 locus better explains a affect on fat content in cattle. *Genetics*, v. 167, p. 1873-1881, 2004.

KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Florida: CRC, 1988. p.1-28.

MADRUGA, C. R. et al. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em bezerros da raça nelore, Ibagé e cruzamentos de nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, n. 9, p. 1163-1168, 1984.

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

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R.. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 37, p. 44–47. 1972.

MAHONEY, D.F. Vaccination against babesiosis in Australia. In: SEMINÁRIO SOBRE HEMOPARÁSITOS, 1975, Cali, Colômbia. **Anais...**: CIAT, 1975. p.17-22.

MARANA, E. R. M.; ALFIERI, A. A.; ANDRADE, G. M.; FREIRE, R. L.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, O. Comparação dos testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta, Conglutinação Rápida, ELISA indireto e ELISA por competição para a detecção de anticorpos contra o *Anaplasma marginale* em soros de bovinos de diferentes áreas enzoóticas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 629-638, 2006.

MARANA, E. R. M.; DIAS, J. A.; FREIRE, R. L.; VICENTINI, J. C.; VIDOTTO, M. C.; VIDOTTO, O. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 20-26, 2009.

MARTINS, T. M.; NEVES, L. P.; OLIVIA, C.; FAFETINE, J. M.; DO ROSARIO, V.; DOMINGOS, A. Detecção molecular de *Babesia* spp. e outras infecções haemoparasitic de gado na Província de Maputo, Moçambique. **Parasitologia**. vol. 137, n. 6, p. 939-946, 2010.

MARTINS, J. R. Carrapato bovino. 2002. Disponível em: <<http://www.carrapatobovino.com/babesioseeanaplasnose.htm>>. Acesso em: 11 out. 2011.

MELO E.S.P.; ARAÚJO F.R.; RAMOS C.A.N.; SOARES C.O.; ROSINHA G.M.S.; ELISEI C.; MADRUGA C.R. ELISA com MSP5 recombinante truncada para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 27, n. 7, p. 301-306, 2007.

MOURA, A.B.; VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M.H.; VIDOTTO, M.C.; PEREIRA, A.B.L. Studies on the *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 infection in *Boophilus microplus* (Canestrin, 1887) using 'nested' PCR. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 12, 1, p. 27-32, 2003.

MUÑOZ, F.F. **Identificação de bovinos portadores sadios de *Babesia bigemina* (SMITH & KILBORNE, 1893) através da técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR**. 46 f. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2005.

OLIVEIRA, A. A. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasnose no estado de Sergipe. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n. 5, p. 377-386, 1992.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; ARAUJO, J.P.; AMARANTE, A.F.T. PCR-based detection of *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**, 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. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 77-83, 2002.

PEREIRA, D. A. A. *Avaliação e otimização de reações da polimerase em cadeia para diagnóstico molecular e estudo epidemiológico de Babesia bovis*. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

RAMOS C.A.N.; ARAÚJO F.R.; SOUZA I.I.F.; GUEDES JR D.S.; OLIVEIRA R.H.M.; FARIAS T.A.; OLIVEIRA J.B.; ALVES L.C.; FAUSTINO M.A.G. Comparação entre diversos antígenos para o diagnóstico de *Anaplasma marginale* por ELISA. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 1, p. 37-41. 2010.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 6.ed. São Paulo: Roca,1996. 1029p.

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

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. **International Journal for Parasitology**. v.35, p.105- 111, 2005.

SIDE – Sistema de dados estatísticos. Ibicaraí, BA, 2011

SMEENK, I.; KELLY, P.J.; WRAY, K.; MUSUKA, G.; TREES, A.J.; JONGEJAN, F. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 71, n. 1, p. 21-4, 2000.

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

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 26-30, 2000a.

SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; SCOFIELD, A.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 97-101. 2000b.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; MASSARD, C. L. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do médio Paraíba. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 309-314, 2001.

SPANEL-BOROWOSKI, K.; FENYVES, A. The heteromorphology of cultured microvascular endothelial cells. **Drug. Research**. v. 44, n.1, p. 385-391, 1994.

STICH, R.W.; BANTLE, J.A.; KOCAN, K.M. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmatetaceae) in hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Medical Entomology**, v.30, n.4, p.781-788, 1993.

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

TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; MCELWAIN, T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a

competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, p. 777-782, 1998.

TRINDADE, H.I.; SILVA, G.R.A.; TEIXEIRA, M.C.A.; SOUSA, M.G.; MACHADO, R.Z.; FREITAS, F.L.C.; ALMEIDA, K.S. Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguaína, State of Tocantins, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. v. 19, n. 3, p. 169-173, 2010.

TRINDADE, H. I.; ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C. Tristeza Parasitária Bovina – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano IX, n. 16, 2011.

TRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. London: Butterworth, 1986. 273p.

UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 2006.

URQUHAT, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, .W. **Parasitologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 273p.

VIDOTTO, O.; ANDRADE, G. M.; AMARAL, C. H. S.; BARBOSA, C. S.; FREIRE, R. L.; ROCHA, M. A.; VIDOTTO, M. C. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* em rebanho leiteiros da região de Londrina, Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49, n. 5, p. 655-659, 1997.

VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M. Diagnóstico em anaplasmose bovina. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 361-368, 2001.

WAGNER G.G.; MCGUIRE C. *Babesia bigemina*: Quantification of infection in nymphal and adult *Boophilus microplus* using DNA probe. **Ex. Parasitol.** 74:117-26, 1992.

WRIGHT, I.G. Immunodiagnosis and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp and *Anaplasma* sp in domestic animals. **Revue Science Technology Off International Epizootiology**, v. 9, n. 2, p. 345-356, 1990.

ZAUGG, J.L.; STILER, D.; CROAN, M.E.; LINCOLN, S.D. Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by males of *Dermacentor andersoni* Stiles fed on an Idaho field infected, chronic carrier cow. **Am. J. Vet. Res.** v.47, p.2269-2271,1986.

7. APÊNDICES

7.1. Questionário de coleta de dados

7.1.1. Questionário Epidemiológico

Fazenda: _____ Município: _____ Fone: _____

Localização: _____ Área total do Imóvel: _____ Área de pastagens: _____

Representante Legal: _____ Data da coleta: ___/___/___

Principal atividade da fazenda: Agricultura: Pecuária: Corte Leite

Composição do Rebanho:

SRD. Holandesa Girolando Gir Mestiça Jersey Pardo Suíça outras

Total de animais na propriedade: _____ Total de animais em lactação: _____

Produção diária de leite. _____

DADOS DO ANIMAL:

Na propriedade já teve casos de TPB? Sim Não

MANEJO:

Presença de carrapato na propriedade: Sim Não

Presença de moscas hematófagas na propriedade: Sim Não

Faz uso de carrapaticida nos animais? Sim Não

Quais produtos foram utilizados nos últimos anos?

_____, _____, _____, _____
Como é realizada a substituição dos carrapaticidas e com que freqüência? _____

Faz uso do biocarrapatograma na propriedade? Sim Não

Faz uso de medicamentos nos animais para controle e profilaxia da anaplasnose e babesiose?

Sim Não Quais medicamentos já foram utilizados? E com que freqüência?

Já utilizou vacinas contra Babesiose e Anaplasnose nos animais? Sim Não

Já realizou coleta de sangue para exames parasitológicos nos animais? Sim Não

Tipo de alimentação: Pasto Pasto e suplementação protéica

Regime de criação: Pasto Estabulado Semi-estabulado

Tipo de bezerreiros: Coletivo Individual

Fornecimento de água para os animais: Rios Lagoas Bebedouros

Suplementação mineral: Sim Não

Possuem quantos funcionários na propriedade fazenda? _____

Os funcionários já participaram de curso de capacitação? Sim Não

Qual a escolaridade dos funcionários:

Alfabetizados Não Alfabetizados Primário completo ginásio ensino médio

Condições físicas das instalações: Boa Ótima Ruim

Na propriedade houve trânsito de animais nos últimos meses? Sim Não

Qual região? _____

7.1.2. Questionário para coletas de dados individuais dos animais

Fazenda: _____ Número: _____ Data da coleta: ____/____/____

Localização: _____ Município: _____

Representante Legal: _____ Fone: _____

Área Total do imóvel: _____ Área destinado a produção leiteira: _____

Total de animais na propriedade: _____ Total de animais em lactação: _____

Identificação do animal:

Numero: _____ Nome do animal: _____

Raça:

SRD. Holandesa Girolando Gir Pardo suíço Jersey Mestiço

O animal já teve TPB? Sim Não

Idade: _____ meses

Adulto: Bezerros:

Escore corporal do animal:

Bom Ótimo Ruim

Presença de carrapato no animal:

Sim Não

Número de lactações: _____

7.2. Procedimentos para extração de DNA

7.2.1. Extração com Fenol/Clorofórmio

- 1- 300 µl de sangue mais 500 µl de água destilada, vortex.
- 2- Centrifugar 12000 rpm por seis minutos e descartar o sobrenadante.
- 3- Adicionar 500 µl de TE (tampão de extração, 250 µl de Tris 10 mM, 250 µl de EDTA 200 mM, 15 µl de proteinase K e 10 µl de Triton), vortex.
- 4- Colocar no banho maria por 30 minutos, 50 graus, vortex.
- 5- Adicionar 300 µl de SDS 0,5 %, vortex.
- 6- Mais 30 minutos no banho maria.
- 7- Acrescentar 130 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico/água, homogeneizar manualmente e aguardar 5 minutos, vortex.
- 8- Centrifugar por 10 minutos 14000 rpm e transferir o sobrenadante para outro tubo.
- 9- Lavar com 100 µl de clorofórmio.
- 10- Centrifugar por 10 minutos 14000 rpm e transferir o sobrenadante para outro tubo.
- 11- Colocar 100 µl de acetato de amônio 5 M e 800 µl de etanol (gelado) 100%. Agitar manualmente e aguardar 2 minutos.
- 12- Centrifugar por 10 minutos 12000 rpm e descartar o sobrenadante.
- 13- Lavar o precipitado com 1000 µl de etanol (gelado) 95 %, centrifugar por 10 minutos 14000 rpm.
- 14- Descartar o sobrenadante e deixar o pellet secar.
- 15- Colocar 50 µl de TE e armazenar em freezer a -20 °C.

POR AMOSTRA

70 µl de fenol

50 µl de clorofórmio

10 µl de álcool isoamílico

7.3. Procedimentos para eletroforese

- 1- Preparação do gel de agarose 3% em cuba horizontal.
- 2- Tampão de corrida TAE 1x.
- 3- Volume da amostra aplicado no gel 12 µL
- 4- Adição de 2 µL de Azul de Bromofenol 1x
- 5- Corrida a 80 volts por 1 hora.

7.4. Coloração do gel

- 1- Após corrida mergulhar o gel de agarose em Brometo de etídio (10 mg/L) por 15 minutos.
- 2- Posicionar o gel em câmara escura contendo lâmpadas UV e fotografar com o auxílio de máquina fotográfica digital acoplada ao computador.

7.5. Reação de PCR e nPCR.

Tabela 5. Reagentes e volumes utilizados na PCR – *Babesia sp.* e *Anaplasma*

| Reagentes | Volumes em µL |
|--------------------------|---------------|
| Água Milliq | 3,8 |
| MgCl ₂ | 3,0 |
| Tampão da Taq Polimerase | 7,0 |
| DNTP's | 1,0 |
| <i>Primer</i> direto | 2,5 |
| <i>Primer</i> reverse | 2,5 |
| Taq DNA Polimerase | 0,2 |
| Amostra de DNA | 5,0 |
| VOLUME FINAL | 25 |

Tabela 6. Reagentes e volumes utilizados na nested-PCR – *Babesia* sp.e *Anaplasma*

| Reagentes | Volumes em μL |
|--------------------------|--|
| Água Milliq | 4,7 |
| MgCl ₂ | 3,0 |
| Tampão da Taq Polimerase | 7,5 |
| DNTP's | 1,0 |
| <i>Primer</i> direto | 3,0 |
| <i>Primer</i> reverse | 3,0 |
| Taq DNA Polimerase | 0,3 |
| Amostra de DNA | 2,5 |
| VOLUME FINAL | 25 |